



HAL
open science

Régulation de la biologie des Lymphocytes T CD4+ conventionnels par les facteurs de transcription NF- κ B

Guilhem Lalle

► **To cite this version:**

Guilhem Lalle. Régulation de la biologie des Lymphocytes T CD4+ conventionnels par les facteurs de transcription NF- κ B. Immunologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2022. Français. NNT : 2022LYO10097 . tel-04187996

HAL Id: tel-04187996

<https://theses.hal.science/tel-04187996>

Submitted on 25 Aug 2023

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.



**THESE de DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1**

**Ecole Doctorale ED BMIC 340
Ecole Doctorale de Biologie Moléculaire Intégrative et
Cellulaire**

Discipline : Immunologie

Soutenue publiquement le 08/11/2022, par :
Guilhem LALLE

**Régulation de la biologie des
Lymphocytes T CD4⁺ conventionnels par
les facteurs de transcription NF- κ B**

Devant le jury composé de :

LEBECQUE, Serge	PU/PH Université Claude Bernard Lyon 1	Président
ASTIER, Anne	Directrice de recherche CNRS	Rapporteuse
PUEL, Anne	Directrice de recherche INSERM	Rapporteuse
MARTINET, Ludovic	Directeur de recherche INSERM	Examineur
GRINBERG-BLEYER, Yenkel	Chargé de recherche INSERM	Directeur de thèse

Résumé en Français

Régulation de la biologie des Lymphocytes T CD4⁺ conventionnels par les facteurs de transcription NF- κ B

Les lymphocytes T CD4⁺ conventionnels (Tconv) sont des acteurs centraux de la réponse immunitaire. En fonction des agents pathogènes et du contexte inflammatoire, les Tconv sont capables de se polariser en différentes sous populations cellulaires nommées T auxiliaires (ou Th), chacune présentant des fonctions effectrices spécifiques, orientant ainsi la réponse immunitaire. Dans le cancer, les Tconv ont majoritairement des fonctions protectrices, notamment la sous-population Th1. Cependant, le recrutement des Tconv dans la tumeur ainsi que l'expression de leurs fonctions effectrices sont bien souvent inhibés. A l'inverse, les Tconv reconnaissant des antigènes du soi sont pathologiques dans diverses maladies auto-immunes. La Sclérose en plaque (SEP) est une maladie dans laquelle les Tconv reconnaissent des antigènes de myéline. Ces cellules présentent un profil Th17 dit "pathogéniques" et sont responsables de l'inflammation du système nerveux central.

Les voies de signalisation contrôlant l'activation/la fonction des Tconv dans la tumeur et dans la SEP sont méconnues. NF- κ B est une famille de cinq facteurs de transcription, RelA, c-Rel, RelB, NF- κ B1 et NF- κ B2 qui s'associent sous forme de dimères pour induire la transcription de leurs nombreux gènes cibles. La voie NF- κ B contrôle de nombreux aspects de la fonction des lymphocytes T. Cependant, la fonction spécifique des cinq sous-unités dans les Tconv n'a presque jamais été explorée. Lors de mes travaux de thèse, j'ai tout d'abord montré que la délétion spécifique de RelB dans les lymphocytes T diminue la sévérité d'un modèle murin de SEP en diminuant l'expression du GM-CSF par les Tconv.

Dans un second temps j'ai étudié les fonctions intrinsèques aux Tconv de RelA et c-Rel dans les Tconv à l'état basal, dans l'auto immunité mais aussi dans la tumeur. Grâce à différents modèles murins et humains, j'ai pu observer une séparation des tâches entre les deux sous-unités. Tandis que RelA contrôle l'activation des Tconv à l'état basal et le programme pathologique dans l'auto immunité, c-Rel lui est requis pour les fonctions anti tumorales des cellules.

Ces résultats permettent de mieux appréhender la signalisation intracellulaire des Tconv et les mécanismes contrôlant les différents aspects de leurs nombreuses fonctions dans l'organisme. De

plus, en s'appuyant sur ces résultats, nous pouvons imaginer des stratégies thérapeutiques permettant d'orienter les réponses des Tconv dans la tumeur ou d'inhiber leur activation dans la SEP.

Mots clés :

NF- κ B ; Immunologie ; Lymphocyte T ; Cancer ; Sclérose en plaque.

Summary in English

Molecular Regulation of conventional CD4⁺ T cells by the NF- κ B subunits.

Conventional CD4⁺ T cells (Tconv) are central actors of the immune response. Depending on the pathogen and the inflammatory context, Tconv are able to polarize into different cell subpopulations, called Helper T cells (Th) each with specific effector functions. Thus, they can shape the immune response. In cancer, Tconv are mainly protective, especially the Th1 subpopulation. However, the recruitment of Tconv into the tumor and the expression of their effector functions are often inhibited. Conversely, in multiple sclerosis (MS), Tconv cells recognize myelin antigens and have a pathogenic Th17 profile which triggers the inflammation of the central nervous system. The signaling pathways controlling Tconv activation/function in tumor and MS are not well understood. NF- κ B is a family of five transcription factors, RelA, c-Rel, RelB, NF- κ B1, and NF- κ B2 that associate as dimers to induce transcription of their many target genes. The NF- κ B pathway controls various aspects of T cell function. However, the specific function of each of the five subunits in Tconv has almost never been explored. In my thesis work, I first showed that specific deletion of RelB in T cells decreases the severity of a mouse model of MS by decreasing GM-CSF expression by Tconv.

In a second axis of my PhD project, I studied the Tconv-intrinsic functions of RelA and c-Rel in Tconv at steady state, in autoimmunity and in cancer. Using different mouse and human models, I observed a separation of duties between the two subunits. While RelA controls the activation of Tconv in the basal state and the pathological program in autoimmunity, c-Rel is required for the antitumor functions of the cells.

These results provide a better understanding of the intracellular signaling of Tconv and the mechanisms controlling the different aspects of their numerous functions in the body. Furthermore, based on these results, we can devise therapeutic strategies to direct Tconv responses in the tumor or inhibit their activation in MS.

Keywords:

NF- κ B ; Immunology ; T cell ; Cancer ; Multiple Sclerosis.

Table des matières

Résumé en Français	2
Summary in English	4
Laboratoire	9
Remerciements	10
Liste des Abréviations	14
Liste des Figures	16
Liste des tables	16
Introduction Bibliographique	17
1. Introduction aux Lymphocytes T	18
1.1. La place des lymphocytes T conventionnels dans l'immunité	18
1.2. La différenciation des LT dans le thymus	19
2. La régulation moléculaire des LT	21
2.1. Le complexe du TCR	21
2.2. Les événements initiaux de la signalisation du TCR	22
2.3. La voie de signalisation NF- κ B	22
2.3.1. Présentation et caractéristiques générales de la famille	22
2.3.2. Engagement de la voie canonique par le TCR et les récepteurs costimulateurs	25
2.3.3. Engagement de NF- κ B par les cytokines	28
2.3.4. Engagement de la voie alternative par les TNFRSF	28
2.3.5. Régulation de la transcription par NF- κ B	28
2.3.6. Généralités sur les rôles de NF- κ B dans les LT	31
3. Sous-types de LT : généralités et fonctions connues de NF-κB	39
3.1. Les LT CD8	39
3.2. Les Treg	41
3.3. Les Tconv	43
3.4. La polarisation en Thelper	47
3.4.1. Th1	47
3.4.2. Th2	48
3.4.3. Th17	50
3.4.4. Th9	52
3.4.5. Tconv folliculaires (Tfh)	53
4. L'immunité du cancer	54
4.1. Incidence et mortalité	54
4.2. Mécanismes généraux de la carcinogénèse et « Hallmarks » du cancer	55
4.3. Traitements classiques du cancer	56
4.4. Découverte de l'immunité anti-tumorale	57
4.5. Mécanismes d'échappement au SI	58
4.6. La signalisation NF- κ B dans la tumeur	59
4.6.1. La voie canonique de NF- κ B contrôle la prolifération tumorale et son interaction avec le SI	59

4.6.2.	NF-κB du côté obscur de l'immunité dans le cancer	59
4.6.3.	NF-κB dans l'immunité anti tumorale ? Un nouvel espoir.	62
4.7.	Le rôle des Tconv dans l'immunité anti tumoral et l'implication de NF-κB	64
4.7.1.	Le rôle du « Help »	65
4.7.2.	Th1	65
4.7.3.	Th2	66
4.7.4.	Th9	66
4.7.5.	Th17	67
4.7.6.	Tfh/TLS	68
4.7.7.	Tconv cytotoxiques	68
4.7.8.	L'épuisement des Tconv	69
4.8.	Tconv et Immunothérapies du cancer	70
4.8.1.	La vaccination anticancéreuse	70
4.8.2.	Transfert de cellules T : exemple des LT CAR	70
4.8.3.	Les inhibiteurs de checkpoint immunitaires	71
4.8.3.1.	Anti CTLA-4	72
4.8.3.2.	Anti PD-1/PD-L1	72
4.8.3.3.	Autres thérapies ciblant des récepteurs de surface des LT	74
5.	La sclérose en plaque	75
5.1.	Introduction générale de la maladie	75
5.2.	Causes	76
5.2.1.	Génétiques	76
5.2.2.	Environnementales	76
5.3.	Traitements	77
5.4.	Physiopathologie	78
5.4.1.	L'EAE comme un modèle d'étude de la SEP	78
5.4.2.	Le rôle critique des Tconv dans la SEP	79
5.4.3.	Les différents types LT CD4+ pathogènes dans l'EAE et la SEP	81
5.4.3.1.	Th1 ou Th17 ?	81
5.4.3.2.	... GM-CSF !	82
5.4.4.	Le rôle du microbiote intestinal dans l'activation des Tconv	85
5.4.5.	Infection EBV et réponses T pathogéniques dans la SEP	85
5.5.2.	Lymphocytes B	87
5.5.3.	Lymphocytes T	88
6.	Moduler l'activité de NF-κB dans les Tconv, un espoir de thérapie pour la SEP et le cancer ?	91
Résultats		92
	Introduction du 1^{er} article (Scientific Reports, 2021)	92
	Introduction du second article (Manuscrit en préparation)	105
Discussion		134
1.	RelA contrôle l'activation des Tconv en contexte non pathologique	135
2.	RelB et RelA sont nécessaires à la fonction pathogénique des Tconv dans l'EAE	139
3.	Les propriétés anti tumorale des Tconv sont contrôlées par c-Rel	141
4.	La fonction des Tfh est-elle gouvernée par des membres de la famille NF-κB ?	143

5. c-Rel, un facteur de transcription qui réprime l'épuisement des LT intra tumoraux ? _____	144
6. L'activation de c-Rel dans les Tconv intra tumoraux, peut-elle avoir une valeur pronostique dans le cancer ? _____	145
7. Quid du rôle des sous-unités de NF- κ B dans les Tconv lors de la réponse aux infections ? __	146
8. La spécificité de fonction entre les différentes sous-unités de NF- κ B apporte une dimension thérapeutique à la modulation de la voie. _____	147
9. Comment expliquer cette divergence d'activation et de fonction entre RelA et c-Rel ? _____	150
Annexe _____	156
Références Bibliographiques _____	180

Laboratoire

Equipe " Régulation moléculaire de l'immunité dans le cancer" dirigée par Y. Grinberg-Bleyer.

CRCL - Cancer Research Center of Lyon

UMR INSERM 1052 - CNRS 5286

Université Claude Bernard Lyon 1

LabEx DEV2CAN

Centre Léon Bérard - Cheney B

28 rue Laënnec, 69373 Lyon Cedex 08

Remerciements

Je remercie sincèrement Dr. Anne Astier et Dr. Anne Puel d'avoir accepté de juger mon travail de thèse en qualité de rapportrices. Mes remerciements vont également au Dr. Ludovic Martinet et au Pr. Serge Lebecque qui ont acceptés de prendre part à mon jury en tant qu'examineurs.

Yenkel, merci de m'avoir fait confiance il y maintenant quatre ans en me proposant le poste de lab manager puis de m'avoir encouragé à faire cette thèse. Comme tu dois t'en souvenir j'étais très indécis à cette époque mais aujourd'hui je suis content de t'avoir écouté et fier du travail qu'on a fait ensemble. Merci pour ton écoute, tes conseils et pour tout ce que tu m'as appris au cours de ces quatre années. Je ne pense pas rencontrer un jour quelqu'un avec autant de connaissances en immuno que toi. Ça a été une chance de faire partie de cette équipe, de la voir se construire et grandir et j'espère (et je crois) sincèrement qu'elle va perdurer longtemps et percer les mystères de NF- κ B. Mais surtout, je vous souhaite le meilleur à ta famille et toi.

Allison, ma première vraie collègue au sein du labo ! ça a été un déchirement de te voir partir de l'équipe mais j'espère que c'est pour le meilleur. Ça me manque que tu ne passes plus me voir dans le bureau le soir pour raconter des potins^^ C'est ta gentillesse, ta bonne humeur et ton enthousiasme qui ont permis de créer un vrai esprit d'équipe dans ce labo tout jeune et même si tu ne travailles plus ici, on sent encore tous ta présence.

Raphaëlle, bientôt deux ans que tu es un farouche participant de Labo-Lanta express. Le chemin est semé d'embûches mais tu ne lâches rien et tu restes souriante et enthousiaste. Merci pour ton aide et ta bonne humeur. J'espère que tu vas faire une belle fin de thèse. Avant de partir je te donne mes amulettes et mon vote noir, fais en bon usage ! Bon courage pour la suite et j'ai hâte de te voir à la télé faire du stop avec ton gros sac à dos rouge.

Khaled aka « DJ KB9 » aka le stagiaire rigolo. Merci pour toute l'aide que tu m'as apporté ces derniers mois. C'était le sprint final et j'avais de la chance de travailler avec toi. Je suis content de savoir que tu restes, c'est une chance pour l'équipe. J'espère que tu vas profiter et t'épanouir ! T'es au top ! par contre j'ai toujours pas compris pourquoi tu kiffes autant Wejdene...

Pierre, mon cher voisin de bureau. Grand gaillard venu de Bretagne, t'es toujours prêt à dégainer une anecdote incroyable (souvent à base caca^^) pour tous nous faire rire. Je garde des souvenirs mémorables avec toi comme la fois avec la jupe et le vent ou la fois avec les selles de vélo pleine de caca d'oiseaux (décidément). Toi non plus tu vas bientôt plus être au labo mais en attendant je te souhaite bon courage et beaucoup de force pour pas te faire martyriser par les filles. A bientôt sur une game d'Age of Empire, je suis sûr que tu seras toujours... Excellent !

La dame qui crie (Julie), putain de bordel de merde ça va me manquer de plus travailler avec toi ! Zen et calme en aucune circonstance avec toi on ne s'ennuie jamais. Je tiens aussi à te remercier pour toute l'aide que tu m'as apporté dans mes manips et tout le travail que tu fais pour nous tous au quotidien. Bon courage pour la suite et garde espoir, il va venir ton Dwayne Johnson ;p

Marlène, le contrepied absolu de Julie et pourtant tout aussi drôle et gentille. C'est agréable d'avoir des collègues qui font preuves de calmes et de bienveillance comme toi. Merci pour ton aide sur les manip, c'est rare de rencontrer quelqu'un d'aussi altruiste. Je te souhaite le meilleur pour la suite. PS : je ne sais pas encore ou je serai ensuite mais si Nathan veut venir faire un stage il est le bienvenu.

Maud, Je te remercie pour tout ce que tu as apporté sur la partie transcriptomique du projet et surtout pour tout le temps que tu y as passé. Merci aussi pour ton cadeau de Noël, on a fait plein de beaux vêtements avec ! J'espère que ta famille et toi êtes heureux à Vienne.

Je tiens bien sûr à remercier Julien Marie et son équipe, nos colocs de labo pour leur aide d'un point de vue professionnel. Mention spéciale à l'impétrant Saïdi et son rire communicatif, à Ramdane le musicien avec qui j'ai souvent poussé la chansonnette, à Olivier et notre passion commune pour Star Wars, à Alex et son petit Léo, à Pti Val mon compagnon de bureau (courage tu finiras par avoir un vélo un jour), à Ossama qui est tout de suite devenu un ami (Force à toi t'es le prochain !) et à tous les autres.

Je tiens aussi à remercier tous les membres des plateformes avec qui j'ai travaillé. Merci aux membres d'Anican (ou P-PAC à ce qu'il parait), merci à Priscillia, Agathe et Thibault pour les nombreuses heures de tri et les conseils sur le FACS. Merci aussi aux membres de la plateforme Gilles Thomas et à Cyril pour les sc-RNAseq et les cours sur les manchots.

J'ai aussi eu la chance d'avoir fait un stage dans l'équipe Mehlen Merci à vous tous pour tout ce que vous m'avez appris et tous les bons moments partagés. Merci à Mathieu mon camarade de M2 et copain de stage (Bisous à Joyce et Logan), Ambroise mon pseudo jumeau, merci à Mélissa, Joanna, Cathy, Benj, Nico, Olivier, Ficus, Verena, Thomas, Patrick et tous les autres.

J'ai ensuite côtoyé l'équipe Caux chez qui je me suis fait de bons amis. Merci Aurélien pour tous les moments partagés, plein de bisous à ta magnifique petite famille qui a bien grandi depuis qu'on s'est rencontrés. Merci à Nabil (je sais pas si il compte comme un Caux mais bon), merci à Manuela ma collègue de l'IRCI, Valentin, Antoine, Céline, Lyvia, Yasmine, Nath, Marie-Cécile, Jenny, Christine, Bertrand et Christophe et tous les autres, vous êtes trop nombreux dans cette équipe^^.

Merci aux copains du Bad du lundi midi, c'était top (et surtout merci Benj d'avoir organisé ça) ! Désolé de vous avoir mis des grosses branlées... Khaled t'as intérêt à continuer même quand je serai plus là !

Merci aussi à tout le pôle gestionnaire/administration avec qui j'ai beaucoup travaillé en tant que Lab Manager. Merci Yohann, Cathy, Julie Anaïs, Mounia et Catherine.

Je vais finir en remerciant ma famille. Merci à vous Lolo et Tanc de faire de moi un grand frère heureux. Vous êtes super cool, parfois cons mais surtout formidables... la plupart du temps :p Merci papa et maman pour tout ! Vous m'avez transmis la passion de la science et j'ai eu la chance d'avoir des parents qui comprennent mon travail et même me donnent des conseils ou des explications sur certains point. On doit pas être nombreux à avoir cité nos deux parents en intro de thèse. Merci papa de m'avoir dit que tu me pensais capable de faire une thèse, c'est toi qui m'as définitivement décidé à le faire. Et merci maman d'avoir été la meilleure des collègues. Je te laisse les clés du CRCL. Un gros bisou à toutes mes cousines, mon cousin, mes tata, mes tonton et Jean-Paul.

Merci Audrey pour toutes ces années passées ensemble. Merci de m'avoir soutenu ces dernières années, j'ai eu de la chance de t'avoir mes côtés.

*A mes deux grands-mères,
Mamie Suzanne, je t'aime fort,
Mamie (Marie) Jacqueline, tu me manques déjà.*

Liste des Abréviations

AIRE : Autoimmune regulator	EAE : encephalomyélite autoimmune expérimentale
aTreg : Treg activé	EBNA1 : protéine Epstein–Barr virus nuclear antigen 1
BCG : Bacillus Calmette-Guerin	GC : centre germinatif
Bcl- : B cell lymphoma -	GF : sans aucun germe
CAR : récepteur antigénique chimérique	GM-CSF: granulocyte-macrophage colony stimulating factor
CARMA1 : Caspase recruitment domain-containing membrane-associated guanylate kinase protein-1 :	GRR : régions riches en glycine
CCL : Chemokine (C-C motif) ligand	GzmB : granzyme B
CCR : Chemokine (C-C motif) receptor	HLA : antigènes leucocytes humains
CD : Cluster de différenciation	ICI : inhibiteurs de point de contrôle immunitaire
CD40L : CD40L ligand de CD40	IFN : interféron
cDC : DC conventionnelles	IFN γ R : récepteur à l'IFN γ
CFA : adjuvant de Freund complet	Ig : immunoglobulines
ChIP : immunoprécipitation de la chromatine	IKK : I κ B kinase
ChIP-seq : Séquençage par ChIP	IL- : interleukine
cKO : conditionnel KO	IP3: inositol-tri-Phosphate
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité	IPEX: immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked
CNS : conserved non-coding sequences	IRAK : kinases associées aux IL-1R
CPA : cellule présentatrice d'antigène	ISP: immature simple postif
CRISPR: clustered regularly interspaced short palindromic repeats	ITAM: immunoreceptor tyrosine-based activation motif
CSH : cellule souche hématopoïétique	iTreg: Treg induit
cTec : Tec du cortex	I κ B: inhibitor of κ B
CTLA-4 : cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4	KO: knock-out
CXCL : Chemokine (C–X–C motif) ligand	LAG3: lymphocyte-activation gene 3
CXCR : Chemokine (C–X–C motif) receptor	LB : lymphocyte B
DAG : Diacylglycérol	LCMV : virus de la chorioméningite lymphocytaire
DC : Cellule dendritique	LCR : liquide céphalo-rachidien
DN : Double négatif	LT : lymphocyte T
DP : Double positif	LT β : lymphotoxine β

LUBAC : linear ubiquitin chain assembly complex

MALT1 : mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1

MBP : protéine basique de la myéline

MDSC : cellules suppressives d'origine myéloïde

MO : moëlle osseuse

MOG : glycoprotéine des oligodendrocytes de la myéline

MPT : modifications post traductionnelles

mTEC : cellule épithéliale de la région médullaire du thymus

mTec : Tec de la zone médullaire

mTOR: mammalian Target Of Rapamycin

NEMO : NF- κ B essential modulator

NF- κ B : Nuclear Factor of the κ -chain in B-cells

NIK : NF- κ B-inducing kinase

NK : lymphocyte natural killer

NLS : site de localisation nucléaire

OVA : ovalbumine

PD-1: programmed death 1

PD-L1: programmed death ligand 1

PKA : protéine kinase A

PKC θ : protéine kinase C θ

PLC : progéniteur lymphoïde commun

PLC γ : phospholipase C γ

PMA : acétate de myristate de phorbol

PP2A : phosphatase protéique

pTreg : Treg périphérique

RHD : rel homology domain

sc-RNAseq : séquençage ARN à l'échelle de la cellule unique

SEP : sclérose en plaques

SHP2 : SH2 containing protein tyrosine phosphatase2

SI : système immunitaire

SM : mimétiques de SMAC

SNC : système nerveux central

SP : simple positif

SPF: sans pathogène

STAT: signal transducers and activators of transcription

TAD : domaine de transactivation

TCM : LT mémoire central

Tconv : LT CD4⁺ conventionnels

TCR : T cell receptor

Tec : cellule épithéliale du thymus

TEM : LT effecteur mémoire

Tex : LT épuisés

Tfh: Tconv folliculaires

Th-: Thelper

TIM-3: T-cell immunoglobulin and mucin containing protein-3

TIR: Toll- and IL-1R-like

TLS : structure lymphoïdes tertiaires

TME : microenvironnement tumoral

TNF: tumor necrosis factor

TNFRSF: TNF receptor superfamily members

Tpex: LT progéniteur épuisés

TRAF: TNF receptor-associated factor-

Treg: lymphocyte T régulateur

tTreg: Treg thymique

Liste des Figures

Figure 1 : Développement thymique des lymphocytes T.

Figure 2 : Structure biochimique des membres de la famille NF- κ B.

Figure 3 : La signalisation NF- κ B dans les Lymphocytes T.

Figure 4 : Polarisation des Lymphocytes CD4⁺ conventionnels.

Figure 5 : Le double jeu de NF- κ B dans l'immunité du cancer.

Figure 6 : Les Tconv pathogéniques promeuvent la neuro-inflammation dans l'EAE.

Figure 7 : Régulation des Tconv pathogénique dans l'EAE par la voie NF- κ B.

Figure 8 : Polarisation Th17 des Tconv naïfs control vs *RelA*-cKO vs *Rel*-cKO avec une stimulation alternative.

Figure 9 : Proportion de Tconv dans le microenvironnement tumoral. MC38 vs B16-OVA

Figure 10 : Surexpression de c-Rel dans les Tconv pour lutter contre le cancer.

Figure 11 : Séparation des tâches entre les sous-unités de NF- κ B.

Figure 12 : KO des gènes *REL* ou *RELA* par CRISPR dans des Lymphocytes CD4⁺ Tconv humains. Vérification de l'efficacité du KO par WB.

Liste des tables

Table 1 : Mutations des sous-unités de NF- κ B chez l'homme.

Table 2 : Modèles murins avec mutations germinale des sous-unités de NF- κ B.

Introduction
Bibliographique

1. Introduction aux Lymphocytes T

1.1. *La place des lymphocytes T conventionnels dans l'immunité*

Le système immunitaire (SI) est la structure qui permet de se défendre contre les agents pathogènes. De façon importante, les rôles du SI ne se limitent pas à la lutte contre les agents infectieux : les cellules immunitaires participent aussi à l'homéostasie des tissus, à la tolérance fœto-maternelle, ainsi qu'à la régulation de la transformation et de la progression tumorale. Le SI est séparé en deux grands modules interconnectés. L'immunité innée est rapide mais peu spécifique. Elle implique de nombreuses cellules effectrices et mécanismes moléculaires. A travers la maturation des cellules présentatrices d'antigène (CPA) (notamment les cellules dendritiques (DC)) et leur présentation d'antigènes, ainsi que la sécrétion de cytokines et chimiokines spécifiques, la réponse innée est indispensable à la mise en place d'une réponse dite « adaptative ». Cette réponse a pour particularités sa spécificité vis-à-vis du pathogène et la mise en place d'une mémoire immunologique. Elle fait intervenir deux grandes populations cellulaires, les lymphocytes T (LT) et les lymphocytes B (LB). Au cours de ma thèse, je me suis concentré sur l'étude des LT et je n'aborderai donc pas la fonction et le développement des LB. Les LT expriment à leur surface des récepteurs membranaires appelés récepteur à l'antigène des cellules T ou TCR (T Cell Receptor). Il existe une variété quasi infinie de TCR qui permet en théorie de reconnaître n'importe quel antigène, conférant aux LT leur grande spécificité. De plus, la variété des réponses T est due à l'existence d'une grande diversité de sous-populations de LT.

Lors de cette thèse, j'ai étudié la régulation et l'activation des LT CD (Cluster de différenciation) 4⁺ conventionnels (par opposition aux LT CD4⁺ régulateurs (FoxP3⁺)). Ces cellules peuvent aussi être appelées LT CD4⁺ auxiliaires (helper). Dans ce manuscrit je qualifierai ces cellules de "Tconv". Au-delà de leur fonction de lutte contre les pathogènes, les Tconv émergent de plus en plus comme des acteurs majeurs de la réponse anti-tumorale ; à l'inverse les Tconv peuvent être pathogènes et s'attaquer au soi dans le contexte de l'auto-immunité. Mon projet de thèse fut d'étudier la régulation des Tconv par les facteurs de transcription de la voie NF- κ B (Nuclear Factor of the κ -chain in B-cells), dans ces deux contextes.

1.2. *La différenciation des LT dans le thymus*

Le développement d'un lymphocyte T commence par la différenciation d'une cellule souche hématopoïétique (CSH) en un progéniteur lymphoïde commun (PLC) dans la moëlle osseuse (MO). Certains PLC vont alors entrer dans le thymus pour subir les prochaines étapes de maturation/sélection avant de devenir des lymphocytes T fonctionnels. Ce processus est présenté en Figure 1. Au départ les thymocytes n'expriment ni CD4 ni CD8 et sont qualifiées de thymocytes double négatifs (DN). Au fur et à mesure de leur progression dans le thymus, les progéniteurs de LT vont progressivement acquérir un programme transcriptionnel spécifique aux LT. En plus de cela, les enzymes RAG1 et RAG2 vont permettre le réarrangement des gènes du TCR par recombinaison somatique et in fine, ils vont chacun exprimer un TCR fonctionnel et unique. Les modèles de souris lymphopéniques RAG1^{-/-} et RAG2^{-/-} sont très utilisés en immunologie(1).

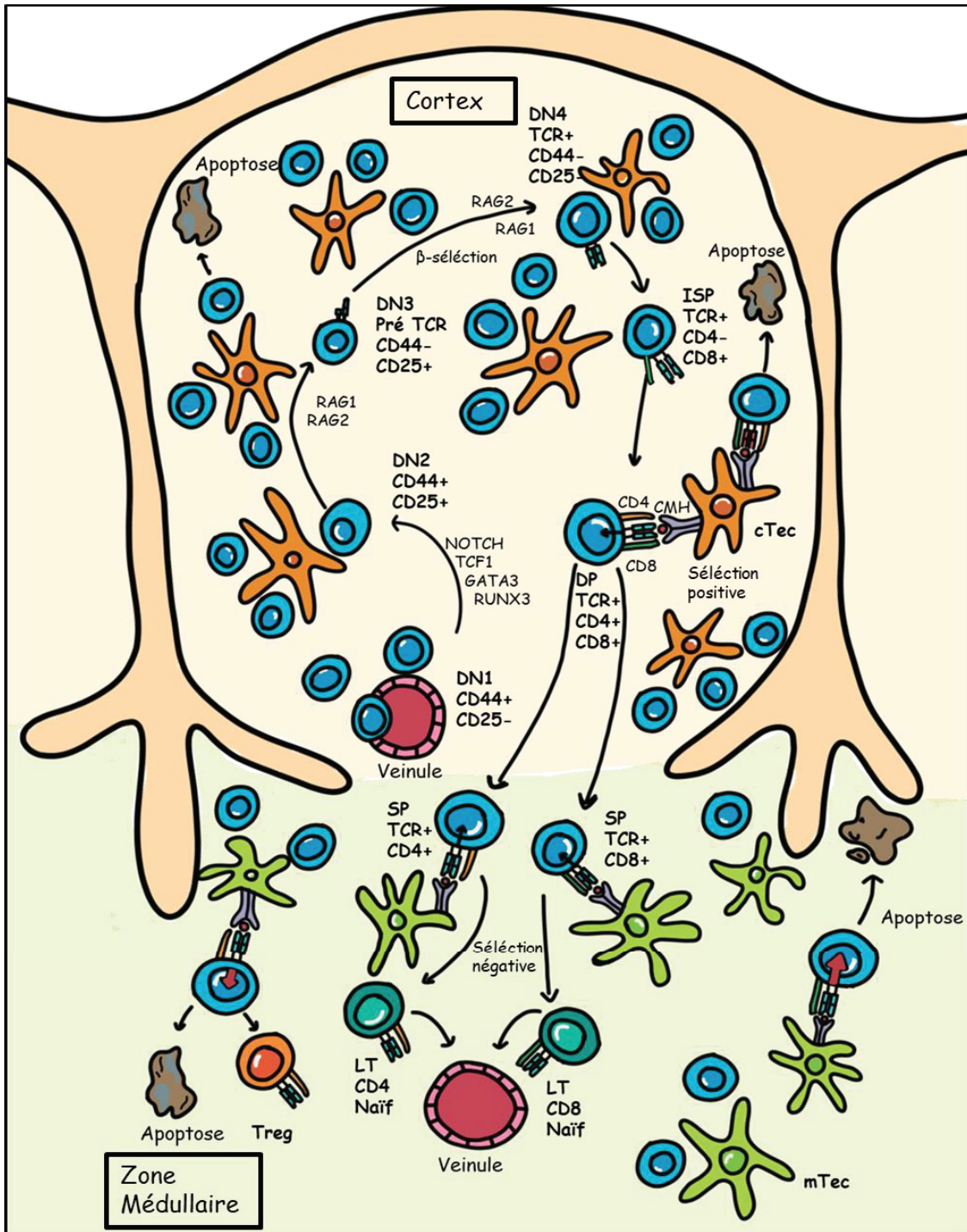


Figure 1: Développement thymique des lymphocytes T.

Les thymocytes entrent dans le thymus par les veinules. Leur maturation commence dans le cortex et est gouvernée par plusieurs facteurs de transcription. Les enzymes RAG1 et RAG2 contrôlent le réarrangement du TCR. Les thymocytes vont subir plusieurs étapes de sélection afin d'éliminer les thymocytes qui n'expriment pas de TCR fonctionnel: β -sélection et sélection positive. Dans la zone médullaire, les thymocytes subissent une dernière étape, la sélection négative afin d'éliminer les cellules exprimant des TCR auto réactifs. Enfin, les lymphocytes T émigrent dans la périphérie via les veinules. Double négatifs (DN); Double positifs (DP); Immature simple positif (ISP); cellule épithéliale thymique (Tec); Tec du cortex (cTec); Tec de la zone médullaire (mTec).

Les thymocytes vont subir trois étapes de sélection, la β -sélection, la sélection positive et la sélection négative afin d'éliminer les thymocytes qui n'expriment pas de TCR fonctionnels mais aussi ceux qui expriment un TCR qui reconnaît trop fortement des antigènes du soi (2–5). Les étapes de sélection positive et négative permettent l'établissement d'un répertoire TCR tolérant aux antigènes du soi et réactif aux antigènes étrangers(6). Suite à ces étapes de développement dans le thymus, les LT SP matures migrent dans la périphérie.

La voie NF- κ B a longtemps été considérée comme importante dans le développement des thymocytes(7,8). Les preuves que la signalisation NF- κ B est nécessaire au cours du développement des thymocytes SP proviennent en grande partie de perturbations de la formation du complexe IKK (Inhibitor of κ B (I κ B) Kinase) soit par délétion de NEMO (NF- κ B essential modulator)(9), soit par perte combinée des sous-unités IKK1 et IKK2(10), entraînant un arrêt du développement des thymocytes SP.

Cependant, une récente étude est venue contredire ce consensus en démontrant grâce à des souris transgéniques Knock-out (KO) pour les trois sous unités de la voie canonique que la survie et le développement des thymocytes est indépendante de NF- κ B. A la place, ils ont démontré que cela dépend de la voie RIPK1 - IKK - apoptose(10). Cette étude confirme que les modèles de souris que nous utilisons au laboratoire ne présentent pas de problèmes dans le développement des LT.

Après avoir subi la sélection thymique, les LT matures mais naïfs vont émigrer dans la circulation sanguine vers les organes lymphoïdes secondaires. Lorsque l'antigène spécifique d'un LT lui sera présenté par une CPA, les signaux reçus par le TCR, les récepteurs co-stimulateurs et les récepteurs à cytokines vont induire tout une variété de signalisations moléculaires qui vont permettre au LT de s'activer et exercer ses fonctions effectrices. Les différentes voies de signalisation moléculaires induites feront l'objet de la prochaine partie de cette introduction.

2. La régulation moléculaire des LT

2.1. Le complexe du TCR

Le complexe du TCR est constitué de deux chaînes hypervariables, α et β qui sont des membres de la superfamille des immunoglobulines (Ig), chargées de la reconnaissance des antigènes présentés

par les complexes du CMH. Associés à ces deux chaînes se trouvent des hétérodimères de CD3 ϵ / δ et CD3 γ / ϵ et un homodimère de chaînes ζ . Les domaines intracellulaires du complexe du TCR comportent 10 ITAMs (immunoreceptor tyrosine-based activation motif)(11–13).

2.2. *Les événements initiaux de la signalisation du TCR*

La reconnaissance d'un complexe CMH:Antigène par le TCR induit le recrutement et l'activation d'une série de kinases, ce qui aboutit en la production de diacylglycérol (DAG) et inositol-triPhosphate (IP3) par PLC γ (14). Le DAG reste lié à la membrane cellulaire et va servir à recruter diverses molécules de signalisation tandis que l'IP3 cytoplasmique va ouvrir les canaux calciques du réticulum endoplasmique et de la membrane cellulaire et donc augmenter le calcium intracellulaire. Ces deux messagers sont absolument critiques pour l'activation transcriptionnelle des LT. *In vitro*, il est courant de stimuler les cultures de LT avec de l'acétate de myristate de phorbol (PMA) et de la ionomycine pour induire leur activation et la sécrétion de cytokines. La PMA est en fait un analogue du DAG tandis que la ionomycine a des propriétés similaires à celle de l'IP3.

Suite à la production de DAG et d'IP3, la cascade de signalisation associé au TCR se sépare en trois voies de signalisation moléculaires qui vont activer divers facteurs de transcriptions : la voie NFAT, la voie des MAPK/AP-1 et la voie NF- κ B qui a fait l'objet de mes travaux de thèse.

2.3. *La voie de signalisation NF- κ B*

2.3.1. *Présentation et caractéristiques générales de la famille*

NF- κ B a été décrit pour la première fois en 1986 comme étant un facteur de transcription permettant l'expression de la chaîne κ des immunoglobulines dans les cellules B -d'où son nom(15,16). Depuis, NF- κ B et les voies de signalisation associées ont fait l'objet d'études extensives (120.000 occurrences sur Pubmed !) qui ont révélé leur implication dans de nombreux processus

biologiques. NF- κ B joue son rôle le plus important et le mieux conservé au cours de l'évolution dans le système immunitaire, en régulant l'expression de nombreux gènes effecteurs en réponse aux agents pathogènes. NF- κ B est une famille de 5 facteurs de transcription qui partagent tous un domaine RHD leur permettant de se lier à l'ADN et de former des homo- ou hétérodimères. A la fin du RHD se situe un NLS permettant la translocation des dimères (Figure 2). Les facteurs de transcription NF- κ B peuvent être séparés en 2 classes : RelA, c-Rel et RelB (respectivement codées par les gènes *Rela*, *Rel* et *Relb*) contiennent un domaine de transactivation (TAD) leur permettant de recruter la machinerie de transcription pour induire la transcription des gènes cibles. A l'inverse, les protéines NF- κ B1 (p105/p50, codée par *Nfkb1*) et NF- κ B2 (p100/p52, codé par *Nfkb2*) n'ont pas de TAD mais contiennent des séquences répétées d'ankyrines dans leur portion C-term, qui servent de domaines inhibiteurs (Figure 2). A l'état basal, ceci bloque leur translocation nucléaire. Suite à une stimulation, des phosphorylations en C-term vont permettre une dégradation par le protéasome (qui n'est que partielle grâce à des régions riches en glycine (GRR)), ce qui donne les formes actives p50 et p52 respectivement(17–19). N'ayant pas de TAD, les homodimères de p50 et p52 agissent comme répresseur de la transcription lorsqu'ils se lient à l'ADN(20).

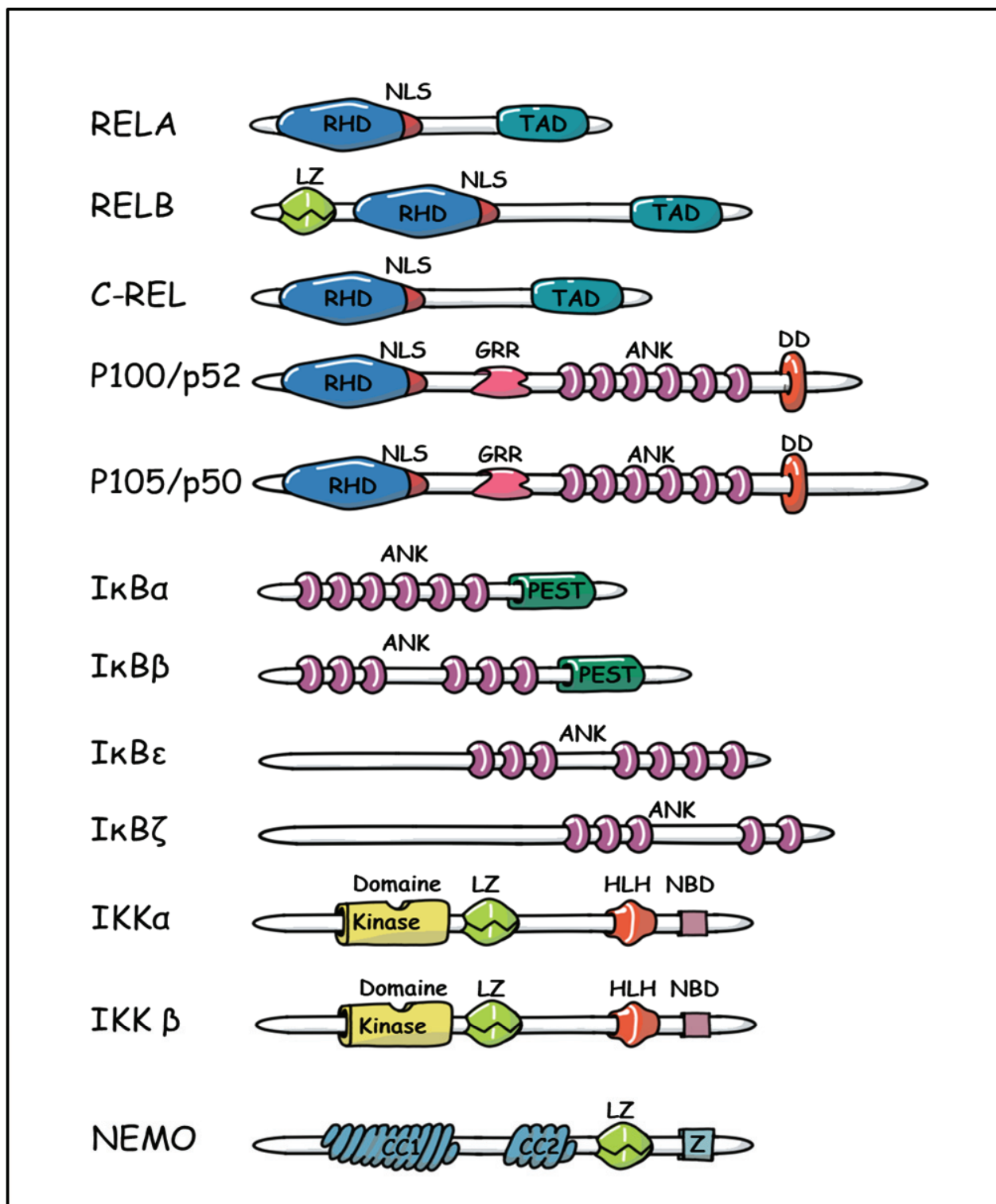


Figure 2: Structure biochimique des membres de la famille NF-κB

Domaine de transactivation (TAD); Séquence de localisation nucléaire (NLS); Domaine d'homologie de Rel (RHD); Glissière à leucine (LZ); Domaine de mort (DD); Séquences répétées ankyrine (ANK); Coiled-coil (CC); Région riche en glycine (GRR); Hélice-boucle-hélice (HLH); Domaine de liaison à NEMO (NBD); région riche en proline, acide glutamique, sérine et thréonine (PEST); doigt de zinc (Z).

En l'absence de stimulation, les facteurs de transcription sont séquestrés dans le cytoplasme par les protéines inhibitrices de la famille I κ B –ainsi que par p105 et p100-, grâce aux domaines ankyrine. La famille I κ B est constituée de six membres : I κ B α , I κ B β et I κ B ϵ sont les sous-unités dites typiques, alors que I κ B γ , I κ B ζ et Bcl-3 sont les sous-unités dites atypiques. La voie NF- κ B est historiquement séparée en deux sous-voies. En fonction du type de signaux reçus par la cellule, (TCR, Tumor Necrosis Factor (TNF)-Receptor superfamily (TNFRSF), ou cytokines), la voie canonique, qui conduit à l'activation de p50/RelA/c-Rel, et/ou la voie alternative qui culmine en la translocation de p52 et RelB, sont activées.

2.3.2. *Engagement de la voie canonique par le TCR et les récepteurs costimulateurs*

Comme vu précédemment, l'engagement du TCR et des récepteurs coactivateurs, notamment CD28, permet la production de DAG dans la membrane cellulaire des LT. La Protéine kinase C- θ (PKC- θ) est recrutée par le DAG. PKC- θ est le premier maillon de l'activation de la voie NF- κ B par le TCR (Figure 3). Une fois recrutée à la membrane, PKC θ est activée et phosphoryle CARMA1 (Caspase recruitment domain-containing membrane-associated guanylate kinase protein-1) (encodé par le gène *Card11*) qui va pouvoir se lier à Bcl (B-cell lymphoma) 10 et MALT1 (Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1) pour former le complexe CBM(21–23). MALT1 va alors recruter TRAF (TNF-receptor-associated factor) 6, une ligase ubiquitine E3. TRAF6 est généralement recruté avec LUBAC (Linear ubiquitin chain assembly complex). Ensemble, elles forment des chaînes de polyubiquitination K63 qui agissent comme des plateformes permettant le recrutement et l'ancrage de diverses molécules de signalisation. Les molécules adaptatrices TAB1 et 2 ainsi que la kinase TAK1 sont recrutées au niveau du complexe CBM par la chaîne polyubiquitination K63, ainsi que les trois protéines du complexe IKK(24). IKK α (codé par *Chuk*) et β (codé par *Ikkbb*) sont des kinases tandis que IKK γ (aussi appelé NEMO et codé par *Ikkkg*) n'a pas d'activité catalytique en elle-même, elle sert surtout de molécule d'assemblage et de maintien du complexe IKK. L'activation du complexe IKK requiert la phosphorylation d'au moins une des deux sous-unités kinase par la protéine TAK1. Une

fois phosphorylé et activé, IKK α et IKK β vont à leur tour phosphoryler les I κ B et p105. Cela induit l'ubiquitinylation K48 puis la dégradation de I κ B α par le protéasome 20S ainsi que le clivage de p105 en p50, permettant la translocation des sous-unités canoniques vers le noyau(25). La fonction principale des protéines IKK α , IKK β et NEMO est d'activer les sous-unités de NF- κ B. Néanmoins, elles ont chacune des fonctions indépendantes. NEMO par exemple peut interagir avec les MAPK, IRF3, IRF7 et HIF-2- α afin d'induire leur activité transcriptionnelle(26). Les substrats d'IKK α , et IKK β sont nombreux et impliqués dans des processus variés, en lien avec l'immunologie ou non. Il est aussi intéressant de souligner que p105, une des cinq sous-unités de NF- κ B, peut aussi se lier et inhiber des cibles indépendantes de NF- κ B comme par exemple des kinases de la voie MAPK(26,27). Ces fonctions indépendantes des différents modulateurs de NF- κ B compliquent fortement l'étude des fonctions de cette voie de signalisation.

Un certain nombre de TNFRSF permettent l'activation de NF- κ B (Figure 3). Dans cette famille on retrouve notamment les récepteurs TNFR1, TNFR2, OX40, CD40, RANK, GITR, 4-1BB ou LT β R, tous très importants dans la biologie des LT. L'engagement du récepteur au TNFR1 par le TNF- α induit le recrutement de TRADD au niveau de la queue cytoplasmique du récepteur. TRADD va alors recruter cIAP1, cIAP2, TRAF2 et RIPK1. Le complexe cIAP1/cIAP2/TRAF2 peut ainsi ubiquitinyler RIPK1 ce qui permet le recrutement de TAK1 et du complexe IKK via NEMO. TAK1 va alors phosphoryler le complexe IKK et donc activer les sous-unités canoniques de NF- κ B. La voie canonique de NF- κ B peut aussi être déclenchée, ou maintenue en complément des signaux TCR/CD28, par l'engagement de plusieurs membres des TNFRSF. Dans ce cas, l'activation du complexe IKK peut se produire par l'intermédiaire de TRAF2 et indépendamment du complexe CBM.

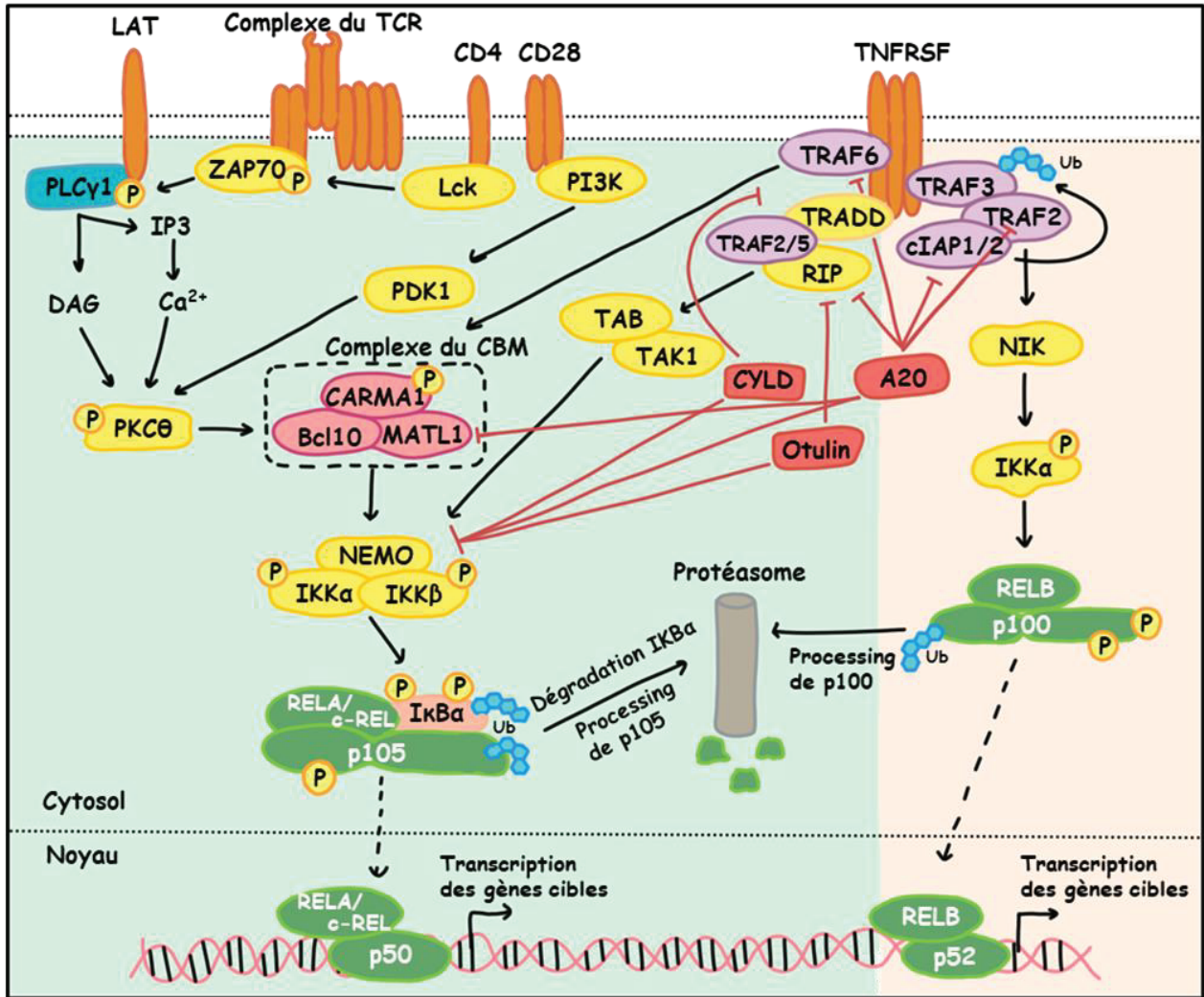


Figure 3: La signalisation NF- κ B dans les Lymphocytes T. Cette figure représente les voies les plus courantes impliquées dans l'activation de NF- κ B dans les Lymphocytes T. D'autres voies peuvent être déclenchées par l'engagement de récepteurs supplémentaires, par exemple les TLR. Il convient de noter qu'un certain nombre d'études mettent en évidence la formation d'hétérodimères combinant des sous-unités canoniques et alternatives; elles ne sont pas présentées ici car les mécanismes menant à leur formation ne sont pas clairement établis. Figure adaptée de Voisin *et al*, 2021

2.3.3. Engagement de NF- κ B par les cytokines

Plusieurs récepteurs de cytokines induisent aussi l'expression de la voie canonique de NF- κ B. Je vais brièvement décrire l'activation par la famille prototypique de récepteurs à l'IL-1. Ces récepteurs possèdent un domaine TIR (Toll- and IL-1R-like). Suite à l'engagement du récepteur par ses ligands, TIR va recruter la molécule Myd88 qui va à son tour recruter des kinases associées aux IL-1R(IRAKs), principalement IRAK1 et IRAK4 ainsi que TRAF6. Ce dernier va ubiquitinyler TAK1 qui va recruter et activer le complexe IKK, menant à l'activation de NF- κ B.

2.3.4. Engagement de la voie alternative par les TNFRSF

Les TNFRSF sont bien décrits pour leur capacité d'activation de la voie alternative. A l'état basal, la kinase NIK (NF- κ B-inducing kinase) qui va permettre d'activer la voie alternative de NF- κ B, est constitutivement produite et dégradée dans le cytosol par des complexes d'ubiquitine ligase. L'engagement des TNFRSF permet le recrutement du complexe ubiquitine ligase TRAF2/3/cIAP1/2 et sa dégradation. Cela assure la stabilisation et l'accumulation de NIK dans le cytoplasme des cellules. NIK ne requiert pas de signaux d'activation. Ainsi, à partir du moment où la protéine s'accumule dans le cytosol, elle va pouvoir phosphoryler des homodimères de IKK α pour induire leur activation. Ces derniers vont à leur tour phosphoryler p100 qui induit son clivage en p52. Ainsi libres, les dimères RelB-p52 de la voie alternative vont pouvoir entrer dans le noyau et se lier à leur gènes cibles(28).

2.3.5. Régulation de la transcription par NF- κ B

Il est maintenant connu que cette représentation simpliste de NF- κ B en deux voies, canonique et alternative est fautive. La preuve principale étant l'existence de dimères de sous-unités canoniques et alternatives. Sur les 15 dimères possibles, 12 sont supposés se lier fortement à l'élément κ B de

l'ADN, et 3 (RelB:RelB, RelB:RelA et RelB:cRel) forment des dimères de faible affinité qui se lient moins bien à l'ADN(29,30). Les séquences κ B sont très variées. Leur structure typique est la suivante: 5' GGGRNWYYCC 3' (N—n'importe qu'elle base; R—purine; W—adénine ou thymine; et Y—pyrimidine)(31). La transcription des gènes cibles est également régulée par des modifications post-traductionnelles (MPT) de NF- κ B. Celles-ci contrôlent la stabilité des dimères, leur dégradation, leur capacité à interagir avec différents coactivateurs de transcription et leur capacité transcriptionnelle. Par exemple, la phosphorylation de RelA par la protéine kinase A (PKA) est absolument cruciale pour l'activation de l'activité transcriptionnelle de NF- κ B(32,33). C'est pourquoi dans de nombreuses études, l'activité de la voie canonique de NF- κ B est mesurée par la phosphorylation (S536) de RelA. En plus de ça, de nombreuses autres modifications post traductionnelles ont été décrites.

Une étude par séquençage de chromatine immunoprécipitée (ChIP-seq) des 5 sous-unités de NF- κ B dans des lignées de lymphome B a aussi permis de confirmer l'interaction des deux voies, puisque différentes sous-unités sont capables de se lier aux mêmes sites dans la majorité des cas(34). Cette étude a renforcé la complexité de la liaison de NF- κ B à l'ADN. Les membres de NF- κ B se lient principalement à des promoteurs et des amplificateurs actifs de la transcription de l'ADN et très rarement à des exons, des éléments isolateurs ou des éléments répresseurs. Dans les LT, entre 50 et 80% des sites de liaison de RelA se trouvent dans une région promotrice(35). Les motifs des sites de liaison des différentes sous-unités sont très proches, par conséquent, beaucoup de gènes cibles peuvent être liés par les cinq sous-unités. Cependant, les motifs consensus de chaque sous-unité présentent quelques variations et spécificités(34). Beaucoup des séquences liées par des membres de NF- κ B sont aussi liées par d'autres facteurs de transcription tandis que certains semblent (à ce jour) spécifiques à NF- κ B. De façon surprenante, un tiers des séquences liées par des sous-unité de NF- κ B ne présentaient pas de sites de liaison κ B, ce qui suggère que NF- κ B peut être recruté comme cofacteur par d'autres facteurs de transcription(34). Cette étude est donc très informative sur les mécanismes réels de transcription par NF- κ B. Cependant, la lignée cellulaire utilisée est une lignée de lymphome avec une activation constitutive des deux voies de signalisation NF- κ B et donc une physiologie très différente des cellules primaires. Il serait informatif de répéter cette étude dans des LT primaires en comparant différentes conditions de stimulation.

En plus de la constitution des dimères et de leurs MPT, une hypothèse propose que la réponse transcriptionnelle induite par l'activation de NF- κ B dépend de l'amplitude et du schéma temporel de l'activité signalétique(36–39). Récemment l'équipe d'Alexander Hoffmann a généré une souris

rapporteur mVenus-RelA pour visualiser la dynamique de translocation de la protéine RelA dans le noyau. La stimulation de macrophages avec différents signaux (TNF α , LPS, CpG...) à différentes doses induit des dynamiques d'activation de RelA différentes. Ces dynamiques peuvent être décrites en fonction de six "codons de signalisation" : la vitesse d'activation, la durée, l'activité totale, le caractère précoce vs tardif, l'amplitude du pic du signal et enfin le caractère oscillatoire du signal(39). Ainsi, ces six caractéristiques dynamiques lient le noyau des cellules à la nature du stimulus et la réponse transcriptionnelle est adaptée en conséquence.

Afin de garder cette finesse dans la dynamique du signal, mais aussi pour éviter une suractivation potentiellement pathogénique, les voies de NF- κ B sont finement régulées. Les I κ B possèdent des sites de fixation κ B dans leurs gènes et sont parmi les premières cibles transcrites par NF- κ B. Après leur resynthèse, elles sont capables de se déplacer vers le noyau, de se lier aux dimères de NF- κ B afin de les ramener vers le cytosol. C'est la première boucle de rétrocontrôle. I κ B α est particulièrement importante pour ce processus(37).

Les trois I κ Bs typiques, I κ B α , I κ B β , et I κ B ϵ sont très similaires, cependant les différences temporelles de dégradation et de resynthèse leur permettent d'avoir des fonctions uniques(37).

Le gène *Tnfaip3*, codant pour la déubiquitineuse A20, est aussi une cible de NF- κ B (40). Mécanistiquement, A20 enlève les chaînes de polyubiquitination K63 servant d'échafaudages moléculaires entre les composants de NF- κ B. Elle cible spécifiquement NEMO, TRAF6, RIPK1 et MALT1. De plus A20 a aussi une activité d'ubiquitine ligase E3 qui lui permet d'ajouter des chaînes de polyubiquitination K48 sur RIPK1 afin de l'adresser au protéasome et induire sa dégradation(41). Plusieurs autres enzymes déubiquitineuses telles que CYLD et Otulin sont des régulateurs négatifs de NF- κ B(42).

Bcl3 est une protéine principalement nucléaire contenant un TAD. Elle peut être recrutée sur des promoteurs cibles NF- κ B, entraînant une activation ou une répression de la transcription en fonction de la composition des sous-unités des complexes NF- κ B(43).

2.3.6. Généralités sur les rôles de NF- κ B dans les LT

De nombreux patients présentent des mutations dans la voie NF- κ B(44). Ces patients souffrent souvent de syndromes auto-immuns associés à des immunodéficiences. L'étude des réponses immunitaires de ces patients ainsi que de modèles murins présentant des mutations germinales de la voie NF- κ B montre très clairement des défauts dans la fonction des lymphocytes T et parfois même des défauts de développement. Les études publiées sur des patients présentant des mutations des cinq sous-unités de NF- κ B ainsi que sur les souris correspondantes sont listées en table 1 et 2. Sont généralement retrouvés des défauts d'activation, de prolifération et/ou d'expression de cytokines par les LT.

Table 1 : Mutations des sous-unités de NF-κB chez l'homme

Gène muté	Mutation	Patients	Phénotype patients	Profil des LT	Référence article
<i>NFKB1</i>	Principalement hétérozygotes, 1 seul cas homozygote. Haploinsuffisance ; mutations faux-sens affectant p50 et p105 ou seulement p105	Plus de 200 à ce jour	Environ 30% des personnes identifiées avec NF-κB1 muté sont "sains". Le reste à CVID. Âge médian des symptômes 12 ans. Age moyen des décès 52 ans due à des infections ou cancer. Parmi les malades, Complications neurologiques (13,9%); cancer (16,8%); Lymphadénopathies 35,3%; Splénomégalie 48,5%; Infections Gastro	Baisse des CD4 mémoires, baisse des CD8 naïfs, répertoire TCR biaisé. Baisse du profil Th17 et augmentation du profil Th1. Mauvaise réponse des LT CD4 ⁺ à divers antigènes : baisse de la prolifération, baisse de production d'IL-2 et d'IFNγ en réponse à PHA et anti-CD3/CD28.	(45–50)

			<p>Intestinales 28,6%; Infections des voies respiratoires 83%; Infections cutanées 37,7%; Syndrome auto- immun 57,4% Infection EBV persistante, hépatite. Similarités avec la maladie de Behçet</p>		
<i>NFKB2</i>	<p>Mutations hétérozygotes. Principalement protéine p100 non clivables résultant en haploinsuffisance de p52 mais aussi quelques formes tronquées p52- like. 3 patients avec mutations gain de fonction</p>	<p>Plus de 50 à ce jour</p>	<p>Immunodéficie nces primaires (PID) dans 92% des patients. Les premiers symptômes sont précoces (âge médian : 4 ans) syndrome de DAVID (CVID + déficit ACTH), Infections principalement des voies urinaires,</p>	<p>Lymphoprolifération dans 32% des patients, lymphopénie dans 6%. Les Treg et Tfh sont systématiquement baissés. Les Th17 sont régulièrement baissés. Certains patients présentent une baisse de la prolifération en réponse à différents antigènes et mitogènes mais la</p>	(51–55)

			respiratoires et de la peau. 80% des patients présentent des symptômes auto-immuns (surtout Trachyonychie et alopecie). 8% des patients présentent des cancers. Infections EBV et CMV persistantes	plupart des patients ont des LT qui répondent bien à la PHA	
<i>RELA</i>	Mutations hétérozygotes. Diminution de la protéine de 50% ou suppression de l'activité transcriptionnelle	13 patients à ce jour	Neuromyéélite optique/syndrome ulcératif muco-cutané (Maladie de Behçet); Iléites aiguës, ulcères et lésions muco-cutanées; syndrome lymphoprolifératif auto-immun et Lupus érythémateux systémique	Documenté dans une seule étude avec 1 patient (syndrome lymphoprolifératif auto-immun): Augmentation des Tconv dans le LCR; Dans le sang: augmentation des LT double négatifs; augmentation des LT, augmentation des Tconv activés; augmentation du profil Th1 (CXCR3+/CCR6-). In vitro:	(56–59)

				Augmentation de la production d'IFN γ et baisse de l'IL-2 par les CD4 naïfs. baisse de la différenciation Treg	
<i>REL</i>	Mutations homozygotes. Baisse de l'activité transcriptionnelle ou perte totale de l'expression de la protéine.	4 patients à ce jour	CID avec infections multiples et récurrentes (Mycobacterium tuberculosis, Salmonella, Cryptosporidium, cytomegalovirus, candidoses, herpes, enterovirus. 2 patients avec lymphome B	Profil des LT analysés uniquement sur patients CID, pas sur patients lymphome. Nombre de LT circulants normaux ou augmentés. Pas de Treg, baisse des CD4+ mémoires. Baisse des profils Th1 et Th1*; Th2 et Th17 circulants. Baisse de la prolifération des LT due à une diminution de l'expression d'IL-2. Les CD4 naïfs expriment TBX21 et RORC en conditions de polarisation Th1 et Th17 mais pas les cytokines IFN γ , IL-17A, IL-17F. Les CD4 mémoires produisent peu	(60–62)

				d'IFN γ , de TNF- α , d'IL-4, IL-5, IL-13, IL-17A, IL-17F, IL-22 et IL-2. Il est important de noter une forte baisse d'expression d'IL-12 par les cellules myéloïdes.	
<i>RELB</i>	Mutation non-sens C1191A. Absence de la protéine RELB	3 patients à ce jour	SCID Infections récurrentes, maladie auto-immune de la peau, arthrite rhumatoïde	Nombre élevé de LT circulants. Nombre élevé de CD4+ mémoire (CD45RO+) et faible de CD4 naïfs (CD45RA+). Les LT répondent mal à la PHA (faible production d'IFN γ et IL-2) mais bien à antiCD3/CD28. Ajout d'IL-2 restaure la production d'IFN γ	(63)

Table 2: Modèles murins avec mutations germinale des sous-unités de NF- κ B

Gène muté	Léthal ?	Phénotype	Profil des LT	Référence article

<i>Nfkb1</i> ^{-/-}	Non	Défauts immunitaires multifocaux, susceptibilité accrue à plusieurs infections bactériennes	Défaut de réponse Th1/Th2 <i>in vivo</i>	(64–67)
<i>Nfkb1</i> ^{ACT/ΔC} <i>T</i>	Non	Splénomégalie, lymphadénopathie, infiltration lymphoïde dans divers organes.	Baisse de la prolifération et de l'expression de cytokines inflammatoires (IFN γ , IL-2, GM-CSF, IL-4)	(68)
<i>Nfkb2</i> ^{-/-}	Non	Défaut de développement des organes lymphoïdes secondaires	Baisse d'expression de l'IFN γ en réponse à <i>T. gondii</i>	(69–72)
<i>Nfkb2</i> ^{ACT/ΔC} <i>T</i>	Non	Hyperplasie de l'estomac, atrophie de la rate et du thymus, lymphadénopathie, infiltration lymphoïde dans divers organes.	Augmentation de la prolifération et de l'expression de cytokines inflammatoires (IL-10, IL-2, GM-CSF, IL-4)	(73)
<i>Rela</i> ^{-/-}	Oui (E15)	Mort induite par TNF, dans hépatocytes, macrophages et fibroblastes		(74–79)
<i>Rel</i> ^{-/-}	Non	Souris saines.	Défaut des LT CD4 ⁺ et CD8 ⁺ . Défaut de la réponse Th1 à <i>T. gondii in vivo</i> . <i>In vitro</i> , baisse de la prolifération, baisse d'expression de l'IFN γ , de l'IL-2 et du GM-CSF	(80–86)

<i>Relb</i> ^{-/-}	Oui > 6 semaines	Syndrome inflammatoire multiple + hématoïèse anormale. Splénomégalie et défaut de l'architecture thymique	LT inflammatoires/cytotoxiques infiltrent les organes non lymphoïdes. Défaut de réponse à l'infection par <i>T. gondii</i> .	(87–89)

Le fait que ces mutations se produisent dans la lignée germinale empêche l'étude des fonctions intrinsèques de NF- κ B dans les LT. Nous allons voir dans la suite de l'introduction que différents modèles humains et murins ont été développés afin de comprendre la régulation des LT. Au cours de ma thèse, j'ai utilisé des modèles transgéniques de délétion conditionnelle de NF- κ B dans les Tconv murins et un protocole de CRISPR/Cas9 dans les Tconv humains pour comprendre la régulation moléculaire des Tconv à l'état basal, dans un contexte auto immunitaire et lors de la réponse anti tumorale.

3. Sous-types de LT : généralités et fonctions connues de NF- κ B

Dans la périphérie, il existe plusieurs populations de LT. Les trois principales, en nombre mais aussi en fonction, sont les LT CD8⁺ ; les CD4⁺ Tconv et les Treg. Il existe d'autres populations de LT dites non conventionnelles mais je n'en parlerai pas dans ce manuscrit.

3.1. *Les LT CD8*

Les LT CD8 expriment un TCR reconnaissant les antigènes présentés par les molécules du complexe CMH de classe I. Comme pour toutes les cellules du SI, les LT CD8 peuvent être divisés en différentes sous-populations ayant des spécificités fonctionnelles. Cependant, la fonction la mieux établie de ces cellules est la cytotoxicité. Les LT CD8 exercent leurs fonctions par relargage de molécules cytotoxiques tels que le granzyme B (GzmB) et la perforine ainsi qu'en produisant de grandes quantités de cytokines comme l'Interféron (IFN) γ et le TNF- α . Une fois l'infection résolue, la plupart des LT CD8 meurent par apoptose tandis qu'un sous-ensemble persiste en tant que cellules mémoire, prêtes à retrouver une fonction effectrice si leur antigène cible se représente. A cette voie classique, il faut ajouter une autre voie de différenciation dont nous parlerons régulièrement dans ce manuscrit : l'épuisement. Il semble en effet que certains LT CD8, suite à leur activation initiale, s'engagent dans un programme conduisant à une perte de leur fonction. Dans le cas des infections chroniques et du cancer, des Tnaïfs peuvent ainsi transiter vers un état

dit « T_{pex} » de progéniteur épuisé, puis de « T_{ex} » épuisés. Ces derniers sont caractérisés par leur forte expression des facteurs de transcription TOX, NR4A ou NFAT, permettant l'expression de molécules de surfaces inhibitrices comme Programmed Death 1 (PD-1), (T-cell immunoglobulin and mucin containing protein-3) TIM-3 ou cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4) et la répression des gènes « effecteurs ». En plus de ça, les T_{ex} ont une empreinte épigénétique caractéristique. Ces cellules font l'objet d'un intérêt majeur en immunothérapie ces 10 dernières années. Les études portant sur les T_{conv} épuisés sont beaucoup moins nombreuses mais leur existence à toutefois était avérée(90–95).

Au-delà de l'implication des facteurs de transcription RUNX3, T-BET, EOMES, BLIMP1, et IRF4(96,97), de nombreuses études montrent clairement que la survie, la prolifération ainsi que les fonctions effectrices des LT CD8 sont sous le contrôle de la voie NF- κ B via la signalisation TCR-CBM(98). *In vitro* les LT CD8 naïfs murins *Pkc θ ^{-/-}* et *Bcl10^{-/-}* ont un défaut d'expression d'IL-2, CD44, CD25 et Bcl-xL. Ils ont aussi des défauts de survie et de prolifération, qui peuvent être corrigés en ajoutant de l'IL-2 exogène dans les cultures(99–102). Les LT CD8 naïfs murins *Pkc θ ^{-/-}* et *Bcl10^{-/-}* exprimant un TCR transgénique et stimulés avec leur antigène spécifiques ont aussi un défaut de cytotoxicité(101,102). Les LT CD8 *Malt1^{-/-}* ne partagent pas ces défauts(99). Chez l'homme, les LT CD8 isolés de patients avec des mutations de BCL10 présentent une baisse de la prolifération et une absence totale de LT CD8 mémoire central (TCM)(103) tandis que les LT CD8 isolés de patients mutés pour *Card11* ne prolifèrent pas du tout(104). Surprenamment la phosphorylation de I κ B α ainsi que la translocation nucléaire de RelA sont partiellement maintenus dans les LT CD8 PKC θ /CBM KO. Il se peut donc que ces effets soient indépendants de NF- κ B. L'inhibition d'IKK β dans des CD8 murins n'altère pas la survie et la prolifération des cellules *in vitro*(105,105,106) contrairement à l'expression du super répresseur I κ B-SR(107,108). Il est aussi probable que dans le cas des LT CD8⁺, il existe des phénomènes de compensation entre les différentes protéines IKK. La délétion de NF- κ B1 dans les LT CD8⁺ murins n'affecte pas la prolifération et la fonction des cellules(100,101). Chez l'homme, une première étude montre des résultats similaires(50) tandis que dans une seconde étude les patients présentent une proportion accrue de LT CD8⁺ effecteurs mémoires (TEM) avec des défauts de prolifération *in vitro*(109). A contrario, c-Rel et RelA semblent contrôler de nombreux aspects de la biologie des LT CD8. Il a été montré que les LT CD8 anergiques présentent une diminution de la phosphorylation et de l'acétylation de RelA(110). De fait, RelA est important pour la survie et la prolifération des CD8(111,112) ainsi que l'expression d'EOMES et de l'IFN γ (113,114). Des chercheurs ont

récemment développé une plateforme de screening qui combine des criblages par CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) activateurs et inhibiteurs, afin d'identifier les réseaux moléculaires qui contrôlent la production d'IFN γ dans les CD8 humains. Cette plateforme leur a permis d'identifier l'axe TNFRSF/IL1R1 - CBM/TRAF6/TAK1 - Complexe I κ B - RelA comme un nexus majeur de l'expression de d'IFN γ (115). Les LT CD8 Rel $^{-/-}$ ont un défaut de prolifération qui peut être compensée par l'ajout d'IL-2(100), ce qui rappelle des LT CD8 naïfs murins PKC $\theta^{-/-}$ et Bcl10 $^{-/-}$. Chez les patients avec des mutations perte de fonction de *REL*, les CD8 produisent très peu d'IFN γ (60,62). Concernant la voie alternative, peu d'études ont été menées. Les souris avec une délétion conditionnelle de NIK dans les LT ont une baisse des LT CD8 mémoires de la rate(116) et une baisse de la fonctionnalité des CD8 mémoires pour les cellules de patients avec des mutations de NIK(117).

La co-stimulation de LT CD8 via les récepteurs 4-1BB et OX40 induit la phosphorylation continue de I κ B α et une forte activation de NF- κ B. Les LT CD8 $^{+}$ présentent alors une meilleure survie ainsi qu'une prolifération et des capacités cytotoxiques accrues(118–120). Dans une récente étude, les auteurs ont identifié le récepteur LT β R comme puissant activateur des LT humains. Cependant, cette protéine, très présente sur les cellules myéloïdes, n'est presque pas exprimée par les LT. Les auteurs ont alors créé des LT CD8 surexprimant LT β R. Ils ont montré que l'axe LT β R - NF- κ B canonique permet de booster la sécrétion d'IL-2 et de réduire l'apoptose et l'épuisement des cellules(121). Ces études montrent que l'on peut manipuler la voie NF- κ B pour améliorer les capacités des LT. Toutefois, il est nécessaire que les niveaux d'activation de NF- κ B soient finement régulés : en effet l'expression d'un transgène IKK β CA dans les LT, conduisant à l'activation chronique de la voie canonique, induit leur apoptose et diminue leur expression de cytokines tout en augmentant l'expression de PD-1, ce qui semble correspondre à un état d'épuisement(122).

3.2. Les Treg

Les Treg sont des LT CD4 caractérisés par leur expression constitutive du facteur de transcription FoxP3 et de CD25, la chaîne α du récepteur à l'IL-2. Ils représentent entre 5 et 20% du pool de LT CD4 $^{+}$. Ils ont un rôle immunosuppresseur afin de maintenir la tolérance dans les tissus et de prévenir les maladies inflammatoires/auto-immunes(123).

Les Treg peuvent se développer directement dans le thymus, on parle de Treg thymique (tTreg) mais ils peuvent aussi être issus de Tconv qui dans la périphérie vont exprimer FoxP3 et acquérir des propriétés suppressives. On parle alors de Treg de la périphérie (pTreg)(124).

Les souris avec une délétion germinale de FoxP3 n'ont aucun Treg et présentent un phénotype bien particulier appelé "Scurfy", caractérisé par un syndrome auto-immun multifocal et léthal 3 semaines après la naissance(125). Les patients présentant le syndrome IPEX (Immunodysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X-linked) ont un phénotype auto-immun proche de celui des souris Scurfy, dû à des mutations dans le gène *FOXP3*(126). Comme nous le verrons plus tard dans cette introduction, la sclérose en plaques (SEP) est une maladie auto-immune du système nerveux central (SNC). Une dérégulation des Treg a été rapportée chez les patients atteints de SEP(127). Cette observation a été confirmée chez la souris(128). Les Treg agissent directement dans le SNC et peuvent inhiber les lymphocytes Tconv pathogéniques(129).

La fonction suppressive des Treg repose sur de nombreux mécanismes moléculaires(130). Brièvement, les Treg peuvent sécréter des cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10 et l'IL-35 et activer le TGF- β latent. Les Treg entrent aussi en compétition avec les autres LT pour la consommation de l'IL-2, présent en quantité limitée dans le milieu extracellulaire. L'immunosuppression peut aussi être médiée par l'expression membranaire de protéines inhibitrices comme CTLA-4, PD-L1 (ligand 1 de PD-) ou LAG3 (Lymphocyte-activation gene 3). Enfin, les Treg peuvent directement tuer les autres cellules immunitaires en produisant du GzmB. De nombreuses études montrent un rôle absolument crucial des différentes sous-unités de NF- κ B dans le développement, l'activation et la fonction des Treg. Les facteurs de transcription RelA et c-Rel sont cruciaux pour le développement des tTreg et l'expression de FoxP3 tandis que NF- κ B1, NF- κ B2 et RelB sont inutiles(35,131–134). A l'inverse aucune sous-unité individuelle ne semble absolument requise pour le développement des pTreg ou la polarisation des Treg *in vitro* (iTreg). Toutefois la co-ablation de c-Rel et RelA inhibe totalement la différenciation pTreg(35).

En plus des Treg, d'autres populations de LT CD4⁺ régulatrices ont été identifiées. Par exemple, certains LT CD4⁺ sont polarisés dans la périphérie en Tr1. Ces cellules n'expriment pas FoxP3(135) mais produisent de grandes quantités d'IL-10(136,137), une cytokine hautement immunosuppressive, ce qui leur permet de maintenir la tolérance périphérique. Des défauts dans la population Tr1 sont notamment retrouvés chez les patients atteints de SEP(138,139).

Dans les Treg matures, l'activation de la voie TCR - CBM - NF- κ B est absolument critique aux fonctions suppressives des Treg et au maintien de la tolérance chez les mammifères(35,106,140–142). Les rôles spécifiques des sous-unités de NF- κ B dans la biologie des Treg matures, ont récemment été mis en lumière.

L'utilisation de souris FoxP3-Cre permet d'explorer les fonctions d'un gène directement dans les Treg matures. La délétion de c-Rel induit un phénotype inflammatoire tardif et peu sévère tandis que celle de RelA mène à un syndrome auto-immun léthal à partir de 8 semaines. L'ablation des deux sous unités confère aux souris un phénotype "Scurfy" les menant à la mort en moins de trois semaines. Ainsi c-Rel et RelA jouent tous deux des rôles importants, et partiellement redondants, dans la fonction des Tregs à l'état basal. Cependant RelA a un rôle plus fort dans le maintien de l'identité des Treg et de leur fonction suppressive(35,143). A l'inverse, c-Rel est crucial pour la fonction des Treg activés (aTreg) au sein de la tumeur, alors que RelA ne semble pas participer. En conséquence, les souris FoxP3-Cre *Rel^{flox/flox}* ont une pousse tumorale fortement diminuée dans des modèles de mélanomes transplantés. De même, l'administration de Pentoxifyline, d'IT-603 ou de R96A, des inhibiteurs de c-Rel, permettent de retarder la croissance tumorale en altérant l'immunosuppression médiée par les aTreg, et de potentialiser les effets de l'immunothérapie anti-PD-1(144,145). Concernant la voie alternative, l'inhibition conditionnelle de RelB dans les Treg ne semble pas avoir d'effet. Par contre l'inhibition de NF- κ B2 induit une augmentation du pool de Treg mais une perte de leur capacité suppressive et un syndrome auto-immun non léthal. L'inhibition des deux sous-unités à la fois ainsi que l'analyse du transcriptome des Treg *Relb^{-/-}; Nfkb2^{-/-}* et *Relb^{-/-} Nfkb2^{-/-}* Double KO a permis de montrer que RelB inhibe la fonction des Treg et induit l'expression de molécules inflammatoires telles que l'IL-17a, l'IL-21, Chemokine (C-C motif) receptor- (CCR)6 et RORc. Par conséquent NF- κ B2 est un régulateur négatif de RelB et donc un gardien de la fonction homéostatique des Treg(134).

Ce sont sur ces études que se base mon projet de thèse qui est d'explorer la fonction spécifique des sous-unités de NF- κ B dans la biologie des Tconv.

3.3. Les Tconv

Les Tconv sont capables de reconnaître les antigènes présentés par des APC via les complexes du CMH de classe II. Ces cellules sont aussi qualifiées de “Thelper” car leur fonction principale n’est pas d’attaquer directement les différents pathogènes comme c’est le cas pour les LT CD8, mais plutôt d’induire, d’orienter et de soutenir la réponse immunitaire. Toutefois un certain nombre d’études a été publié ces dernières années concernant des populations de Tconv cytotoxiques dans divers contextes inflammatoires. Ces Tconv cytotoxiques ont notamment été décrites dans des contextes d’auto immunité et d’immunité anti tumorale comme nous le verrons dans la suite de cette thèse.

Les Tconv sont traditionnellement séparés en plusieurs sous populations en fonction des cytokines produites. Cette distinction a été faite pour la première fois par Mosmann, Coffman et leurs collègues en 1986. Ils ont démontré que les Tconv peuvent être polarisés pour produire soit de l’IFN γ soit de l’IL-4 en fonction des conditions de culture et que ces profils de sécrétion distincts pouvaient être liés à leur fonctionnalité(146). Ils ont appelé ces deux sous-populations Thelper (Th)1 et Th2. Depuis, les sous populations de Th décrites se sont multipliées. Elles sont distinguées en fonction de leur profils cytokiniques et de l’expression de facteurs de transcription principaux(147–149). Décrites *in vivo*, ces cellules peuvent être polarisées *in vitro*(146,150) (Figure 4). Afin de représenter au mieux la réalité biologiques derrière ces sous populations, de plus en plus de sous-sous populations de Tconv sont décrites mais cela complique le tableau et ne permet quand même pas d’expliquer l’immense diversité des cellules observées. Avec l’utilisation des séquençages ARN à l’échelle de la cellule unique (sc-RNAseq), il devient de plus en plus évident que les Tconv ne sont pas différentes populations distinctes mais plutôt un continuum, surtout *in vivo*(151–155). Par exemple, une analyse de sc-RNAseq sur des Tconv isolés de la lamina propria n’arrivait pas à définir des sous populations classiques de Th1 et Th17 mais plutôt des cellules exprimant un continuum de cytokines signatures(153). De fait, l’identification d’une population de Tconv exprimant une certaine cytokine ou un facteur de transcription donné ne devrait plus automatiquement conduire à la définition d’une nouvelle sous-population. La fonctionnalité de ces cellules doit absolument être prise en compte. Deux revues récentes se sont intéressées à la question. L’équipe de Christophe Benoist propose un modèle d’étude de Tconv sous forme de nuage de population(156) tandis que l’équipe de Burkhard Becher veut associer les différents Th à leur fonction dans l’immunité avec trois grandes catégories(157) :

Les cellules TH de type 1 - activent et attirent principalement les phagocytes mononucléaires tels que les monocytes, les macrophages et les DCs.

Les cellules TH de type 2 - ciblent les cellules B et les granulocytes polymorphonucléaire tels que les mastocytes, les basophiles et les éosinophiles.

Les cellules TH de type 3 - agissent sur les cellules non hématopoïétiques au niveau des tissus barrière, notamment les cellules épithéliales et les cellules stromales.

Ces propositions étant récentes, les études sur le rôle de NF- κ B dans la polarisation, la maintenance et la fonction des Tconv ont été faites selon le consensus classique des sous-populations de Th. C'est ce que je vais présenter dans la partie suivante.

Comme pour les LT CD8⁺ et les Treg, NF- κ B est important pour la biologie des Tconv. La délétion des protéines PKC θ , Bcl10, ou MALT1 dans des Tconv murins empêche la phosphorylation de I κ B α suite à l'engagement du TCR et donc l'activation de NF- κ B. Ces cellules présentent un défaut de prolifération, de survie et de production de l'IL-2(99,100). Surprenamment, l'ajout d'IL-2 exogène ne restaure pas la prolifération de ces cellules *in vitro*.

Comme nous allons le voir, beaucoup d'études ont été faites sur le rôle des voies NF- κ B dans les différentes sous-populations de Tconv.

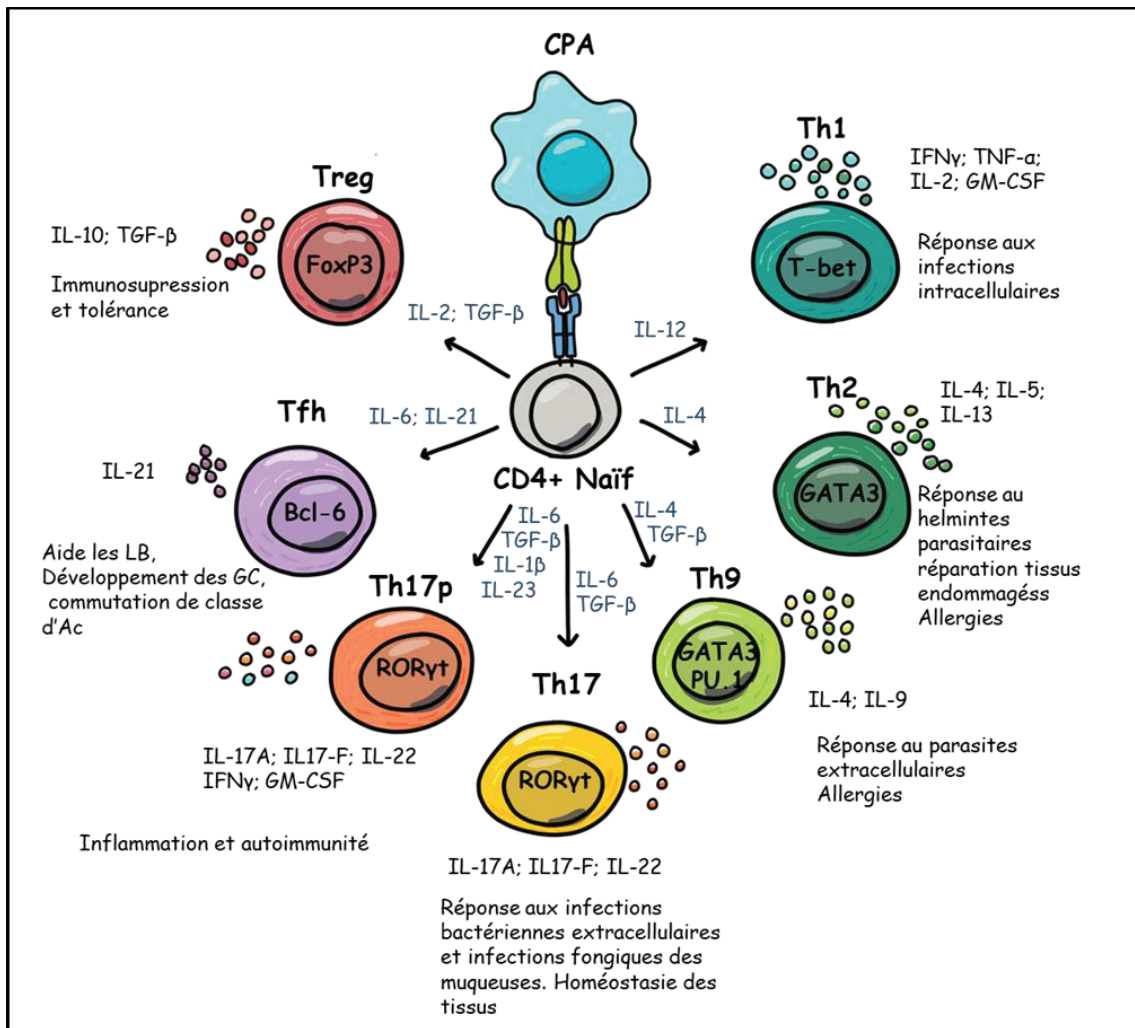


Figure 4: Polarisation des Lymphocytes CD4⁺ conventionnels.

Cette figure représente la polarisation des Tconv en différentes sous-populations de Thelper. Les cytokines qui induisent la polarisation sont écrites en bleu.

3.4. *La polarisation en Thelper*

3.4.1. **Th1**

Lors d'une infection par un pathogène intracellulaire, les CD4 naïfs sont activés dans les ganglions drainants par des DC. Les CD4 naïfs sont alors polarisés en Th1 effecteurs qui migrent vers les tissus infectés. Les Th1 sont caractérisés par l'expression du facteur de transcription T-BET; codé par le gène *Tbx21*, (147) et une production massive d'IFN γ . Les Th1 produisent d'autres cytokines, principalement du TNF- α , de l'IL-2 et du GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor). La fonction des Th1 est de recruter et activer des cellules myéloïdes phagocytaires et ainsi induire une immunité de type 1. Ces cellules sont critiques dans l'immunité antitumorale. La polarisation vers le phénotype Th1 est dirigée par la signalisation IFN γ - STAT1 en parallèle de l'engagement du TCR. Cela induit l'expression de T-BET qui lui-même induit l'expression du récepteur à l'IL-12 (IL-12R) à la surface des cellules. La stimulation de l'IL-12R active la voie STAT4 et permet une expression soutenue de l'IFN γ . Le paysage épigénétique des Tconv Th1 est fortement modifié, induisant une stabilité du profil Th1(158,159). Beaucoup d'études portent sur les fonctions de NF- κ B dans la biologie des Th1. L'étude de souris exprimant une forme dominante négative de I κ B α dans les LT (I κ B α -(Δ N)-Tg) suggère que la voie canonique de NF- κ B est nécessaire à l'expression de l'IFN γ *in vivo*(160). Cette observation a par la suite été confirmée *in vitro* avec des Tconv isolés de souris I κ B α -(Δ N)-Tg mais aussi en utilisant un inhibiteur de IKK(161). Cependant, des études sur PKC θ , CARMA1 et MALT1 semblent indiquer que cette fonction de NF- κ B dans les Th1 est indépendante de la signalisation PKC θ /CBM(162,163). De même, l'ablation de IKK β n'impacte pas la différenciation en Th1 *in vitro*(105).

Des études sur des souris CD4-cre *Rela*^{fl/fl} ont permis de démontrer que l'expression de RelA dans les LT est requise pour la production d'IFN γ par des Th1 *in vitro*. RelA se lie à des CNS (conserved non-coding sequences) du gène de l'IFN γ . Cette ligation est directement permise par T-BET et STAT4(114,164,165). Cependant une étude utilisant des souris lck-cre *Rela*^{fl/fl} infectées par le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) montre une production égale d'IFN γ par les Tconv dans les rates des souris témoins et mutantes(166). Le rôle de c-Rel dans la production d'IFN γ par les Tconv est également débattu. Une première étude de 2002 a montré que les CD4 isolés de souris *Rel*^{-/-} étaient incapables de produire de l'IFN γ et de l'IL-2 dans des conditions Th1 *in vitro*(84). Par

la suite, d'autres études ont présenté des résultats similaires et opposés(167–170). Un patient porteur d'une mutation non sense de *REL* a été identifié. *In vitro*, les Tconv de ce patient prolifèrent peu et n'expriment pas d'IL-2 et d'IFN γ malgré une induction normale du gène *Tbx21*. L'ajout d'IL-2 exogène dans le surnageant de culture permet de restaurer partiellement la prolifération des cellules mais pas l'expression de l'IFN γ (60). Un autre patient porteur d'une mutation non sense de *REL* présente une absence totale de sécrétion d'IFN γ par les LT(62). Bien entendu, ces mutations interviennent dans la lignée germinale et le rôle intrinsèque de c-Rel dans les Th1 n'est donc pas établi. En ce sens, les données que j'ai obtenues pendant ma thèse fournissent un éclairage nouveau à cette régulation. c-Rel et RelA sont tous deux capables de se lier au promoteur de l'IL-2 et d'induire son expression(171,172).

Globalement, RelA semble requis pour la polarisation Th1 mais pas c-Rel ni NF- κ B1. Deux hypothèses semblent se dessiner pour expliquer cela, soit ce sont des homodimères de RelA qui se fixent sur le locus de l'IFN γ , soit c-Rel et NF- κ B1 ont des rôles totalement redondants. Afin de répondre à cette question, il faudrait étudier la polarisation des Th1 dans des Tconv *Rel Nfkb1* double KO et faire des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) de ces deux facteurs de transcription au niveau du locus de l'IFN γ . Les études sur la fonction de la voie alternative de NF- κ B sont plus rares. RelB semble important pour l'expression de l'IFN γ et de Tbet par les LT(114,169) tandis que les LT *Map3k14^{-/-}* (déficients pour NIK) et *Nfkb2^{-/-}* ne présentent pas de défauts Th1(173,174).

3.4.2. Th2

Le phénotype Th2 correspond à l'expression de diverses cytokines comme l'IL-4, l'IL-5, l'IL-9 et l'IL-13. Ces réponses sont essentielles pour protéger l'hôte contre les infections par des helminthes parasites et pour stimuler la réparation des tissus endommagés(175). De plus, les Th2 semblent également à l'origine de réponses inflammatoires inappropriées comme l'allergie et l'asthme. Les Th2 agissent sur la prolifération des lymphocytes B et la commutation de classe des Ig en IgE. Elles induisent aussi l'activation des éosinophiles et mastocytes ainsi que la polarisation des macrophages vers un phénotype de type M2. La polarisation des Th2 est induite par l'IL-4 qui active STAT6 et mène à l'expression de GATA3(176), le facteur de transcription caractéristique des Th2(148,149). GATA3 va alors induire la transcription des cytokines Th2.

Plusieurs études *in vivo* montrent que l'axe PKC θ -CBM est requis pour la réponse Th2 aux helminthes ainsi que l'inflammation des voies respiratoires induites par administration d'ovalbumine (OVA) (un modèle animal de l'asthme)(162,177,178). Les Tconv présentent une baisse des cytokines Th2 et de l'expression de GATA3. Ce rôle du CBM semble être intrinsèque aux Th2(177). Il est intéressant de noter que chez les souris portant une délétion conditionnelle de CARMA1 dans les cellules T activées (modèle OX40-Cre) les réponses allergiques et la production de l'IL-4 sont maintenues. Cela suggère un rôle de l'axe CBM/NF- κ B pendant les étapes initiales de l'activation, mais pas dans les phases ultérieures(179). Une première étude sur l'inflammation induite par OVA dans des souris exprimant une forme dominante négative de I κ B α dans les LT semblait indiquer une absence de fonction de la voie canonique de NF- κ B dans les Th2(160). Cependant, les souris *Rel*^{-/-} et *Nfkb1*^{-/-} sont protégées contre l'inflammation allergique des voies respiratoires(64,180,181). Le phénotype des LT issus des souris *Rel*^{-/-} n'a pas été évalué dans l'étude citée, par contre les LT issus des souris *Nfkb1*^{-/-} présentent une baisse des cytokines Th2 dans les poumons et une baisse de l'IL-4 en culture. Une dernière étude a montré que l'utilisation d'un inhibiteur chimique d'IKK (BMS-345541) et de la translocation nucléaire de NF- κ B (DHMEQ) permettait l'inhibition d'un modèle d'asthme médié par OVA via une diminution des Tconv producteurs d'IL-4(182). Cependant cette étude comporte de nombreux défauts et doit être prise avec du recul. Le patient muté pour c-Rel évoqué dans le paragraphe Th1 présente aussi une baisse des cellules Th2 dans le sang et parmi ces cellules une baisse de l'IL-4, IL-5 et IL-13(60).

Quelques études se sont aussi penchées sur la polarisation Th2 *in vitro*. Des splénocytes *Card11*^{-/-} stimulés anti-CD3/anti-CD28 + IL-2 ont une mauvaise expression de GATA3, IL-4 et IL-5(178). A contrario, des CD4 naïfs *Card11*^{-/-} cultivés en condition Th2 n'ont aucun problème de production d'IL-4(163). Cela semble démontrer un rôle du CBM mais extrinsèque aux Tconv. Des LT de souris IKK β cKO ont une baisse de l'expression de l'IL-4 *in vitro* tandis que les niveaux d'IL-5 et d'IL-10 sont normaux(105). Les mimétiques de SMAC (SM) sont des petites molécules inhibitrices qui se lient à cIAP1/2 et promeuvent leur dégradation. Les SM permettent la stabilisation de NIK et l'augmentation de RelB ainsi que p52, la forme active de NF- κ B2(183). En traitant des cultures de Th2 avec des SM, Rizk *et al* ont observé une augmentation de la production d'IL-13, une des cytokines Th2(183). Récemment, des expériences de CRISPR-screen ont été conduites par Henriksson *et al*, sur des cultures de Th2 murins afin d'identifier les gènes importants dans la différenciation et ou l'activation des Th2(184). Pour ce faire, ils ont utilisé des lymphocytes issus de souris avec des rapporteurs fluorescents associés aux protéines IL-4, IL-13

et GATA3. Selon cette étude, RelA est un régulateur positif de GATA3 et NF- κ B2 de l'IL-4. Aucune autre protéine de la voie NF- κ B n'a été identifiée comme un régulateur Th2. Il est surprenant que RelA ne soit montré comme étant un régulateur de l'IL-4 dans cette étude car il peut se lier au promoteur de l'IL-4 dans des LT humains. De plus, la surexpression de RelA et de c-Rel permettent de forcer l'expression de l'IL-4(185). En conclusion, il semble que les deux voies de NF- κ B soient impliquées dans la différenciation ou l'activation des Th2 mais il y a beaucoup de résultats contradictoires entre les études. Ainsi, il serait intéressant d'utiliser des modèles de souris inductibles conditionnels pour déléter les différentes sous-unités de NF- κ B avant et après la polarisation en Th2 *in vitro* pour mieux comprendre leur fonction. De plus, avec ces mêmes souris, il serait intéressant d'étudier la réponse Th2 *in vivo* dans des modèles d'infection aux helminthes et d'asthme.

3.4.3. Th17

Les Th17 ont un rôle primordial dans la lutte contre les infections bactériennes extracellulaires et les infections fongiques des muqueuses. Les fonctions des Th17 lors de diverses infections ont été récapitulées dans une récente revue(186). Les Th17 sont aussi importants pour la réparation et l'homéostasie des tissus, particulièrement dans les muqueuses où les Th17 agissent directement sur les cellules épithéliales(187). Les Th17 sont caractérisées par l'expression du facteur de transcription ROR γ t et la production d'IL-17a, IL-17f et IL-22(188,189). Les Th17 ont aussi été décrits comme ayant un rôle délétère dans plusieurs maladies inflammatoires et auto-immunes(190,191). Elles sont notamment très importantes dans le développement de la SEP. Leur rôle pathogénique dans cette maladie sera largement discuté dans la suite de cette introduction(192–194). *In vitro*, les Tconv peuvent être polarisés en Th17 de deux manières différentes. La culture des cellules avec du TGF- β et de l'IL-6 donne des cellules peu inflammatoires(195,196) tandis que l'ajout d'IL-1 β et d'IL-23, qui peuvent être considérés comme des signaux de danger, donne des Th17 inflammatoires. En plus de produire des cytokines Th17, les cellules polarisées dans ces conditions peuvent sécréter de l'IFN γ et du GM-CSF(192). Ces dernières années, le rôle NF- κ B dans les Th17 a été le centre d'attention d'un certain nombre d'études. Les Tconv naïfs isolés de souris *Card11*^{-/-} et *Malt1*^{-/-} produisent moins d'IL-17a, IL-17f, d'IL-22 et de GM-CSF quand elles sont polarisées en Th17(163,197). Cela montre le rôle majeur du complexe CBM dans la polarisation Th17. Dans ces études, l'expression de ROR α est diminuée

mais pas celle de ROR γ . Des résultats similaires ont été obtenus en inhibant les kinases canoniques de NF- κ B, soit avec un inhibiteur chimique de IKK β soit en utilisant des Tconv issus de souris I κ B α -(Δ N)-Tg(163). Dans des souris CD4-cre x *Ikkbb*^{fllox/fllox} une diminution de la production d'IL-17a par les Tconv est observée dans le cadre d'une inflammation du SNC, démontrant un rôle intrinsèque aux LT *in vivo*(198). De façon intéressante, des études montrent qu'IKK α peut se lier aux promoteurs de l'*Il17a*(199) et de *Rorc*(200) pour potentialiser la transcription de ces deux gènes de manière indépendante de NF- κ B à proprement parler. Chez l'homme, les LT naïfs de patients mutés pour *IKBKG* (NEMO) et polarisés en Th17, produisent moins d'IL-17a/f que les cellules de donneurs sains(201). Au niveau des sous-unités de la voie canonique de NF- κ B, la sous-unité NF- κ B1 semble être totalement dispensable(202,203).

A l'inverse, RelA et c-Rel semblent avoir une fonction intrinsèque dans la différenciation Th17. La polarisation en Th17 de Tconv *Rel*^{-/-} ou de cellules *Rela*^{-/-} obtenues à partir de chimères de foie fetales, est très mauvaise avec une forte baisse de l'IL-17a et de ROR γ t(167,168). La surexpression ectopique de ROR γ t restaure la production d'IL-17a. De plus, les deux sous unités peuvent se lier au promoteur de ROR γ /ROR γ t(168). Par conséquent, cela semble indiquer que des dimères RelA-c-Rel peuvent directement induire l'expression du facteur de transcription ROR γ t qui va à son tour se lier au promoteur de l'*Il17a* et induire son expression. Ces conclusions ont été confirmées dans un patient muté pour *REL*(60). Il a été toutefois suggéré dans une autre étude que le défaut de différenciation des cellules *Rel*^{-/-} pourrait provenir d'un défaut de production d'IL-2 ; ainsi l'addition d'IL-2 restaure la production d'IL-17a(204). De plus, une étude contredit le rôle de RelA dans la différenciation Th17 mais cela peut être attribué à l'ajout de TNF α dans les cultures qui active NF- κ B de manière indépendante du CBM(205). Quoi qu'il en soit, malgré ces différences probablement dues à des spécificités techniques et/ou de microbiote, la voie canonique de NF- κ B semble importante pour l'initiation de la différenciation en Th17, via l'induction de l'expression de ROR γ t.

Concernant la voie alternative, la délétion de NIK dans les Tconv diminue légèrement la production d'IL-17a *in vitro* mais le mécanisme semble indépendant de NF- κ B(116,183,206). Des études sur RelB et p52, les deux sous-unités de la voie alternative de NF- κ B semblent confirmer cette hypothèse. En effet, il a été montré que la dégradation de p100 en p52 est importante pour l'expression du GM-CSF mais pas pour les autres cytokines Th17(207).

La délétion de RelB dans les LT n'induit pas de changement dans l'expression de l'IL-17a(205). A l'inverse, il a été montré que la surexpression de RelB dans les Tconv réprime l'expression de cette cytokines(208,209). En effet, une étude a montré que OX40 peut activer RelB qui va alors se lier au locus de l'IL-17a et recruter des répresseurs épigénétiques. Dans cette étude, la fonction de RelB est décrite comme étant indépendante *NF-κB1* et *NF-κB2*(208). Dans un modèle murin de SEP, l'injection de Tconv *Relb*^{-/-} a un plus fort pouvoir pathogénique que l'injection de Tconv contrôles. Ceci est associé à un profil Th17 augmenté. Ces résultats sont confirmés par l'utilisation de SM qui réduisent l'expression d'IL-17a *in vitro*(183).

Pour résumer, il apparaît que la voie canonique de NF-κB contrôle l'expression de RORγt tandis plusieurs études suggèrent un rôle de RelB comme inhibiteur de l'IL-17a. Ces résultats sont très importants dans le contexte de la SEP. Cette partie sera décrite plus en détail dans la suite de l'introduction.

3.4.4. Th9

Les Th9 doivent leur nom à leur capacité à produire de l'IL-9 et sont principalement impliqués dans la réponse aux parasites extracellulaires et dans les réponses allergiques. *In vitro*, la polarisation des Th9 est obtenue en stimulant les cellules avec de l'IL-4 et du TGF-β. STAT6 et GATA3, deux facteurs de transcription bien étudiés dans la différenciation Th2 sont aussi importants pour les Th9(210–213). Par conséquent, ces cellules semblent très proches des Th2 biologiquement et fonctionnellement. A l'inverse des Th2, la différenciation Th9 est largement dépendante du facteur de transcription PU.1(214). *In vitro*, il a été montré que des Th9 cultivés avec des CPA prolifèrent mieux que des Th1 et Th17. Cette prolifération accrue est corrélée avec une meilleure translocation nucléaire des cinq sous-unité de NF-κB p50, RelA, RelB, p52, and c-Rel via TRAF6(215). p50 et RelA peuvent se fixer sur le promoteur de l'IL-9 dans des LT humains(216) et des Th9 murins(217). Dans cette dernière étude, l'inhibition de RelA induit une baisse de production d'IL-9 *in vitro*. La voie canonique de NF-κB est aussi impliquée dans l'expression de PU.1, le facteur de transcription des Th9 dans des cellules myéloïdes leucémiques humaines(218). Une augmentation des Th9 circulants a été détectée chez les patients porteurs d'une mutation de *TNFAIP3* qui code pour A20, un inhibiteur de la voie canonique de NF-κB(219). Ce rôle de la vie canonique a été confirmé dans plusieurs autres études(220,221). La voie alternative

de NF- κ B semble également impliquée. Par exemple, la stimulation du récepteur OX40 , permet d'augmenter massivement la production d'IL-9 de manière indépendante du facteur de transcription PU.1(222) ; cette augmentation requiert en fait la présence de NF- κ B2, alors que l'activation de la voie canonique n'est pas nécessaire. D'ailleurs la surexpression de p52 et RelB dans des Tconv naïfs mis en culture avec des conditions de polarisation Th9 classiques (TGF β + IL-4) permet d'augmenter la production d'IL-9 à des niveaux similaires à ceux obtenus avec une stimulation de OX40(222). Au niveau moléculaire, RelB se lie au gène de l'IL-9 dans des cellules murines Th9 et crée un "super activateur" qui induit l'expression de la cytokine(223). L'utilisation de SM, qui potentialise la voie alternative de NF- κ B, augmente la polarisation Th9 *in vitro*(183). Pour finir, une étude récente a démontré une potentialisation de la polarisation Th9 par l'axe TNF-TNFR2 qui induit des dimères c-Rel-p50, p50-RelB et p52-RelB, capables de se lier au promoteur de l'IL-9 et de l'activer(224). Ainsi il semble que les deux voies de NF- κ B permettent la polarisation Th9. Cependant, il semble que la voie canonique soit surtout induite par la signalisation du TCR tandis que la voie alternative est activée suite à l'engagement des membres TNFRSF ; d'ailleurs dans ce contexte il serait intéressant d'étudier la contribution de chacune des sous-unités de NF- κ B.

3.4.5. Tconv folliculaires (Tfh)

Cette sous population de Tconv a été proposée en 2000 lorsque deux groupes ont montré que l'aide aux cellules B dans les follicules était fournie par des cellules Tconv spécifiques résidant à proximité de la zone des cellules B dans les structures lymphoïdes(225,226). Ces cellules co-expriment les marqueurs de surface Chemokine (C-X-C motif) receptor - (CXCR)5, ICOS et PD-1, ainsi que la cytokine IL-21. et le facteur de transcription principal est Bcl6(227). La fonction principale des Tfh est de fournir de l'aide aux LB. Ils permettent la génération de centre germinatifs (GC), la commutation de classe d'Ac, la génération d'Ac de haute affinité et la formation de LB mémoire(228). Concernant la régulation transcriptionnelle des Tfh, il est bien établi que Bcl6 est un promoteur majeur de la différenciation en Tfh. Mais à nouveau, NF- κ B semble également impliqué. Une réduction des Tfh circulants a été détectée chez des patients présentant des mutations perte de fonction de NEMO(201,229) et NF- κ B1(109). A l'inverse, les patients avec une mutation gain de fonction de IKK β présentent une augmentation des Tfh circulants(230). Les LT de patients

REL produisent moins d'IL-21 et de CD40L(60,62). Ces premières données chez l'homme suggèrent un rôle important de la voie canonique de NF-κB dans le développement des Tfh. Ces données sont corroborées chez la souris. L'immunisation de souris *Nfkb1*^{-/-} ayant un TCR transgénique avec leur antigène spécifique montre un défaut dans la génération de Tfh et l'induction de réponse de LB. Chez la souris, il a été montré que c-Rel peut se lier au promoteur de l'IL-21 et induire son expression dans les LT(231). Par conséquent, les souris *Rel*^{-/-} ont un défaut de production de l'IL-21 par les Tconv (ce qui confirme les observations faites chez l'homme) qui est associé à une baisse de développement des Tfh et des GC(231–233). Des données similaires ont été obtenues avec des souris *Nfkb1*^{-/-}(234). Néanmoins, le développement normal de Tfh suite à une infection par LCMV, dans les souris Lck-Cre *RelA*^{flox/flox} suggère un rôle de NF-κB extrinsèque aux LT(166).

Un rôle de la voie alternative a aussi été démontré dans des souris avec une délétion germinale de *Map3k14*, qui présentent une baisse de différenciation (235). Ce phénotype a aussi été observé chez des patients avec une mutation perte de fonction de *MAP3K14*, et chez différents patients porteurs de mutations dans *NFKB2*(117,236). Cependant, il semble que ce phénomène soit extrinsèque au LT et plus probablement dû à une diminution de l'expression d'ICOSL par les LB, ce signal étant crucial pour le développement des Tfh *in vivo*(235,237).

Ainsi, la fonction intrinsèque des différentes sous-unités de NF-κB dans le développement et/ou la fonction des Tfh reste à explorer.

4. L'immunité du cancer

4.1. Incidence et mortalité

Le cancer est en passe de devenir la première cause de mort prématurée dans le monde(238). En 2018, 3,91 millions de cancers ont été diagnostiqués et 1,93 millions de personnes sont décédées des suites de leur cancer en Europe. Chez les hommes, les principaux cancers en termes d'incidence et de mortalité sont les cancers de la prostate, des poumons et les cancers colorectaux. Chez les femmes, les cancers colorectaux et des poumons sont aussi en 2^{ème} et 3^{ème} position mais ce sont les

cancers du sein qui font le plus de victimes(239). 40-50% des cancers peuvent être évités. La cigarette et l'obésité en sont les causes majeures(240).

4.2. Mécanismes généraux de la carcinogénèse et « Hallmarks » du cancer

Il existe plus d'une centaine de types distincts de cancer avec même différents sous-types au sein d'un même organe. Bien que le cancer comprenne en lui-même de nombreuses maladies différentes, les processus cancéreux de base sont globalement les mêmes. La plupart des cancers dérivent d'une seule cellule anormale unique qui a subi des mutations génétiques transmissibles. Certaines sont acquises tandis que d'autres peuvent être héréditaires. Certaines mutations héréditaires dans des gènes dits de prédisposition permettent de prédire l'apparition de cancer et donc de faire des diagnostics précoces. C'est par exemple le cas du gène BRCA1 dans le cancer du sein(241).

Ces mutations entraînent des dérèglements des contraintes normales de la prolifération et de la survie cellulaire. Globalement ces mutations se séparent en deux grandes classes. Les mutations activatrices de gènes positivement impliqué dans la prolifération/survie ont un effet dominant, il suffit qu'un des deux allèles soit altéré pour augmenter la prolifération cellulaire ; C'est ce qu'on appelle un oncogène. A l'inverse, il existe des gènes suppresseurs de tumeurs qui régulent négativement la prolifération ou la survie des cellules. Les mutations inactivatrices sont récessives, il faut que les deux allèles soient mutés pour avoir un effet cancérigène. Au fur et à mesure des divisions de la cellule tumorale primitive, des mutations s'accumulent dans les descendants qui améliorent leur aptitude à survivre et proliférer. L'accumulation de ces cellules avec une prolifération incontrôlée va donner naissance à une masse appelée tumeur.

En plus de la survie/prolifération, une caractéristique majeure des cellules cancéreuses et leur capacité à envahir des tissus et organes où elles n'ont normalement pas leur place. Tant que ce n'est pas le cas, on dit que la tumeur est bénigne. Elle devient une tumeur maligne, et donc un cancer, lorsque les cellules acquièrent cette capacité d'invasion. L'invasion peut être locale, certaines cellules tumorales vont se détacher de la tumeur et migrer dans les tissus conjonctifs intra- et péri-tumoraux. D'autres cellules vont se détacher de la tumeur et entamer le processus de dissémination

métastatique en migrant via les vaisseaux sanguins ou la lymphe pour former des tumeurs secondaires appelées métastases dans des parties lointaines de l'organisme. Afin d'être capables de se détacher de la tumeur primaire, de migrer dans l'organisme et de s'ancrer dans un nouveau tissu pour reformer une tumeur secondaire, les cellules tumorales font preuve d'une formidable plasticité cellulaire. Ces mécanismes sont détaillés dans la revue suivante(242). La majorité des patients atteints de cancer meurent à cause des métastases.

En 2000, Hanahan et Weinberg ont dressé une liste de six caractéristiques communes aux tumeurs afin de mieux définir le Cancer dans sa généralité. Ce sont les fameux « Hallmarks of Cancer ». Ce sont l'autosuffisance en signaux de croissance ; la résistance aux signaux inhibiteurs de croissance, l'évitement de l'apoptose, un potentiel réplicatif illimité, une angiogenèse durable, l'invasion des tissus/métastases(243). Depuis, en se basant sur l'avancée récente des connaissances en cancérologie, ils ont étendu cette liste à d'autres caractéristiques : la dérégulation du métabolisme, l'échappement à la réponse immunitaire, l'inflammation, l'instabilité génomique, la reprogrammation épigénétique, la plasticité cellulaire, le polymorphisme du microbiote et la présence de cellules sénescents(244,245).

4.3. *Traitements classiques du cancer*

Essayer de guérir le cancer est difficile mais pas sans espoir. Le traitement principal, et souvent le plus efficace, est la chirurgie. Cependant, cette option peut parfois être risquée voire impossible. Pour que la chirurgie soit parfaitement efficace, il faut éliminer toutes les cellules tumorales or la présence de métastases disséminées dans l'organisme entraîne régulièrement des rechutes. Les autres traitements de référence sont la radiothérapie, la chimiothérapie et parfois l'hormonothérapie comme pour le cancer du sein où le tamoxifène est souvent utilisé. Malheureusement ces traitements sont bien souvent inefficaces et présentent une forte toxicité. Par conséquent, les recherches continuent pour trouver des traitements ciblant spécifiquement les cellules cancéreuses. C'est l'avènement des thérapies ciblées. La première d'entre elles, le Glivec, est mise sur le marché en 2001. C'est un « mésylate d'imatinib » qui agit en inhibant la tyrosine kinase de fusion BCR-ABL qui est l'origine de beaucoup de leucémies myéloïdes chroniques. Les premiers résultats sont impressionnants, avec 88% de réponses(246). Par la suite, beaucoup d'autres thérapies ciblées ont vu le jour comme par exemple les inhibiteurs de BRAF et MEK dans le mélanome. Comme je vais

le détailler dans la section 4.8, ces dix dernières années, différentes immunothérapies ont révolutionné la prise en charge des patients.

4.4. Découverte de l'immunité anti-tumorale

L'une des fonctions du SI est de reconnaître et éradiquer les cellules qui subissent une transformation tumorale. Ce concept est communément accepté depuis quelques dizaines d'années et a conduit au développement de nombreux traitements qui modulent le SI des patients pour détecter et détruire les cellules tumorales : les immunothérapies. Les premiers indices concernant le rôle du système immunitaire dans le contrôle des tumeurs viennent de rapport décrivant la disparition spontanée de tumeurs dans l'Égypte antique(247). Dès 1891, William Bradley Coley fit l'observation que plusieurs patients atteints de sarcomes montraient des signes de rémission spontanée suite à une infection bactérienne. Il mit au point des traitements à base de différentes mixtures de *Streptococcus pyogenes* et *Serratia marcescens* et déclara avoir guéri plus de 1000 patients atteints de différents types de tumeurs malignes, sarcomes, lymphomes et carcinomes testiculaire(248) – bien entendu la validité de ces résultats est à prendre avec précaution... L'hypothèse d'une réponse immunitaire anti-tumorale est d'abord émise par Paul Ehrlich en 1909(249). En 1915, Murphy et Morton observèrent que l'injection de cellules tumorales (xénogéniques) dans des souris était accompagnée d'un recrutement de lymphocytes. L'irradiation des souris, qui crée une lymphopénie, empêchait le rejet des tumeurs(250). Dans les années 50 émerge ensuite le concept d'immuno surveillance des tumeurs à proprement parler (Burnett), via l'existence d'antigènes tumoraux - le premier n'a été identifié qu'en 1989 chez l'homme(251) !

Ces théories ont été étoffées ensuite par Lloyd J. Old , qui prédit d'ailleurs qu'un jour l'immunothérapie aurait un rôle majeur dans le traitement des cancers(252). Avec son équipe, ils guérèrent des souris atteintes de cancer de la vessie en les infectant avec la bactérie Bacillus Calmette-Guerin (BCG)(253), traitement qui démontra par la suite son efficacité chez l'homme(254). Par la suite, Stutman montra une augmentation de l'incidence des cancer dans les souris immunodéficientes(255–257) tandis que Schreiber, Dunn, Old et leurs équipes établirent le rôle des lymphocytes dans la surveillance et le contrôle des tumeurs(258–260). Ces études sont confirmées chez l'homme par l'incidence plus élevée de cancers chez les patients immunodéprimés suite à une infection par le VIH ou sous immunosuppresseurs pour cause de transplantation(261).

4.5. Mécanismes d'échappement au SI

Malgré tout, des personnes parfaitement immunocompétentes peuvent développer un cancer. Certaines cellules tumorales peuvent “échapper” au système immunitaire par divers processus. Cet échappement repose sur divers mécanismes, à la fois intrinsèques aux tumeurs et via la modulation du système immunitaire. Je me limiterai ici à quelques exemples. Certaines tumeurs sont protégées par une barrière physique (par exemple des fibroblastes dans le cas du cancer du pancréas) qui empêche le contact entre les cellules tumorales et les cellules immunitaires.

Les cellules tumorales peuvent aussi avoir une faible immunogénicité, par exemple une faible expression voire des mutations invalidantes- des molécules du CMH, qui les rend difficiles à détecter par le SI adaptatif. De plus, la détection d'une cellule tumorale par un LT en absence de signaux de co-stimulation induit l'anergie de cette cellule, c'est ce qu'on appelle la tolérance périphérique.

Les cellules tumorales peuvent induire un microenvironnement tumoral (TME) immunosuppresseur en produisant diverses molécules qui recrutent et activent les populations immunitaires immunosuppressives comme les Treg et les cellules suppressives d'origine myéloïde (MDSCs). Certaines cellules tumorales expriment à leur surface des protéines inhibitrices qui vont directement inhiber l'activation des cellules immunitaires. La protéine PD-L1 en est l'exemple typique. L'interaction de ce ligand avec son récepteur PD-1 exprimé à la surface des LT inhibe l'activation de la voie du TCR et diminue donc son activation.

Des efforts intenses sont mis en place pour comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires permettant aux cellules immunitaires de détecter et détruire les cellules tumorales ainsi que les mécanismes permettant aux cellules tumorales de s'échapper. Comme nous le verrons par la suite, ces efforts sont déjà couronnés de succès car, comme l'avait prédit Lloyd J. Old, le traitement des cancers par immunothérapie est devenu un standard. Cependant la lutte contre le cancer est loin d'être finie et c'est dans ce cadre que s'inscrivent mes travaux de thèse sur les lymphocytes Tconv.

4.6. *La signalisation NF- κ B dans la tumeur*

4.6.1. *La voie canonique de NF- κ B contrôle la prolifération tumorale et son interaction avec le SI*

La voie NF- κ B est activée et joue un rôle dans toutes les populations cellulaires du TME, à commencer par les cellules tumorales elles-mêmes.

La prolifération des cellules tumorales, l'angiogenèse médiée par les tumeurs ainsi que les métastases sont sous le contrôle de la voie canonique de NF- κ B. Ceci est bien démontré par la réduction de la charge tumorale observée dans les modèles murins de cancer du poumon induit par K-Ras et portant l'ablation conditionnelle de *Ikkkb* ou *Rela*, ou l'expression transgénique d'un super-répresseur $I\kappa B\alpha$; des observations similaires ont été faites dans le mélanome(262–265). Cependant des résultats opposés ont été décrits dans le carcinome cellulaire squameux et dans le cancer du foie, ce qui suppose des fonctions spécifiques au type cellulaire(266,267). En plus de cela, plusieurs études ont montré que l'activation de NF- κ B dans les tumeurs permet la production de différentes cytokines et chimiokines(268–270) ainsi que l'expression de PD-L1 et ainsi d'imposer un microenvironnement immunosuppresseur(271,272).

4.6.2. *NF- κ B du côté obscur de l'immunité dans le cancer*

De nombreuses études ont cherché à percer les fonctions de NF- κ B dans les cellules du SI dans le TME et essayer d'en déduire une valeur pronostique. Les conclusions sont nombreuses, mais globalement NF- κ B semble jouer un double rôle, résumé en figure 5. J'ai pu largement aborder ces points dans une revue de la littérature publiée en 2021, et présentée en annexe.

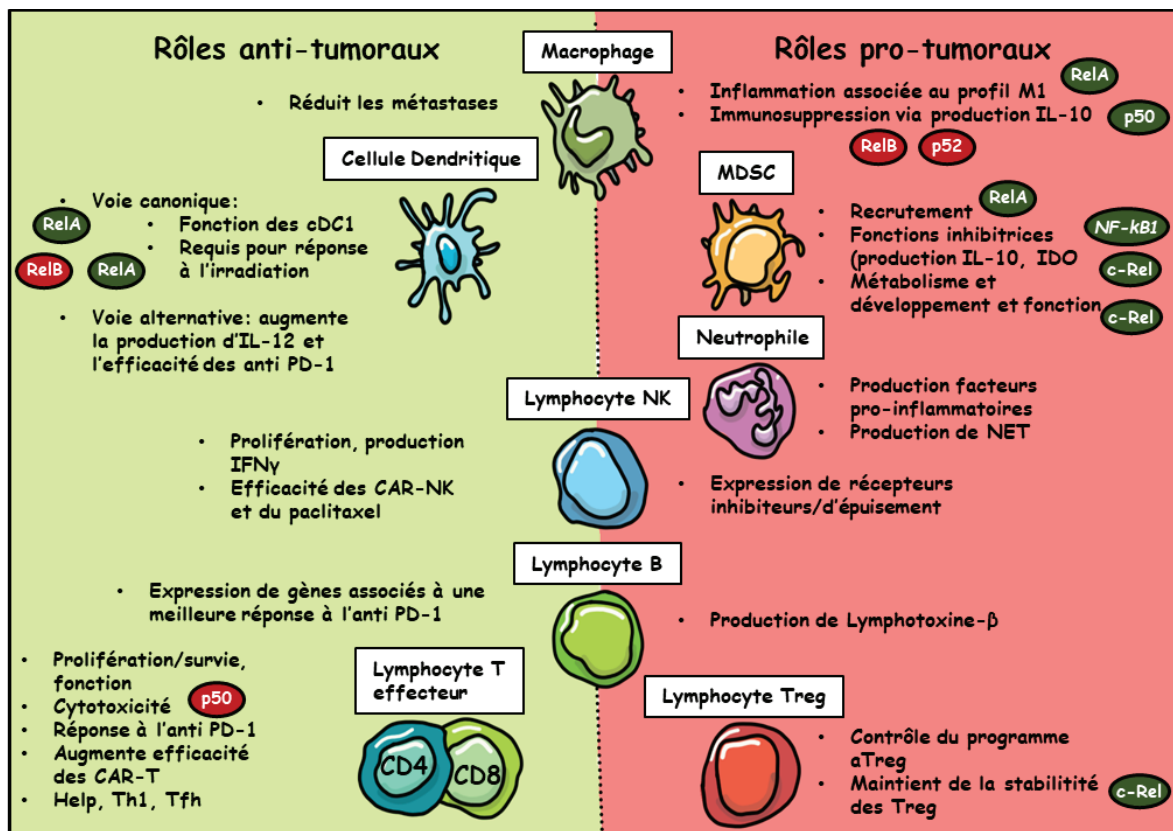


Figure 5: Le double jeu de NF- κ B dans l'immunité du cancer.

La figure représente certaines des fonctions connues de NF- κ B dans les sous-ensembles de cellules immunitaires dans l'environnement tumoral. Lorsque la fonction d'une des cinq sous-unités de NF- κ B a clairement été établie dans un contexte tumoral, alors la sous-unité est représentée. Les sous-unités représentées en vert soutiennent les fonctions à côté desquelles elles sont représentées et les sous-unités rouges ont un rôle inhibiteur. Figure adaptée de Lalle *et al.*, *Cells*, 2021

Dans les macrophages, neutrophiles, MDSCs et Treg, l'activation de NF- κ B est globalement pro tumorale. En utilisant des souris LysM-Cre, le groupe de Michael Karin a démontré que dans des modèles de cancer induits par l'inflammation, l'ablation de *Ikkbb* ou de *RelA* dans les macrophages diminue la pousse tumorale en diminuant l'inflammation(273–275). A l'inverse, l'activation de la voie canonique de NF- κ B dans les macrophages diminue l'immunité anti tumoral et permet donc la croissance de modèles de cancer du sein, d'ovaires et de glioblastome(276–278). Que ce soit en favorisant l'inflammation ou en diminuant l'immunité, l'activation de NF- κ B dans les macrophages est pro tumorale. Ces observations sont confirmées dans des modèles de thérapies cellulaires utilisant des macrophages *Ikkbb*- ou *Nfkb1*-KO (277,279). Les MDSCs sont des cellules hautement suppressives. Dans un modèle de fibrosarcome murin, leur fonction suppressive est réduite en l'absence de *Nfkb1*(280). Dans des souris LysMCre *RelA*^{fllox/fllox}, les MDSCs sont moins présentes dans des tumeurs de glioblastomes ce qui peut suggérer un rôle dans le recrutement des MDSCs(278). Enfin, il a été démontré que c-Rel est requis par les MDSCs pour la régulation de leur développement, fonction et métabolisme durant la carcinogenèse dans des modèles de mélanome et de thymome. Ainsi l'inhibition de c-Rel avec l'agent chimique R96A permet un meilleur contrôle de la pousse tumorale et une meilleure réponse aux anti-PD-1(145). Par conséquent, la voie canonique de NF- κ B contrôle la fonction anti tumorale des MDSC à travers les trois sous-unités NF- κ B1, c-Rel et RelA. En plus de cela, la culture de MDSCs avec des cellules de cancer du sein induit l'expression d'IDO (une molécule suppressive) via l'axe NIK - p52/RelB(281). Aucune étude n'a directement exploré les fonctions de NF- κ B dans les neutrophiles infiltrant la tumeur. Pourtant, certaines données suggèrent que la voie canonique est fortement activée dans ces cellules, ce qui provoquerait une forte inflammation(282) et la NETosis(283), un mécanisme important pour la dissémination métastatique des cellules tumorales(284).

Dans les Treg aussi, NF- κ B contrôle des processus pro-tumoraux. Comme nous l'avons vu l'activation de la voie TCR – CBM - NF- κ B canonique est absolument critique pour l'homéostasie et l'identité des Treg périphériques(35,106,140–142). Des preuves directes montrent aussi son implication dans les fonctions pro tumorales des Treg. La croissance de tumeurs transplantées est fortement réduite chez les souris portant des délétions de *Carma1*, *Bcl10*, *Malt1* ou *Rel* spécifiquement dans les Treg(140–142,144). Cela conduit à la génération de Treg "instables" qui produisent des quantités importantes d'IFN γ et de TNF- α . En conséquence, le transfert de Treg *Carma1*^{-/-} réduit la pousse tumorale via la production d'IFN γ (140). De manière intéressante, la

délétion de RelA n'a aucun impact dans le contexte du cancer(144) ce qui démontre clairement que ces deux sous-unités, bien qu'appartenant à la même voie de signalisation et étant très proches structurellement ont des fonctions indépendantes. Ainsi à l'état basal, RelA contrôle l'identité des Treg et le maintien de l'homéostasie tandis que dans le cancer, c-Rel induit les fonctions suppressives pro tumorales.

En accord avec ses fonctions pro-tumorales de la voie canonique de NF- κ B, l'utilisation d'inhibiteurs chimiques de MALT1, IKK β et c-Rel dans des modèles de cancers transplantable induit une diminution de la pousse tumorale(106,140,144,145,285).

4.6.3. *NF- κ B dans l'immunité anti tumorale ? Un nouvel espoir.*

A l'inverse, dans les DC, LT CD8 et NK, la voie NF- κ B contrôle des programmes anti tumoraux. Pour les LB, peu de données sont disponibles et soutiennent des conclusions contradictoires.

Les DC forment le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative de par leurs fonctions de CPA, de costimulation et de sécrétion de cytokines et chimiokines. Dans le cancer, les DC conventionnelles (cDC)1 et cDC2 sont de bon pronostic et importantes pour la réponse aux anti-PD1(286–288). Plusieurs études montrent différentes fonctions des sous-unités de NF- κ B dans la fonction des DC. c-Rel contrôle l'expression de l'IL-12p35(80,289,290). La voie alternative elle, contrôle la cross présentation ainsi que la stabilité de la lignée cDC2, avec notamment RelB qui fonctionne comme un activateur des DC tandis que NF- κ B2 restreint l'activation de RelB(70,291–293). Enfin, il a été montré que des dimères p50-RelB permettent la bonne maturation des DC(294). Globalement, l'activité de NF- κ B dans les DC ainsi que leurs fonctions sont inhibés dans le TME³⁰⁵. L'ablation de *Rela* dans des DC abolit l'effet thérapeutique anticancéreux de la radiation tandis que celle de *Relb* l'améliore(295). En accord avec ces résultats, la surexpression de *Rela* dans des DC dérivés de la MO augmente leurs fonctions de CPA et de sécrétion de cytokines et diminue la pousse tumorale quand elles ces cellules sont transférées dans des souris(296). *In vivo*, l'injection d'agonistes de CD40 ou de SM active la voie alternative dans les DC, augmente la sécrétion d'IL-12 et potentialise la réponse aux immunothérapies(297,298). Par conséquent, la modulation de NF- κ B dans les DC apparaît comme une cible intéressante pour traiter le cancer

mais les fonctions des différentes sous-unités sont encore floues. C'est particulièrement le cas pour RelB qui en fonction du contexte peut être pro tumoral ou anti tumoral.

Dans les NK, des études avec différents modèles de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ et $\text{IKK}\beta$ montrent que la voie canonique contrôle la prolifération et l'activation des NK mais de manière indépendante de c-Rel tandis que $\text{NF-}\kappa\text{B1}$ lui, semble être un répresseur(299–301). Cependant peu d'études ont directement interrogés la fonction de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ dans les NK dans le cancer. Certaines données suggèrent que l'activation de la voie canonique permet l'activation et la cytotoxicité des NK envers les cellules tumorales dans divers modèles murins de cancer(302–304). Enfin, des cellules CAR-NK modifiées pour exprimer un nœud de signalisation artificiel Myd88/CD40 présentent une activité antitumorale accrue, probablement par le biais d'une augmentation de l'activation de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ (305). Bien que tout cela suggère un rôle antitumoral de la voie $\text{NF-}\kappa\text{B}$, des études mécanistiques plus directes sont requises pour vraiment comprendre le rôle des cinq sous-unités de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ dans les NK, d'autant plus qu'il a été suggéré que $\text{NF-}\kappa\text{B}$ favorise l'expression de Tim-3 et le dysfonctionnement des cellules NK dans le cancer de l'œsophage chez l'homme(306).

L'infiltration de LB dans les tumeurs est plutôt de bon pronostic dans le cancer(307), particulièrement sous forme de structure lymphoïdes tertiaires (TLS) ou ils sont aussi associés avec une bonne réponse aux immunothérapies(308–313) bien que certaines études aient montré une fonction pro tumorale des LB(314,315). Dans un contexte normal, les sous-unités de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ contrôlent le développement et la fonction des LB. c-Rel, RelB et $\text{NF-}\kappa\text{B2}$ (316,317), sont importants pour la maturation des LB dans les GC, c-Rel et RelB ayant potentiellement des fonctions redondantes comme illustré par des modèles murins de simple et double KO(318). RelA lui est requis pour le développement des plasmocytes(316). Dans le cancer, à l'exception des lymphomes et leucémies B, presque rien n'est connu concernant le contrôle des LB par la voie $\text{NF-}\kappa\text{B}$. Dans un modèle murin de cancer de la prostate, il a été démontré que $\text{IKK}\beta$ contrôle l'expression de la $\text{LT-}\beta$ par les LB, ce qui augmente la croissance de la tumeur(315). Inversement, il a été récemment démontré que les sécrétomes de mélanomes humains entraînent l'expression de nombreux gènes dépendant de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ dans les LB, y compris des marqueurs d'activation, des molécules de costimulation et des chimiokines. Cet enrichissement a été corrélé à une meilleure survie des patients et une meilleure réponse aux anti-PD-1(319). Plus d'études mécanistiques, en particulier dans des modèles de souris KO conditionnels, sont nécessaires pour comprendre les fonctions des sous-unités $\text{NF-}\kappa\text{B}$ dans LB pendant le cancer.

Dans les LT, l'activation de la voie NF- κ B contrôle la fonction des LT dans le cancer. Barnes *et al.* ont utilisé des souris portant une ablation conditionnelle de *Ikkbb* dans les cellules T totales (CD4-cre *Ikkbb*^{fl/fl}). Ils ont montré que l'inhibition de l'activation canonique de NF- κ B dans les LT entraîne une augmentation de la croissance tumorale dans un modèle immunogène de fibrosarcome(320). Cette observation est associée à une réduction de la fonction effectrice et de l'activité cytotoxique des cellules T CD8⁺. Par contre, le phénotype des CD4 n'a pas été analysé dans cette étude. Le même phénotype est observé chez les souris déficientes en Carma1. Dans une série d'expériences inverses, le même groupe a découvert que l'activation constitutive de IKK β dans les cellules T (CD4-cre *Ikkbb*^{CA}) diminue fortement la croissance tumorale d'une manière dépendante des cellules T CD8⁺(321). Il a montré que l'induction d'une forme active de IKK β (Ikk β -CA) ou l'ablation de *Tnfrif3* dans des CD8 WT ou TCR transgéniques permet de rejeter efficacement des tumeurs. Cette observation est corrélée avec une forte translocation nucléaire de c-Rel et RelA, une production accrue d'IFN γ , TNF α et IL-2 ainsi qu'une baisse d'expression de PD-1(322). Bien que ces études soient très instructives, les modèles CD4-cre délètent dans toutes les populations de LT donc les observations faites ne sont peut-être pas intrinsèques aux LT CD8. Par conséquent l'utilisation de souris CD8cre serait plus approprié. De plus, ces études interrogent la fonction de la voie canonique entière. En se basant sur les études faites dans les Treg, on peut imaginer des fonctions divergentes des sous-unités de NF- κ B dans les LT CD8. Par contre, ces résultats mettent clairement en évidence l'intérêt de l'activation du NF- κ B dans les thérapies anticancéreuses basées sur le transfert adoptif de LT.

4.7. Le rôle des Tconv dans l'immunité anti tumoral et l'implication de NF- κ B

La présence de Tconv intra tumoraux est en général de bon pronostic chez l'homme(323) et logiquement, il en est de même pour l'expression de molécules de classe II antigènes des leucocytes humains (HLA)-DR par les tumeurs(324). Globalement, les Tconv contribuent à moduler les réponses immunitaires. Ils permettent l'activation des LT CD8⁺ dits cytotoxiques en fournissant des signaux d'aide(325). Ce processus est qualifié de "help". Les Tconv permettent aussi l'activation et la maturation des cellules phagocytaires et des lymphocytes B, le développement de TLS intra tumorales(326) et peuvent parfois directement tuer les cellules tumorales(327,328).

Comme à l'homéostasie, de nombreux régulateurs de l'activation des Tconv ont été impliqués dans leur activité anti-tumorale. NF- κ B semble notamment être l'un de leurs régulateurs majeurs. Il a été montré que l'activation de NF- κ B est dérégulée dans les cellules T de patients et de souris atteints de cancer du rein(329,330). En outre, les cellules T périphériques anergiques, qui ressemblent aux cellules T épuisées infiltrant les tumeurs, présentent une translocation nucléaire réduite de RelA(110), tandis que les Tconv humains cultivés avec du surnageant de mélanome présentent une diminution de l'activité de NF- κ B qui corrèle avec une diminution des marqueurs d'activation(331). Au-delà de ces études, NF- κ B paraît être plus ou moins impliqué dans les différentes sous-types et fonctions des Tconv dans la tumeur.

4.7.1. *Le rôle du « Help »*

Le “help” transmis par les Tconv aux LT CD8 est majeur pour l'induction de réponses cytotoxiques anti tumorales(332–335). Brièvement, les Tconv et LT CD8 naïfs sont d'abord activés indépendamment dans les ganglions drainants les tumeurs par différents types de DC. Dans un second temps, les deux lymphocytes vont interagir avec une seule et même DC qui va permettre de transmettre le signal du “help”(336,337). Le Tconv exprime le ligand de CD40 (CD40L) qui va engager CD40 à la surface de la DC. Cette dernière va alors augmenter l'expression de molécules de costimulation CD80/86 et CD70 ainsi que la production d'IL-15 et d'IFN de type I(338–340). Ensemble, ces signaux, ainsi que l'IL-2 produit par les Tconv vont permettre l'expansion clonal du CD8 et induire le profil cytotoxique(341). A noter que l'expression de l'IL-2 et CD40L sont tous les deux sous le contrôle direct de NF- κ B(171,172,342), ce qui suggère fortement une fonction anti-tumorale de NF- κ B dans les Tconv.

4.7.2. *Th1*

La présence de Th1 intra tumoraux est systématiquement de bon pronostic(323,343–346) . Dans le TME, les Th1 peuvent stimuler et soutenir les lymphocytes cytotoxiques et les lymphocytes NK(347–349). La production d'IFN γ par les Th1 induit la sécrétion de chimiokines pro inflammatoires par les macrophages, CAF et cellules tumorales(350). Chez ces dernières, l'IFN γ

promeut aussi l'expression des complexes CMH-I et CMH-II(258,351). Comme discuté précédemment, RelA et RelB semblent contrôler la polarisation des Th1, on peut donc supposer un rôle anti tumoral de ces protéines dans les Tconv. Dans cet ordre d'idée, il a été proposé que la decitabine, un inhibiteur de DNA méthyltransférases communément utilisé chez les patients, induit une polarisation Th1 via une augmentation de l'activation de la voie canonique de NF- κ B. Chez les patients, la réponse au traitement est associée avec l'activation de RelA dans les Tconv(352). Le rôle des autres sous-unités est moins clair.

4.7.3. *Th2*

La fonction des Th2 dans le cancer est beaucoup moins évidente que celle des Th1. Leur présence dans le TME peut être de bon ou de mauvais pronostic. Dans le cancer du pancréas ils sont associées à une mauvaise survie(353) tandis que dans le cancer du sein(354) et lymphome de Hodgkin(355) ces cellules sont plutôt de bon pronostic. Chez la souris, le transfert de Th2 spécifiques de l'OVA permet d'induire une réponse antitumorale puissante et durable en activant des lymphocytes NK, probablement via la sécrétion d'IL-4(353,356,357). L'IL-3, l'IL-5 et le GM-CSF produits par les Th2 dans un modèle de cancer du sein, réduisent directement sa croissance(358). A l'inverse, la fonction pro tumorale des Th2 peut être expliquée par l'activation de LB qui vont produire de l'IL-10, une cytokine immunosuppressive(359). Comme nous l'avons vu précédemment, le rôle des membres de la famille NF- κ B dans la biologie des Th2 est ambigu. Lors de la différenciation Th2, RelA et NF- κ B2 ont été identifiés comme des régulateurs positifs de GATA3 et de l'IL-4 respectivement(184). Étant donné que le bénéfice des Th2 est variable en fonction du type de cancer, il semble difficile à ce jour de moduler NF- κ B dans les Th2 pour améliorer la réponse immunitaire anti-tumorale.

4.7.4. *Th9*

Chez l'homme, plusieurs études montrent l'IL-9 comme étant de mauvais pronostic dans le lymphome de Hodgkin tandis que des données contradictoires existent concernant les Th9 dans le cancer du poumon(360–362). Par contre, toutes les études chez la souris présentent à ce jour un

fort potentiel anti tumoral des Th9. Ils sont capables de tuer directement les cellules tumorales(363,364) et de promouvoir la présentation des antigènes tumoraux aux LT CD8(365). Dans un modèle de mélanome murin, le transfert adoptif de Th9 montre une meilleure activité anticancéreuse que celui de Th1, Th2 ou Th17(366). Dans cette étude, l'efficacité de ces cellules dépend de l'IL-9. D'autres études similaires montrent aussi la meilleure efficacité anti tumorale des Th9 sur les Th1 et Th17. Cependant, les auteurs proposent un rôle des Th9 indépendant de l'IL-9 et plutôt dépendant d'une cytotoxicité directe(215,367). De plus, des études récentes ont démontré que la polarisation de CD4 naïfs en Th9 avec de l'IL-4 et de l'IL-1 β ou du TNF en l'absence de TGF- β ou via l'engagement de Fas permet d'induire des cellules Th9 avec une forte expression d'IL-9 et des propriétés anti tumorales accrues. La génération de ces cellules *in vitro* dépend de la voie canonique de NF- κ B(224,362,368).

En conclusion, les Th9 sont des cellules qui semblent présenter une fonction anti tumorale majeure. Les stratégies de transfert adoptifs de Th9 dans divers modèles de cancer donnent des résultats très encourageants. Etant donné l'implication des deux voies de NF- κ B dans la différenciation et l'activation de ces cellules, il est important de mieux comprendre le rôle spécifique des cinq sous-unités de NF- κ B afin d'exploiter au mieux les Th9 dans les thérapies anti cancéreuses.

4.7.5. *Th17*

Le rôle des Th17 dans le cancer est très ambigu et leur valeur pronostique dépend du type de cancer et/ou du stade de progression. L'infiltration de Th17 dans la tumeur et les niveaux d'IL-17a dans le sang ont été montrés comme étant de mauvais pronostic dans le cancer des poumons(369), le cancer colorectal(370), le cancer du pancréas(371) et le carcinome hépatocellulaire(372). A l'inverse, l'IL-17a et les Th17 sont de bon pronostic dans les cancers de l'œsophage(373,374), de la prostate(375), de l'estomac(371) et de l'utérus(376). Mécaniquement, l'IL-17 agit à la fois sur la survie, la prolifération et l'invasion des cellules cancéreuses(232,377–380) et sur la modulation de l'environnement immunitaire. L'IL-17 peut recruter les cellules MDSCs(381) et donc avoir un rôle immunosuppresseur, mais aussi promouvoir le recrutement des LT, DC et NK ainsi que l'activation des LT et NK cytotoxiques et des macrophages antitumoraux(377,382,383). Nous avons vu plus haut que NF- κ B est un régulateur important de la différenciation Th17 ; toutefois, aucune étude n'a, à ma connaissance, fait le lien entre NF- κ B, TH17 et réponses anti-tumorales.

4.7.6. *Tfh/TLS*

Les TLS sont des agrégats organisés de cellules immunitaires présents uniquement dans tissus avec une inflammation chronique comme les tumeurs par exemple. Ils sont composés d'une couche intérieure de LB entourés par des LT ainsi que quelques DC, macrophages et vaisseaux sanguins. Les LT sont majoritairement des Tfh(312) bien que quelques Th1, Treg et CD8 cytotoxiques soient présents.

La densité des TLS ainsi que des Tfh, GC et LB est d'excellent pronostic dans plusieurs types de tumeurs solides(308–313). Il en va de même pour la signature Tfh(326,384). De plus, les TLS et les Tfh promeuvent la réponse aux immunothérapies(313,385–388). La fonction principale des Tfh est bien sûr d'activer les lymphocytes B antitumoraux. Cependant, ils peuvent avoir d'autres fonctions. Chez la souris, l'IL-21 produit par les Tconv permet aussi d'augmenter l'activité antitumorale des CD8 cytotoxiques(313,389,390). Étant donné que les patients et les souris mutées pour *Rel* présentent un défaut d'expression de l'IL-21 par les LT, il serait intéressant d'explorer directement la régulation moléculaire des Tfh intratumoraux par cette sous-unité de NF-κB.

4.7.7. *Tconv cytotoxiques*

Dans le cancer, il existe des Tconv cytotoxiques pouvant directement tuer les cellules tumorales. La première étude à décrire ces cellules a montré que l'engagement d'OX40, induit une population de cellules T CD4⁺ spécifiques de la tumeur, capable d'éradiquer les mélanomes avancés chez la souris et également les cellules de mélanome humain *in vitro*(391). Dans les LT, OX40 signale via les deux voies de NF-κB(222,392,393). Des LT CAR (dont nous discuterons dans la partie 4.8 sur les immunothérapies) ont d'ailleurs été développés pour être activés via un axe OX40 - NF-κB(394). Depuis, les Tconv cytotoxiques ont été décrits dans plusieurs types de cancer(395,395–401). Ces cellules exercent leur capacité anti tumorale via diverses molécules cytotoxiques, principalement les perforines et granzymes. L'expression du GzmB est contrôlée par RelA et p50(402). De plus, il a été montré récemment que le GzmB dans les LT CD8 inactifs est réprimé

par des homodimères de p50(20). Ces données suggèrent une fonction de NF- κ B dans la cytotoxicité des Tconv anti tumoraux, principalement via la voie canonique.

4.7.8. *L'épuisement des Tconv*

Au sein du TME, la stimulation chronique du TCR peut induire l'épuisement des LT(403). Bien décrit dans les LT CD8⁺, les CD4⁺ Tex commencent tout juste à être définis. Ils se caractérisent par une diminution de la prolifération, une diminution de l'expression des cytokines effectrices et une perte de la poly fonctionnalité. Comme les CD8 épuisés, les CD4 Tex expriment des récepteurs inhibiteurs PD-1, CTLA-4, LAG3, TIM3 et TIGIT et le facteur de transcription TOX. Toutefois, il est à noter que ces marqueurs sont aussi communément exprimés par les Tfh, il est donc à ce jour compliqué de séparer les deux populations sur leur simple définition phénotypique ; en ce sens des études d'accessibilité de la chromatine (par exemple par ATAC-Seq) auraient un intérêt majeur. CD39 a aussi été identifié comme un marqueur d'épuisement dans les Tconv. Les Tconv CD39⁺ expriment plus de PD-1, moins de cytokines et corrélaient avec une moins bonne immunité anti tumorale chez des patients atteints de cancer des ovaires, de l'utérus et de la tête et du cou (404). Certaines études suggèrent une augmentation de l'expression de Helios, Klf4, PTPN22, CREM et Blimp1 ainsi qu'une diminution de ThPOK et NFAT dans les Tconv épuisés(91–93,405,406). Les motifs NF- κ B de liaison à l'ADN sont moins accessibles dans les CD8 Tex que dans les CD8 naïfs(407) de plus il a été montré que l'axe LT β R-NF- κ B canonique permet de réduire l'épuisement des LT CD8(121). Ces résultats laissent penser que NF- κ B est inhibé dans les Tex. A ce jour, aucune étude ne fait de lien entre NF- κ B et les Tconv épuisés. Des résultats obtenus lors de ma thèse apportent de premiers éléments suggérant l'antagonisme de NF- κ B et du programme transcriptionnel de l'épuisement.

Comme nous l'avons vu, quelques études ont permis d'explorer plus directement, la fonction de NF- κ B dans l'immunité des cellules T contre le cancer. Bien que centrées sur les LT CD8 et les Treg, elles montrent le contrôle de la réponse T anti tumorale par la voie NF- κ B et les implications thérapeutiques sous-jacentes. L'une des questions principales de ma thèse fut de comprendre quels étaient les rôles spécifiques des sous-unités de NF- κ B dans les Tconv dans le cancer.

4.8. *Tconv et Immunothérapies du cancer*

Les immunothérapies du cancer sont des traitements qui visent à moduler le système immunitaire du patient afin d'augmenter la reconnaissance et la destruction des cellules tumorales. Suivant ce postulat, de nombreux types d'immunothérapies ont été développés. Ces dernières années, trois types de traitements se sont imposés et ont révolutionné la prise en charge des patients : le transfert adoptif de LT exprimant un récepteur antigénique chimérique (CAR), les vaccins thérapeutiques et les inhibiteurs de point de contrôle immunitaire (ICI) ; j'aborderai ces 3 stratégies ci-dessous. En 2018, James Allison et Tasuku Honjo ont reçu les prix Nobel pour leurs travaux sur les ICI. Bien que la plupart des études se soient initialement concentrées sur la fonction des LT CD8⁺, il apparaît désormais que les Tconv sont des acteurs centraux de la réponse aux immunothérapies.

4.8.1. *La vaccination anticancéreuse*

L'identification d'antigènes tumoraux a mené au développement de vaccins contre le cancer qui ont pour but de stimuler les LT spécifiques de tumeurs. Des antigènes tumoraux sont inoculés aux patients sous forme de peptides, protéines, ARN messagers, ADN recombinants ou de DC "pulsés" avec des peptides antigéniques. Des adjuvants peuvent être ajoutés afin d'amplifier/orienter la réponse immunitaire. Les vaccins thérapeutiques visent souvent des antigènes capables d'être présentés par des CMH de classe II afin d'activer les Tconv(408). Les Tconv ainsi activés sont capables d'induire le "help" des LT CD8 cytotoxiques (333) et offrent de bons résultats cliniques chez les patients atteints de plusieurs types de cancer(409–411).

4.8.2. *Transfert de cellules T : exemple des LT CAR*

Partant du postulat de la reconnaissance directe des antigènes par les anticorps (sans avoir besoin de processing et de présentation sur le CMH), les LT CAR sont des cellules modifiées pour exprimer un récepteur à l'antigène chimérique ou CAR(412). Ce récepteur de fusion contient un domaine extracellulaire de type Ig spécifique d'un antigène tumoral, et des domaines

intracellulaires sont composés du CD3 ζ ainsi que de divers domaines à ITAM (historiquement ceux de CD28 ou de 4-1BB pour les CAR dits de 2^e génération)(413). La thérapie LT CAR la plus utilisée consiste à faire exprimer un CAR spécifique de CD19 pour le traitement de certaines leucémies à cellules B. Cette approche, bien que lourde et induisant beaucoup d'effets secondaires, est absolument révolutionnaire et permet à la majorité des patients d'entrer en rémission clinique complète(414). Pour l'instant, les LT CAR sont peu efficaces dans le traitement des tumeurs solides. Cependant, des centaines d'études pré cliniques et d'essais cliniques sont en cours dans lesquels les LT CAR expriment des CAR spécifiques de nombreux antigènes différents. D'autre part, les domaines intracellulaires peuvent être optimisés pour augmenter les signaux d'activation ou même permettre l'expression de gènes exogènes comme l'IL-12(415). A l'inverse, les LT-CAR pouvant aussi s'épuiser, l'invalidation de récepteurs inhibiteurs comme PD-1 semble très prometteuse. De la même manière que pour les transferts de LT (ACT) classiques, l'utilisation de CAR Tconv semble prometteuse. Des études ont montré que l'efficacité des LT CAR était augmentée lorsque des Tconv et des CD8 étaient utilisés en même temps(416,417). De plus, les CAR Tconv semblent moins prône à l'épuisement que les CAR CD8(416,418,419). Les CAR Tconv ont eu du succès chez des patients atteints de glioblastome et de leucémies(416,418,420).

La caractérisation des Tconv suite à leur transfert montre qu'elle présente surtout des phénotypes cytotoxiques ou Th1(416–418,421). Bien que le rôle de NF- κ B n'ait pas été formellement démontré dans l'efficacité des LT CAR, il semble logique de le postuler : en effet la stimulation via les ITAM de 4-1BB ou CD28 conduit naturellement à l'activation de NF- κ B ; de plus comme décrit plus haut, l'invalidation de A20 ou de Dhx37, deux inhibiteurs de NF- κ B, augmente l'activité des LT dans des modèles de transfert adoptifs chez la souris(322,422).

4.8.3. Les inhibiteurs de checkpoint immunitaires

Du fait de leur forte stimulation et de l'influence du microenvironnement, les lymphocytes infiltrant la tumeur augmentent généralement leur expression d'un certain nombre de récepteurs « inhibiteurs » - il s'agit en fait de marqueurs d'activation. Lorsqu'ils sont engagés, ces récepteurs inhibent la voie du TCR/CD28 ; il s'agit normalement d'une boucle de rétrocontrôle négative, détournée par la tumeur pour réduire les capacités antitumorales des LT. L'idée des ICI et de venir bloquer l'engagement de ces récepteurs inhibiteurs avec des anticorps monoclonaux afin de libérer les LT

de leurs freins moléculaires. A ce jour, les trois molécules les plus étudiées et ciblées sont CTLA-4, PD-1 et son ligand PD-L1.

4.8.3.1. *Anti CTLA-4*

CTLA-4 (aussi appelé CD152) est un point de contrôle de la réponse T qui limite l'activation des LT potentiellement auto-réactifs. Cette protéine est exprimée constitutivement par les Treg, mais aussi par certains LT CD8 et Tconv après activation. CTLA-4 se lie aux molécules co-stimulatrices CD80/86 à la surface des CPA. La ligation de CD80/86 diminue leur disponibilité, entraînant une compétition entre CTLA-4 et CD28. De plus, CTLA-4 permet d'enlever CD80/86 à la surface des APC par transendocytose. Il a aussi été proposé que CTLA-4 puisse directement agir comme un récepteur inhibiteur et diminuer l'activation de la voie du TCR ; cependant la littérature est très contradictoire à ce sujet(423). La comparaison transcriptomique de LT WT et déficients pour CTLA-4 n'a pas permis de démontrer de rôle majeur de CTLA-4 dans l'inhibition directe des LT(424). L'Ipilimumab, le premier anticorps thérapeutique anti-CTLA-4, a d'abord été utilisé chez des patients atteints de mélanome métastatique. "Seulement" 15% des patients ont répondu, mais ceux qui répondaient présentaient une rémission à long terme- malgré des effets secondaires assez sévères(425). Depuis, d'autres anticorps anti CTLA-4 ont été développés et plus de 1000 essais cliniques sont en cours dans divers types de cancer(426). Cependant, tout comme le mécanisme inhibiteur de CTLA-4 n'est pas entièrement compris, les mécanismes thérapeutiques des anti-CTLA-4 ne le sont pas non plus. Notamment, la/les cellule(s) cible (Treg, Tconv, CD8) des anticorps n'est pas claire. Chez la souris, l'Ipilimumab déplete très clairement les Treg du microenvironnement(427) tandis que chez l'homme, ce mécanisme est plus sujet à controverses(428). Très vite, des études ont démontré que cette thérapie augmente l'activation des Tconv et notamment du profil Th1 exprimant ICOS(428-430).

4.8.3.2. *Anti PD-1/PD-L1*

PD-1 (aussi appelé CD279) est un récepteur inhibiteur exprimé par les LT. C'est à la fois un marqueur d'activation car les LT naïfs ne l'expriment pas, mais aussi un marqueur d'épuisement ;

son engagement par les ligands PD-L1 et PD-L2 est un des mécanismes majeurs de l'inhibition des LT dans le TME. Lors de son engagement, PD-1 recrute la phosphatase SHP2 (SH2 containing protein tyrosine phosphatase-2) au niveau de sa queue cytoplasmique. SHP2 permet la déphosphorylation de plusieurs événements proximaux du TCR et de CD28 et donc d'inhiber l'activation des LT. La première thérapie par anticorps bloquant PD-1, le pembrolizumab, a été autorisée en 2014 pour le traitement des mélanomes métastatiques(431). Le taux de réponse était meilleur que celui de l'Ipilimumab(432) et même meilleurs que les inhibiteurs de BRAF et de MEK(433) ce qui est une révolution pour le traitement des patients. Depuis, de nombreux anti PD-1 et anti PD-L1 ont été autorisés par le FDA pour le traitement de plusieurs types de cancer, avec des taux de réponse de 5 à ... 100%(434). Beaucoup d'études se sont intéressées à l'action de ces thérapies sur les LT CD8 intra tumoraux. La réponse et le rôle des Tconv a été beaucoup moins étudiée mais a récemment émergé comme une variable clé dans la réponse à l'anti-PD-1. Une forte corrélation entre la présence de TLS/Tfh intra tumoraux et la réponse aux thérapies ICI a été montrée dans plusieurs types de cancer ainsi qu'une augmentation des Tconv ICOS⁺ (et donc potentiellement des Tfh)(313,385–388,435). Les Tconv cytotoxiques ont aussi une valeur prédictive de la réponse aux anti-PD-1 dans les formes métastatiques du cancer de la vessie(397). Dans des modèles murins de lymphome de Hodgkin et de mélanome, il a été montré que les Tconv cytotoxiques et les Tfh sont nécessaires pour la réponse à l'anti PD-1(313,436). Ces données ont récemment été étoffées par une étude du groupe d'Ido Amit, qui a identifié une interaction entre des Tconv CD4⁺PD1⁺CXCL13⁺ et des DC-LAMP⁺, (437) requise pour la réponse à l'anti-PD-1(438). Dans leur étude, le transfert de Tconv Tht OT-II dans des souris porteuses de tumeurs B16-OVA permettait d'ailleurs une meilleure réponse à l'anti PD1 que le transfert de LT CD8 OT-I. Une autre étude a conclu que les Tconv épuisés (PD-1⁺ CD39⁺) sont aussi capables de répondre à l'anti PD1 et par la suite d'induire la prolifération des LT CD8+(404).

Des analyses transcriptomiques globales et unicellulaires d'échantillons de tumeurs obtenus de patients avant et après l'administration d'anti-CTLA4 et/ou d'anti-PD-1 ont démontré que l'augmentation de la régulation des gènes dépendant de NF-κB, tant dans les cellules tumorales que dans les cellules immunitaires, est à la base de la réponse clinique aux thérapies ICI(439,440). Parmi ces gènes se trouvent plusieurs cytokines et chimiokines importantes(441). Cependant avec ces analyses il est difficile de savoir si l'activation de NF-κB est impliquée dans la réponse ou si c'est juste un marqueur de réponse. D'un point de vue mécanistique, il a été proposé que l'engagement de CTLA-4 ou PD-1 sur les cellules T, peut réduire l'activation de NF-κB par le

recrutement de la de la phosphatase SHP-2 et de la phosphatase protéique (PP)2A, ce qui entraîne une réduction de la signalisation en aval du TCR et du CD28(442–445).

Toutefois ces données fondamentales sont à remettre dans le contexte historique de l'efficacité des inhibiteurs de NF- κ B dans des modèles pré-cliniques de cancer. Ainsi, l'inhibition de Malt-1, IKK β et c-Rel potentialise l'efficacité des anti-PD-1 dans des modèles de mélanome ou de thymome. Ainsi donc NF- κ B pourrait avoir à la fois un rôle protecteur via son rôle dans les Tconv et une fonction délétère via les Treg et les cellules tumorales. Ce point sera discuté plus en avant dans la discussion.

4.8.3.3. *Autres thérapies ciblant des récepteurs de surface des LT*

Depuis le succès des anti-PD-1 et des anti-CTLA-4, à peu près tous les membres des familles CD28 et TNFRSF ont été ciblés par des anticorps antagonistes et agonistes, avec plus ou moins de succès(446). Concernant le blocage des récepteurs inhibiteurs, on citera notamment un anticorps anti-LAG3, qui améliore la survie sans rechute des patients atteints de mélanome métastatique en combinaison avec un anti-PD1(447).

Plutôt que de “lever les freins” qui bloquent les fonctions des LT, certaines thérapies cherchent à “appuyer sur l'accélérateur”. C'est le cas des anticorps monoclonaux agonistes de récepteurs co-stimulateurs. On pourra citer par exemple GITR et OX-40, deux récepteurs de la famille des TNFRSF fortement exprimés à la surface des Treg et induits sur les Tconv suite à leur activation. L'engagement de ces molécules semble stimuler la prolifération/ fonction des LT effecteurs et diminue le nombre (pour GITR) et la fonction (pour OX-40) des Treg. Bien que prometteurs chez la souris(448,449), ces anticorps ne semblent pas efficaces chez l'homme, administrés seuls ou avec un anti-PD1(450–453).

4-1BB est lui aussi un membre de la famille des TNFRSF ciblé en clinique. Plusieurs agonistes sont en ce moment en phase d'essais cliniques mais avec des résultats mitigés. Un agoniste faible, l'Utomilumab permet la déplétion des Treg et l'expansion des LT effecteurs dans le sang des patients mais ne permet pas d'amélioration clinique chez des patients présentant des cancers avancés(454). A l'inverse, l'Urelumab est un fort agoniste de 4-1BB qui induit la cytotoxicité des LT, semble prometteur mais son utilisation est toxique et entraîne beaucoup d'effets indésirables

chez les patients(455). Globalement, ces différentes thérapies ne sont pas efficaces chez l'homme. Il est important de mieux comprendre la signalisation de ces différents récepteurs dans les différentes cellules cibles pour exploiter leur potentiel. Tous ces récepteurs signalent (en outre) via les voies NF- κ B, cependant le détail de la fonction des différentes sous-unités est inconnu. Ainsi des analyses biochimiques et immunologiques sont nécessaires pour peut-être un jour, traiter avec succès le cancer par des agonistes de TNFRSF/CD28.

5. La sclérose en plaque

5.1. Introduction générale de la maladie

La SEP est une maladie auto-immune chronique atteignant le SNC (cerveau + moelle épinière). Une activation aberrante du système immunitaire mène à une dégradation de la myéline qui recouvre les neurones. Les dysfonctions neurologiques de la SEP sont associées à ces lésions focales au niveau de la myéline. Près de 3 millions de personnes dans le monde serait atteint par cette maladie, bien que ce chiffre soit probablement sous-évalué dû au manque de données dans certains pays. En France ce sont 110 000 personnes qui sont concernées. Majoritairement diagnostiquées chez les jeunes adultes, la maladie peut aussi se manifester dès l'enfance ou chez les seniors. Les femmes sont plus susceptibles d'être atteintes de la SEP que les hommes. En France, elles représentent 3 patients sur 4(456). La SEP doit son nom aux lésions fermes (scléreuses), ou plaques, se développant dans les substances blanches et grises du SNC.

Les symptômes de la SEP sont variés et différents d'une personne à l'autre. Ils dépendent notamment des zones de la moelle épinière, du cerveau des nerfs optiques sujettes aux attaques inflammatoires. Ils sont regroupés dans les catégories suivantes : troubles optiques ; troubles de la perception et de la sensibilité ; troubles de l'équilibre et de la coordination ; troubles moteurs ; fatigue inhabituelle et symptômes touchant l'intellect et l'humeur.

5.2. Causes

Les causes induisant le développement de la sclérose en plaque sont longtemps restées floues. Aujourd'hui, des facteurs génétiques et environnementaux ont été identifiés. Notamment, de récents travaux sur le priming des lymphocytes T dans les poumons, de la peau et des intestins mettent en lumière un rôle majeur du microbiote. Toutefois il reste clair que les causes sont systématiquement multiples et propres à chaque patient.

5.2.1. Génétiques

De nombreuses études ont été menées pour découvrir des biomarqueurs génétiques de la SEP. L'héritabilité de la SEP au sein de familles montrent clairement son caractère génétique. Plus de 200 régions du génome ont été associées avec une susceptibilité à la SEP. Parmi elles, la région HLA du chromosome 6 semble très fortement associée avec une susceptibilité à la maladie. 32 régions du MHC ont récemment été qualifiées de locus de susceptibilité à la SEP(457). Notamment, les porteurs du complexe HLA-DRB1*15:01 sont trois fois plus susceptibles à la SEP que les non porteurs(458).

Des locus non-HLA ont aussi été décrits comme étant des facteurs de prédisposition à la SEP. Une méta analyse de "l'International Multiple Sclerosis Genetics Consortium" (Consortium international de génétique de la SEP) datant de 2019 a identifié 200 variants autosomaux de susceptibilité en dehors du complexe MHC(457). Les loci enrichis significativement sont majoritairement présents dans les cellules immunitaires mais très peu dans les tissus du SNC. Ils sont notamment présents dans les microglies. Parmi les 200 variants non associés aux CMH, plusieurs tombent dans des gènes de la voie NF- κ B ou à proximité. Ainsi les gènes Card11, Bcl10, Malt1 TNFAIP3, NFKB1, NFKBIZ sont des gènes de susceptibilité à la SEP(457,459).

5.2.2. Environnementales

Les causes environnementales de la sclérose en plaque sont multiples et souvent liées aux causes génétiques. De très nombreuses études ont été menées pour corrélérer le développement de la SEP aux différents événements/paramètres de la vie des patients. Les facteurs de risques principaux sont le manque de vitamine D, la cigarette, avoir souffert de la mononucléose et être séropositif pour des IgG anti EBNA (protéine Epstein-Barr virus nuclear antigen) 1(460). Ce dernier paramètre étant une avancée majeure récente dans le domaine de la SEP, je vais l'exposer plus en détail. Le développement de la mononucléose et la séropositivité aux IgG anti EBNA1 sont donc associés à une infection par le virus Epstein-Barr (EBV). La forte corrélation entre de fort taux IgG anti EBNA1 dans le sérum et le développement de la SEP est bien connue(461). Une infection primaire par EBV avant l'âge de 10 ans est généralement asymptomatique ou entraîne des symptômes banals. Cependant l'infection primaire chez les adolescents et jeunes adultes peut causer une mononucléose infectieuse en plus de complications graves. Une immense majorité de la population a été infectée par EBV mais seulement quelques personnes développent la mononucléose. Du fait de la forte corrélation entre la SEP et la mononucléose(460,462), Il est possible que seul une infection primaire tardive par EBV soit réellement à l'origine de la SEP. Pour corroborer cette hypothèse, une récente analyse longitudinale sur une cohorte de 10 millions de militaires américains a montré un risque 32 fois plus élevé de développer la SEP suite à une infection par EBV durant leur service(463). Pour finir, les individus porteur du gène HLA-DRB1*1501 et ayant développé une infection symptomatique à EBV ont une susceptibilité à la SEP encore accrue(464). Les potentiels mécanismes expliquant le développement de la SEP suite à une infection par le virus Epstein-Barr sont actuellement étudiés et seront discutés dans la suite de cette introduction.

5.3. Traitements

Les traitements actuels ne permettent pas encore de guérir de la SEP. Cependant, les traitements immunomodulateurs et immunosuppresseurs permettent un bénéfice significatif en diminuant la fréquence des poussées et freinent la progression du handicap. Lors des poussées, les patients sont traités avec des corticoïdes. En traitement de fond, les patients reçoivent des interférons et peginterférons(456). Les patients qui ne répondent pas aux traitements peuvent recevoir des molécules immunosuppressives plus puissantes. Une des thérapies les plus efficaces à ce jour est

l'utilisation d'anticorps anti-CD20 déplétant. Cela permet de dépléter les lymphocytes B qui sont hautement pathogènes dans la maladie.

5.4. Physiopathologie

5.4.1. L'EAE comme un modèle d'étude de la SEP

Afin d'étudier les mécanismes de la SEP, des modèles murins ont été développés. Bien que ne pouvant pas parfaitement refléter le cours de la SEP, ils ont permis de comprendre les acteurs cellulaires et les certains mécanismes de la pathologie, et de mettre en évidence des cibles thérapeutiques. L'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE) est le modèle animal le plus utilisé pour étudier la SEP. Beaucoup d'évènements moléculaires et cellulaires identifiés grâce à des modèles EAE se sont révélés pertinents chez les patients atteints de SEP. L'EAE est donc très utile pour comprendre la physiopathologie de la SEP et identifier des candidats thérapeutiques(465). Cependant, cela reste un modèle expérimental qui ne correspond pas totalement à la maladie chez l'homme. Ce modèle qui se décline en une grande variété de protocoles a toujours pour but d'induire une inflammation du SNC et l'activation et le recrutement de lymphocytes T spécifiques de la myéline.

Comme pour la SEP chez l'homme, l'EAE induit une grande variété de symptômes. Le symptôme principal est une paralysie progressive qui progresse depuis la queue vers les membres antérieurs. Afin de quantifier la progression de la maladie, des échelles de score de symptômes cliniques ont été mises en place. Au sein du laboratoire nous utilisons l'échelle de Hooke(466) qui correspond à une mesure de la paralysie progressive (voir articles).

Il existe 3 grandes méthodes d'induction de l'EAE:

L'EAE dite « active » consiste à immuniser le SNC avec des peptides myéliniques tout en induisant une inflammation. Les peptides utilisables sont multiples, les principaux étant la protéine protéolipidique, l'homogénat de moelle épinière, la protéine basique de la myéline (MBP) ou encore la glycoprotéine des oligodendryocytes de la myéline (MOG). Ces peptides sont généralement émulsionnés dans de l'adjuvant de Freund complété par un extrait de *Mycobacterium*

Tuberculosis afin d'induire l'inflammation. La toxine pertussique est aussi souvent utilisée pour perméabiliser la barrière hémato-encéphalique(467).

L'EAE « passive » se fait par transfert adoptif de T encéphalogéniques. Ces LT sont isolés à partir de souris dans lesquelles une EAE active a été induite(468). Les lymphocytes T peuvent être marqués afin de traquer leur déplacement et activation dans le CNS(469). Ce modèle a contribué à montrer l'importance des lymphocytes T dans cette pathologie ainsi qu'à étudier les mécanismes sous-jacents.

Des modèles d'EAE spontanée ont été développés par manipulation génétique. Les souris sont modifiées afin d'exprimer des TCR spécifiques pour différents antigènes myéliniques. L'un des premiers modèles d'EAE spontanée date de 1994, avec le développement de souris C57BL/6 génétiquement modifiées pour avoir des lymphocytes CD4 exprimant un TCR spécifique de MBP(470). 14% d'entre elles développent des signes de l'EAE dans les 12 mois. Lorsque ces souris sont croisées avec des souris RAG1-KO afin que le TCR spécifique de MBP soit le seul exprimé, 100% des souris développent des signes d'EAE. Cette étude a permis de montrer que l'EAE est déclenchée par une activation *in situ* de lymphocytes CD4 monospécifiques de la myéline. Dans un autre fond génétique, les souris SJL transgéniques exprimant un TCR spécifique du MOG₉₂₋₁₀₆ développent spontanément une EAE rémittente(471). Il existe aussi des modèles d'EAE spontanés avec des souris humanisées. La co-expression du récepteur humain CD4, différents complexes HLA et le TCR d'un patient atteint de SEP spécifique de MBP₈₄₋₁₀₂. Cela a permis de valider que HLA DRB1*1501 est un complexe de susceptibilité à la SEP(472).

En parallèle des modèles classiques, d'autres modèles de SEP induits par des toxines existent chez la souris mais aussi d'autres animaux de laboratoire.

5.4.2. *Le rôle critique des Tconv dans la SEP*

Les mécanismes auto immuns à l'origine de la SEP sont de mieux en mieux définis. En complément de nombreuses études chez les patients, les modèles d'EAE ont permis d'établir les processus moléculaires et cellulaires orchestrant la pathologie. Il apparaît que les lymphocytes T et B sont des acteurs majeurs dans cette maladie. Ces cellules immunitaires sont présentes au niveau des lésions dans le cerveau et la moëlle des patients(473–477). Des lymphocytes T sont bien présents

dans les cerveaux non enflammés, mais leur nombre est très largement augmenté dans les cerveaux de patients atteints de SEP et sont plus spécifiquement enrichis au niveau des lésions actives que dans les lésions inactives. Chez l'homme (et à l'inverse de la souris), ces LT sont majoritairement CD8⁺, suggérant un rôle important dans la pathologie, et complémentaire des LT CD4⁺ qui seront détaillés plus bas. Ces altérations des LT dans le tissu enflammé ont également été retrouvées dans le LCR. Dans une récente étude, une analyse de sc-RNAseq a été conduite sur du sang et du LCR de patients atteints de SEP, comparé à des donneurs sains(478). Cette étude montre peu de différence de population immunitaires dans le sang mais une augmentation des marqueurs d'activation et de migration sur les lymphocytes T. Les patients atteints de SEP ont une augmentation du nombre absolu de lymphocytes T, B, plasmoblastes et NK dans le LCR(478–480). Il y a notamment une forte augmentation d'un cluster de lymphocytes T CD4⁺ “cytotoxiques” exprimant du GzmB, de la perforine 1 et la chimiokine Chemokine (C-C motif) ligand- (CCL)5.

Cette accumulation de LT activés chez les patients, suggère un rôle pathogénique qui a été très largement démontré dans l'EAE. Dans cette partie, je détaillerai les mécanismes immunitaires de la SEP en me concentrant majoritairement sur le rôle des lymphocytes CD4⁺ Tconv. Ces cellules semblent jouer un rôle pathogénique majeur dans la SEP(481–484). Leur rôle est notamment souligné par le fait que les gènes de susceptibilité à la SEP sont principalement des allèles HLA de classe II.

Au début des années 80 une étude majeure a démontré le pouvoir pathogénique des LT dans l'EAE. Des LT CD4⁺ pathogéniques spécifiques de la MBP ont été décrits pour la première fois(485). Ces LT ont été isolés à partir de ganglions de rats immunisés par MBP et cultivés *in vitro* pour en faire une lignée stable. Le transfert de ces cellules dans des rats naïfs induit une paralysie aiguë en seulement 2-3 jours. Cette étude a depuis été répétée, montrant que les Tconv spécifiques de la myéline peuvent induire l'EAE(486,487). D'ailleurs, l'EAE active est généralement induite par immunisation avec un peptide de myéline (MOG ou MBP) chargé sur du CMH de classe II, et donc induisant une réponse CD4. Dans le LCR et le SNC, une partie des Tconv sont spécifiques de peptides associés au SNC et présentent une autoréactivité(488,489). Dans le sang, la présence de lymphocytes CD4⁺ spécifiques de MBP et la β -synucléine, un antigène de la substance grise du cerveau, a été détectée chez des patients atteints de SEP rémittente mais aussi progressive. Cependant, la fréquence des CD4-MBP était plus forte chez les patients présentant la forme rémittente de la maladie tandis que celle des CD4- β -synucléine était surtout augmentée chez les patients atteints d'une forme progressive(490). En utilisant un modèle de rat, les chercheurs ont

démontré que les lymphocytes T spécifiques de MBP infiltrent la substance blanche tandis que les T spécifiques de la β -synucléine et infiltrent la substance grise. De ce fait, la localisation des lésions semble dépendre de la spécificité antigénique des lymphocytes.

5.4.3. Les différents types LT CD4⁺ pathogènes dans l'EAE et la SEP

5.4.3.1. Th1 ou Th17 ?

Le rôle des Th1 dans la SEP est largement débattu. Initialement, il a été montré que les Th1, mais pas les Th2, spécifiques de la myéline, étaient capables d'induire une EAE forte(491). Ceci est corroboré par l'augmentation du profil Th1 dans le sang, le LCR et le SNC des patients(478,489,492). Cependant, la délétion de l'IFN γ , la cytokine signature des Th1 ou du récepteur à l'IFN γ (IFN γ R) n'empêche pas l'induction de l'EAE(493). En accord avec ces résultats, il a été montré dans un modèle d'EAE que les Th1 n'infiltrent le SNC après l'apparition des premiers symptômes cliniques. *In vitro* les Th1 spécifiques du MOG en co-culture avec des cellules gliales n'induisent pas la sécrétion de cytokines inflammatoires(494). Les Th17 sont maintenant considérés comme la population pathogénique dans l'EAE(192–194). Ils sont massivement présents dans le SNC des souris EAE(495) et ce avant même le développement des symptômes cliniques(494). Chez l'homme, les LT IL-17⁺ sont plus présents au niveau des lésions actives que des lésions inactives du cerveau(496); par contre dans le LCR, les modules transcriptomiques Th17 ne semblent pas varier entre le groupe de patients atteint de SEP et le groupe contrôle(478). Les souris *Il6*^{-/-} immunisées avec du MOG₃₅₋₅₅ sont résistantes à l'EAE et présentent un déficit de production d'IL-17 par les lymphocytes T du SNC(195). Les souris déficientes pour ROR γ t elles sont partiellement résistantes(189). Heon Park et ses collègues ont démontré que l'immunisation de souris avec du MOG₃₅₋₅₅ et de l'adjuvant de Freund complet (CFA) permettait la production d'IL-17 par une sous population spécifique de lymphocytes T CD4⁺ antigènes spécifiques(497). Cependant, l'inhibition de l'IL-17, soit en utilisant des anticorps bloquant(495,497) soit en utilisant des souris transgéniques déficientes pour le gène de l'IL-17a(193,498) réduisait et retardait sensiblement les symptômes cliniques de l'EAE mais n'empêchait pas totalement la maladie. L'inhibition de l'IL-17a ne réduit pas le priming des lymphocytes T mais plutôt diminue l'expression de chimiokines inflammatoires (CXCL1, CCL7, CCL2) ce qui résulte en une

diminution de l'infiltration des lymphocytes T CD4⁺ et des macrophages dans le SNC. A l'inverse, la surexpression de l'IL-17a spécifiquement dans les lymphocytes T ne changeait pas le cours de l'EAE(498). Les souris transgéniques déficientes pour toutes les cytokines signatures des Th17 restent toutes plus ou moins susceptibles à l'EAE, à l'exception du GM-CSF dont je vais discuter dans la partie suivante(499). Une étude récente challenge le rôle de l'IL-17a en tant que cytokine encéphalogénique mais suggère plutôt que l'IL-17a et IL17f sont des régulateurs critiques du microbiote intestinal. Ces altérations du microbiote corrèlent avec la résistance à l'EAE des souris transgéniques *Il17a*^{-/-} et *Il17f*^{-/-}. En manipulant le microbiote de ces souris, les auteurs de l'étude ont pu rétablir leur sensibilité à l'EAE(500). Enfin, de manière indirecte certaines études semblent suggérer un rôle indirect des Th17 dans la perméabilisation de la barrière hémato-encéphalique(501).

5.4.3.2. ... GM-CSF !

Actuellement, le consensus est qu'on ne peut pas attribuer le rôle pathogénique dans l'EAE et la SEP à une population précise de Thelper. Il semble plutôt que ce soit une population hybride entre les Th1 et les Th17. Cette population est parfois appelée Th1/Th17, Th17 pathogéniques ou encore Th17*. Dans des modèles d'EAE, ces cellules infiltrent le SNC des souris avant l'apparition des premiers symptômes cliniques et induisent la production de cytokines inflammatoires, notamment du GM-CSF et l'activation des microglies(494). En 2011, deux études ont identifié le GM-CSF comme la cytokine pathogénique dans l'EAE(499,502). Dans une étude très élégante utilisant de nombreux modèles murins de souris, l'équipe de Burkhard Becher a démontré que parmi toutes les cytokines produites par les lymphocytes T, le GM-CSF semble être la seule absolument nécessaire pour donner des propriétés pathogéniques aux lymphocytes T(499). Les Thelper autoréactifs déficients en GM-CSF ne peuvent induire de neuroinflammation malgré des niveaux d'expression d'IL-17a et d'IFN γ normaux. A l'inverse, Les Thelper *Ifng*^{-/-} et *Il17a*^{-/-} produisent des niveaux de GM-CSF normaux(498–500), suffisants pour induire l'EAE. De plus, les Th1 et les Th17 stimulés avec de l'IL-23 sont capables d'acquérir la capacité de produire du GM-CSF suite à l'activation de ROR γ t. Enfin, toujours dans la même étude, les auteurs ont montré que le GM-CSF agit comme une cytokine pro inflammatoire en induisant le recrutement, l'activation et la maturation des macrophages et des cellules dendritiques. L'inhibition du GM-CSF entraîne une

forte diminution de la migration des cellules Ly6C⁺ dans le SNC(503). En délétant le récepteur au GM-CSF dans plusieurs sous populations immunitaires, l'équipe de Burkhard Becher a par la suite démontré que les cellules répondant aux GM-CSF sont les monocytes CCR2⁺ (504). Leur activation par le GM-CSF induit la transcription de gènes associés à la phagocytose, importante pour la démyélinisation mais aussi pour l'expression de chimiokines et de l'IL-1, contrôlant ainsi une probable boucle d'amplification pro-inflammatoire. Cette équipe a aussi mis au point une souris reproductrice de l'expression du GM-CSF qui a permis de montrer que les Thelper étaient les principaux producteurs de GM-CSF dans le SNC(505) et plus spécifiquement une sous population spécifique de Thelper encéphalo pathogéniques. Lorsque cette sous population est déplétée, l'EAE est totalement inhibée. La surexpression du GM-CSF par les Thelper induit une neuro inflammation spontanée(506). Les Thelper encéphalo pathogéniques définis par l'équipe de Burkhard Becher ont des homologues chez les patients atteints de SEP(507,508). Ces cellules sont définies comme des Thelper GM-CSF⁺, CXCR4⁺. Cependant certaines études ont identifiés des Thelper avec un phénotype cytotoxique (EOMES, GzmB, perforin1) dans le LCR et le sang de patients mais qui n'expriment pas de GM-CSF(478,489,509). La neuroinflammation provoquée par l'IL-17a et le GM-CSF produits par les Tconv est résumée en figure 6.

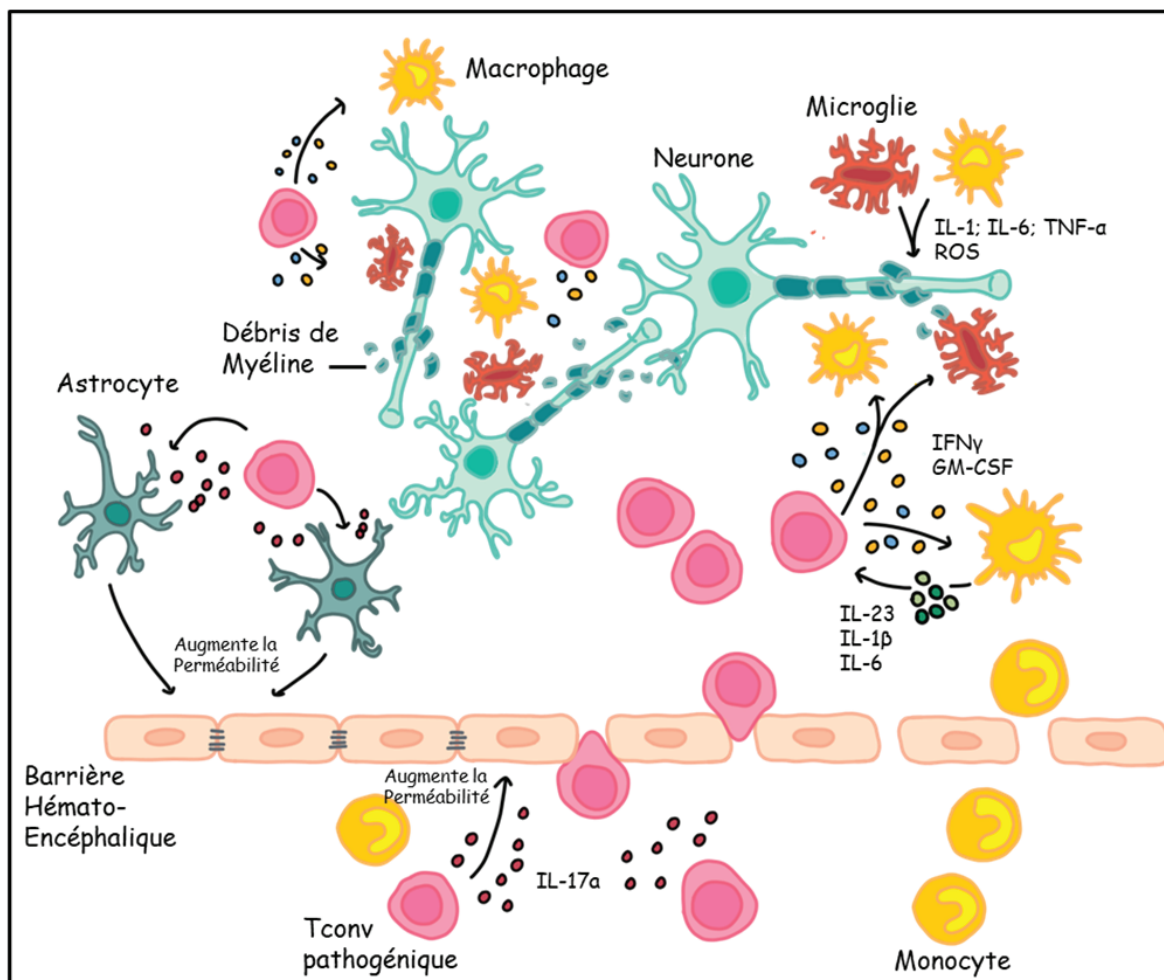


Figure 6: Les Tconv pathogéniques promeuvent la neuro-inflammation dans l'EAE.

Une fois les Tconv réactifs de la myéline activés, ils migrent au niveau de la barrière hémato-encéphalique (BBE). L'IL-17a produit par les Tconv a un impact direct sur l'intégrité de la BBE. Les Tconv et autres cellules immunitaires peuvent alors migrer dans le SNC. De plus, l'IL-17a stimule les astrocytes qui vont à leur tour attaquer la BBE. Une fois dans le SNC, les Tconv produisent de grandes quantités de GM-CSF ce qui active les macrophages dérivés de monocytes et les microglies qui vont alors acquérir des capacités pro-inflammatoires destructrices. Ces cellules produisent diverses cytokines et espèces réactives d'oxygène qui vont dégrader la myéline présente sur les axones. Les macrophages sont aussi capables de produire des cytokines qui agissent sur les Tconv pour augmenter leur nombre pathologique, ce qui forme une boucle d'amplification inflammatoire. Librement adaptée de Becher *et al*, Nat Rev Immunol, 2017

5.4.4. *Le rôle du microbiote intestinal dans l'activation des Tconv*

L'impact du microbiote intestinal dans le développement de la SEP a récemment été mis en lumière. Dans une étude de 2008, il a été montré que moduler le microbiote de souris EAE en leur donnant des cocktails d'antibiotiques atténuait les symptômes d'EAE. Cet effet est corrélé à une réduction du profil Th17 dans les ganglions mésentériques(510).

De même, les souris transgéniques SJL/J exprimant le TCR spécifique du MOG₉₂₋₁₀₆ développent l'EAE dans une animalerie SPF (sans pathogènes mais permettant une colonisation microbienne « classique ») mais pas dans des conditions « germ-free » (GF, sans aucun germe). La recolonisation de ces souris avec un microbiote commensal restaure la différenciation Th17 et l'apparition de symptômes cliniques. Ces observations confortent l'hypothèse d'un priming des lymphocytes T autoréactifs dans les tissus lymphoïdes de l'intestin(511). Suite à cela les lymphocytes T prolifèrent, rejoignent le SNC et recrutent les lymphocytes B autoréactifs. Ensemble, les lymphocytes T et B induisent une forte inflammation résultant en la destruction de la gaine de myéline des neurones et conduisant au développement des symptômes(512). Chez l'homme, le rôle du microbiote est également en train d'émerger. Une étude pionnière, chez des jumeaux monozygotes, suggère également un rôle majeur du microbiote chez l'homme. Dans cette fratrie, un jumeau est atteint de SEP et l'autre non. Le transfert de fèces de l'individu atteint, mais (presque) pas du jumeau sain induit une forte EAE chez des souris transgéniques exprimant un TCR anti-myéline(513). D'une manière générale, certains taxons bactériens sont significativement plus présents chez les patients atteints de SEP(514). Ainsi, comme dans la majorité des réponses immunitaires, le microbiote intestinal semble avoir un rôle majeur dans le développement de l'auto-immunité, en particulier de la SEP, et constitue une cible thérapeutique de choix.

5.4.5. *Infection EBV et réponses T pathogéniques dans la SEP*

Comme expliqué précédemment, le développement de la SEP est fortement corrélé à la mononucléose et la présence d'Ig anti EBNA1(460–463). Une récente étude a permis de démontrer un mimétisme moléculaire de forte affinité entre EBNA1 et la protéine GlialCAM, exprimée dans

le SNC. Ainsi, chez les patients atteints de SEP, des plasmoblastes spécifiques de EBNA1 présents dans le LCR peuvent produire des IgG se liant à GlialCAM(515). Au-delà de ce mimétisme moléculaire d'un épitope B, EBV semble aussi être associée à une réponse T auto réactive. La présentation d'antigènes dérivés d'EBV par deux allomorphes de HLA-DR15, DR2a et DR2b, peut induire des Tconv autoréactifs chez les patients atteints de SEP(516). Ainsi, il semble de plus en plus évident que des antigènes d'EBV, lorsqu'ils sont présentés par des complexes HLA de classe 2 avec des polymorphismes associés à la SEP, vont avoir une structure moléculaire très semblable à certains épitopes de GlialCAM. Les lymphocytes T CD4⁺ spécifiques d'EBNA1 vont ainsi pouvoir reconnaître des épitopes dans le SNC, activer et induire une inflammation pathogénique en association avec des LB, induisant le développement de la SEP. Les LB étant un réservoir de virus EBV, d'autres études suggèrent que lors d'infection d'EBV persistante dans le SNC, les lymphocytes cytotoxiques, en reconnaissant les antigènes viraux à la surface des lymphocytes B, s'activent de manière incontrôlée et provoquent des dommages neuronaux. Enfin, il semble que certains LT CD8⁺ puissent aussi présenter une cross réactivité entre EBV et des antigènes du SNC(517). Ces découvertes, au-delà de leur intérêt majeur dans la compréhension de la physiopathologie de la SEP, présentent un fort potentiel en thérapie, avec par exemple des possibilités de vaccinations anti-EBV ou des molécules antivirales.

5.5. *NF-κB, inflammation et auto-immunité : une relation centrale dans le développement de la SEP*

5.5.1. *Macrophages/microglies*

Les cellules de la microglie sont les macrophages résidant dans le SNC et constituent sa première ligne de défense. Toutefois ces cellules ont un phénotype très activé dans les lésions de SEP et participent au développement de la maladie(518). Une augmentation de l'activité de la voie canonique de NF-κB a été décrite dans les macrophages et les microglies chez les patients atteints de SEP et dans les souris EAE(519,520). Cette hyperactivation corrèle avec l'activité des lésions de la myéline. Les souris LysM-Cre *Nfkb1a*^{fl/fl}, LysM-Cre *Ikkb*^{fl/fl} et Cx3cr1-CreER^{T2} *Tak1*^{fl/fl}, chez

lesquelles la voie canonique est altérée dans les macrophages et microglie, ont permis d'établir la fonction cruciale NF- κ B dans l'activation des microglies et macrophages pro inflammatoires du SNC(520–522). Mécanistiquement, l'activation de NF- κ B induit l'expression de cytokines et chimiokines pro inflammatoires, notamment IL-1 β et CCL2, et CMH de classe II. En conséquence, les souris mutantes présentent moins d'infiltrat T et sont largement protégées contre la maladie(520). La même équipe a montré que la délétion de A20, une protéine inhibitrice de la voie canonique de NF- κ B, donne des résultats inverses, confirmant le rôle pro inflammatoire et pathogénique de la voie canonique de NF- κ B dans les microglies(523). En accord avec ces résultats, l'inhibition de c-Rel dans macrophages induit une diminution des symptômes de l'EAE, corrélée avec une baisse de l'inflammation et de l'infiltration, notamment des Th1 et Th17(524). Concernant le rôle de la voie alternative de NF- κ B, une augmentation de dégradation de p100 en p52 a été décrite dans les microglies de souris EAE comparé à des souris non immunisées. L'utilisation du modèle de souris Cx3cr1-CreER^{T2} x *Map3k14*^{fl/fl} ainsi que des souris *Nfkb2*^{lym1/+} ont permis de montrer un rôle critique de la voie alternative dans l'activation des microglies pro inflammatoire et la progression de l'EAE(525).

5.5.2. *Lymphocytes B*

De nombreuses études soulignent le rôle majeur de la voie NF- κ B et de ses différentes sous-unités dans la biologie des lymphocytes B, j'ai moi-même écrit une revue qui récapitule ces fonctions(526). Il a été montré que la stimulation de CD40 sur des lymphocytes B conduit à une activation de RelA plus importante dans les lymphocytes B de patients SEP comparés à des contrôles sains(527). Cependant, sans stimulation du CD40, pas de différence d'activation de NF- κ B n'est observée dans les lymphocytes B du sang(528). Dans le LCR, une forte activation de la voie NF- κ B a été observée dans les lymphocytes B mémoires(480). Compte tenu du rôle majeur des lymphocytes B dans la SEP et l'EAE, il semble probable que moduler la voie NF- κ B dans cette population ait un effet important sur le développement de la maladie. Cependant, aucune étude *in vivo* pour étudier la régulation des lymphocytes B du SNC par NF- κ B n'a été conduite à ce jour.

5.5.3. *Lymphocytes T*

L'étroite relation entre NF- κ B et l'autoimmunité médiée par les lymphocytes T a commencé à être dévoilée il y a plus de 25 ans. Les souris porteuses d'une délétion germinale de *Relb* meurent d'un syndrome auto-immun multifocal environ six semaines après leur naissance(87). Bien que ces souris présentent une forte activation des lymphocytes T et B, le mécanisme est en fait extrinsèque. En effet, RelB est nécessaire au bon développement des cellules épithéliales thymiques médullaires (mTEC) et à l'expression de AIRE (Autoimmune regulator)(529,530). En conséquence, la sélection négative est défectueuse, les LT autoréactifs ne sont pas éliminés correctement et attaquent les tissus sains. Depuis, de nombreuses études ont été menées sur le sujet et des fonctions intrinsèques aux lymphocytes T de NF- κ B ont été démontrés dans le développement auto immuns et inflammatoires(122,322). Dans le cas de la SEP, de plus en plus de travaux dévoilent l'importance du contrôle des lymphocytes T pathogéniques par NF- κ B. Des études faites sur des LT isolés à partir de sang de patients ont montré une plus grande translocation nucléaire de RelA chez les patients atteints de SEP comparés aux donneurs sains(459). De plus, chez un même patient, l'expression de gènes cibles de NF- κ B dans les LT est augmentée pendant les rechutes par rapport aux phases de rémission(531).

Une série entière d'études faites ces 20 dernières années suggère un rôle direct de NF- κ B dans la pathogénicité des LT au cours de l'EAE. Tout d'abord, comme je l'ai décrit dans la partie 3.4 sur la polarisation des Thelper, la voie NF- κ B est très importante dans la polarisation *in vitro* des LT naïfs en Th17 une population clé dans l'EAE.

Plus directement, en amont des sous-unités de NF- κ B, les souris déficientes pour *Carma1* ou *Malt1* sont protégées contre l'EAE(163,197). Dans ces souris, les Thelper expriment peu de GM-CSF et d'IL-17a alors que l'expression de ROR γ t est inchangée. Cela suggère un contrôle direct de l'expression des cytokines pathogéniques par NF- κ B. Ces résultats sont corroborés dans des modèles d'ablation de IKK β ou expression I κ B α - (Δ N)-Tg spécifiquement dans les LT(163,198). Les souris présentant une ablation de *Nfkb1* dans la lignée germinale, sont aussi partiellement protégées contre la maladie. L'inflammation du SNC est moins forte que dans les souris témoins. *In vitro*, la polarisation des CD4 spécifiques de MOG en Th1/Th2 est défectueuse(532). Cette étude datant de 1999, aucune donnée n'est présentée sur les Th17/ Thelper pathogéniques.

Le rôle de la sous unité canonique c-Rel a été exploré plus en détails. Des modèles de transfert de moelle osseuse et de transfert adoptifs de LT suggèrent que l'expression de c-Rel dans les lymphocytes est requise pour la polarisation Th1 et Th17 ainsi que le développement de la maladie(84,167). Toutefois nos données remettent en cause ces conclusions, toutes obtenues via l'utilisation de souris porteuses de délétions germinales de *Rel* (voir Article 1).

De la même manière, l'inhibition de la voie alternative de NF-κB dans les lymphocytes T, avec notamment des souris CD4-Cre *Map3k14*^{flox/flox} expose le rôle de cette voie dans la régulation des fonctions pathogéniques Th1/Th17 et l'induction de l'EAE(116,173,206). p52, la forme tronquée, et donc active, de NF-κB2 est requise pour l'induction de l'EAE. Le mécanisme est expliqué par le fait que p52 et c-Rel, probablement sous formes d'hétérodimères, se lient au promoteur de *Csf2* (codant pour le GM-CSF) et induisent son expression(86,207,533). De façon surprenante, l'induction de l'expression de *Csf2* par p52 semble indépendante de RelB *in vitro*. Les souris *Relb*^{-/-} sont résistantes à l'induction de l'EAE. Cependant, des modèles de transfert de lymphocytes T *Relb*^{-/-} ainsi que des chimères de moelle osseuse semble montrer un rôle lymphocyte-T extrinsèque de la sous unité(207,208). Voir même, les lymphocytes T *Relb*^{-/-} semblent plus agressifs que les lymphocytes T sauvages(208). Dans la même étude, les auteurs ont montré que la surexpression de RelB inhibe l'expression d'IL-17a par les Thelper(208,209). Les auteurs avancent que c'est ce mécanisme qui expliquerait l'hyper pathogénicité des LT *Relb*^{-/-}. Cependant, ces études utilisent des transferts adoptifs de cellules et n'interrogent pas directement la fonction intrinsèque de RelB dans des LT de souris non manipulées. Ainsi, toutes les études sur la voie canonique de NF-κB montre son implication dans la pathogénicité des LT et le développement de l'EAE (Figure 7). Cependant, il n'existe pas d'études utilisant des modèles de souris transgéniques avec délétion des différentes sous-unités de NF-κB spécifiquement dans les LT ou dans les lymphocytes Tconv. Lors de cette thèse, j'ai utilisé des modèles CD4-cre et CD4-creER^{T2} afin d'interroger directement les fonctions intrinsèques de RelA, c-Rel et RelB, spécifiquement dans les Thelper.

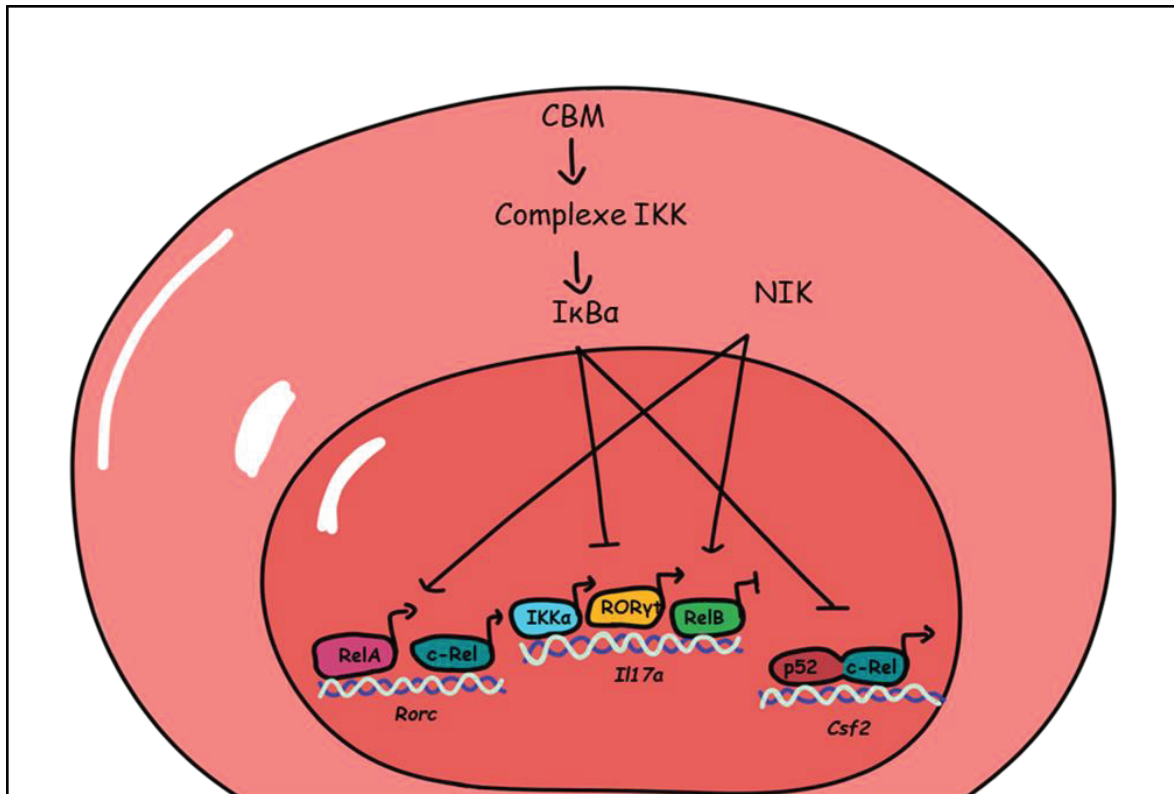


Figure 7: Régulation des Tconv pathogénique dans l'EAE par la voie NF-κB.

Plusieurs études préliminaires montrent des rôles des différents membres de la voie NF-κB dans l'activation et la fonction des Tconv pathogéniques. Notamment, certaines sous-unités de NF-κB peuvent directement se lier aux promoteurs des gènes codant RORγt, l'IL-17a et le GM-CSF afin d'induire ou réprimer l'expression de ces protéines.

6. Moduler l'activité de NF- κ B dans les Tconv, un espoir de thérapie pour la SEP et le cancer ?

Il existe de nombreuses façons de moduler l'activité de NF- κ B, que ce soit en mimant les signaux activateurs ou en utilisant des petites molécules inhibitrices. En 2006, Tom Gilmore listait 785 inhibiteurs de NF- κ B(534). Étant donné l'hyper activation de NF- κ B dans le cancer, de nombreuses études ont été faites pour tester l'activité antitumorale des inhibiteurs de NF- κ B. Malheureusement, très peu de ces molécules ont atteint les phases avancées des essais cliniques. Cela est dû à une efficacité modeste ou à des effets indésirables graves. Ce n'est pas surprenant que l'inhibition systémique de NF- κ B ait mené à ces résultats. Comme nous l'avons vu, les membres de NF- κ B sont exprimés dans divers types cellulaires, certains étant même ubiquitaires, et ont des fonctions variées. De plus, considérer NF- κ B comme une entité unique avec une fonction précise est une erreur, à la place il faut comprendre la fonction de chacun de ses membres(144).

Les Tconv sont au cœur des réponses immunitaires. Comme nous l'avons vu, la voie de signalisation NF- κ B contrôle de nombreux aspects de la biologie des Tconv, cependant, les fonctions intrinsèques aux Tconv des cinq sous-unités de NF- κ B sont encore mal définies. Ainsi lors de ma thèse, j'ai utilisé des modèles de délétion conditionnels chez l'homme et la souris des trois sous-unités de NF- κ B possédant une TAD, RelA, c-Rel et RelB afin de comprendre la façon dont elles régulent le transcriptome et la fonctionnalité des Tconv. J'ai travaillé sur des modèles de SEP et cancer car les Tconv ont des fonctions majeures et divergentes dans ces deux contextes.

Résultats

Introduction du 1^{er} article (Scientific Reports, 2021)

Nous avons vu en introduction que dans l'EAE, un modèle murin de la SEP, les Tconv auto-réactifs spécifiques de la myéline migrent dans le CNS et provoquent une neuro-inflammation massive. Ces cellules ont un profil Th17 pathogénique et produisent du GM-CSF. La voie alternative de NF- κ B semble contrôler le programme pathogénique des Tconv dans l'EAE. Des études faites sur des LT avec une ablation de NIK montrent une altération de la polarisation Th17 et en conséquence la délétion de *Map3k14* induit une résistance à l'EAE. En revanche, des expériences utilisant des animaux avec une forme non transformable de p100 ou avec une activation constitutive de RelB, ont suggéré que RelB pourrait directement inhiber la différenciation des Th17. En lien avec cela, le transfert de LT *Relb*^{-/-} dans des souris receveuses immunodéficientes induit une EAE plus sévère associée à une augmentation du profil Th17 dans le SNC. Cependant, des résultats contradictoires ont également été rapportés, et la contribution spécifique de RelB dans la polarisation Th17 et la pathogénicité des LT est donc encore débattue.

Lors de ma thèse, j'ai utilisé un modèle murin CD4-cre *Relb*^{flox/flox} qui présente une délétion conditionnelle de RelB dans les lymphocytes T. Dans ce modèle, j'ai observé que la sévérité clinique de l'EAE, est significativement réduite chez les souris dont les cellules T sont déficientes en RelB. Cette observation est associée à une diminution de l'expression du GM-CSF par les Tconv, spécifiquement dans le SNC. A l'inverse, j'ai aussi observé que RelB n'est pas requis pour l'homéostasie, l'activation et la prolifération des Tconv ni pour leur polarisation vers les différents sous-types de Thelper *in vitro*. De plus l'ablation de RelB n'a aucun impact sur la capacité des cellules Tconv à induire une colite auto-immune dans un modèle de transfert de Tconv. Ces résultats montrent donc une fonction sélective de RelB dans l'EAE.



OPEN

A T cell-intrinsic function for NF- κ B RelB in experimental autoimmune encephalomyelitis

Guilhem Lalle¹, Raphaëlle Lautraite¹, Allison Voisin¹, Julie Twardowski¹, Pierre Stéphan¹, Marlène Perrin-Niquet¹, Ramdane Igalouzene¹, Saidi M. Soudja¹, Julien C. Marie¹, Marc Vocanson², Nilushi De Silva³, Ulf Klein⁴, Sankar Ghosh⁵ & Yenkel Grinberg-Bleyer¹✉

NF- κ B (NF- κ B) is a family of transcription factors with pleiotropic functions in immune responses. The alternative NF- κ B pathway that leads to the activation of RelB and NF- κ B2, was previously associated with the activation and function of T cells, though the exact contribution of these NF- κ B subunits remains unclear. Here, using mice carrying conditional ablation of RelB in T cells, we evaluated its role in the development of conventional CD4⁺ T (Tconv) cells and their function in autoimmune diseases. RelB was largely dispensable for Tconv cell homeostasis, activation and proliferation, and for their polarization toward different flavors of Thelper cells in vitro. Moreover, ablation of RelB had no impact on the capacity of Tconv cells to induce autoimmune colitis. Conversely, clinical severity of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), a mouse model of multiple sclerosis (MS) was significantly reduced in mice with RelB-deficient T cells. This was associated with impaired expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) specifically in the central nervous system. Our data reveal a discrete role for RelB in the pathogenic function of Tconv cells during EAE, and highlight this transcription factor as a putative therapeutic target in MS.

Classically split into two separate activation pathways, the NF- κ B family is composed of 5 subunits that all share a Rel homology domain and associate as homo- or heterodimers to modulate gene expression¹. In T cells, stimulation of the canonical pathway is classically triggered by the engagement of T-cell receptor (TCR)/CD28 molecules, which drives the activation of a Carma1-Bcl-10-Malt-1/inhibitor of κ B kinase (IKK) $\alpha/\beta/\gamma$ cascade. This, in turn, leads to the degradation of I κ B α and the nuclear translocation of NF- κ B1 (p105/p50, encoded by *Nfkb1*), RelA (or p65, encoded by *Rela*) and c-Rel (encoded by *Rel*) proteins². The alternative NF- κ B pathway is generally triggered by the engagement of different members of the tumor necrosis factor receptor (TNFRSF) superfamily, and consists in the activation of NIK, which phosphorylates IKK α , driving the processing of NF- κ B2 (p100/p52, encoded by *Nfkb2*) and culminating in the nuclear translocation of p52 and RelB (*Relb*) subunits. Importantly, it is now clearly established that canonical and alternative subunits can dimerize with each other under certain conditions, conferring novel functions to NF- κ B and adding another layer of complexity to its signaling^{3–5}. In addition, RelB was suggested to repress gene transcription at given loci by recruiting chromatin modifiers, independently of other NF- κ B subunits; thereby promoting immune tolerance under certain circumstances^{6–8}. A number of studies have reported the multiple functions of NF- κ B in inflammation and immunity. In particular, it was suggested to exert critical roles in the development and homeostasis of CD4⁺ T lymphocytes^{9,10}.

CD4⁺ T cells are pivotal actors of adaptive immune responses. Following stimulation, naïve conventional CD4⁺ T (Tconv) cells can polarize into different flavors of Thelper (TH) cells depending on the cytokine milieu to mount protective responses against specific classes of pathogens¹¹. In addition to these protective roles, TH cells are involved in the pathogenesis of different immune disorders, such as allergy or autoimmunity. For instance, TH1 and TH17 cells, characterized by their secretion of interferon gamma (IFN γ) and interleukin (IL)-17 (IL-17A/F), respectively, have deleterious activities in tissue-specific autoimmune diseases, including inflammatory bowel disease and MS, as demonstrated in mouse models and suggested in human pathology^{12,13}.

¹Cancer Research Center of Lyon, UMR INSERM 1052, CNRS 5286, Université Claude Bernard Lyon 1, Labex DEVweCAN, Centre Léon Bérard, Lyon, France. ²CIRI-Centre International de Recherche en Infectiologie, INSERM, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, Ecole Normale Supérieure de Lyon, CNRS UMR 5308, Lyon, France. ³Immunity and Cancer Department, Institut Curie, Paris-Sciences-Et-Lettres Research University, INSERM U932, Paris, France. ⁴Division of Haematology and Immunology, Leeds Institute of Medical Research at St. James's, University of Leeds, Leeds, UK. ⁵Department of Microbiology and Immunology, College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York, NY 10032, USA. ✉email: Yenkel.grinberg-bleyer@inserm.fr

More specifically, so-called pathogenic TH17 cells (also reported as TH1.17 or TH17* in the literature) produce appreciable amounts of GM-CSF, driving clinical symptoms in murine models of MS such as EAE^{14,15}. At odds with these pro-inflammatory cells, another subset of CD4⁺ T cells, called regulatory T cells (Treg cells) and characterized by its high expression of the transcription factor Foxp3, is crucial for the suppression of autoimmunity¹⁶. Hence, depletion of Treg cells exacerbates EAE severity¹⁷.

Canonical NF- κ B subunits are largely implicated in T-cell activation, survival, as well as in the polarization toward the TH17 lineage and the development of autoimmunity^{18–20}. Moreover, these proteins are critical for Treg cell development and function^{21,22}. In contrast, the T-cell-intrinsic functions of the alternative pathway remain unclear. Mice and patients with germline mutations in *Map3k14* (encoding NIK) or *Relb* exhibit spontaneous T-cell activation and profound immunodeficiency, though this may rely on T-cell-extrinsic mechanisms^{23–26}. Tconv cells isolated from mice harboring either germline or T-cell-restricted ablation of *Map3k14*, displayed a normal TH1 and TH2 polarization capacity, but impaired TH17 differentiation in vitro^{27,28}. Consequently, *Map3k14* ablation conferred full resistance to EAE. In contrast, experiments using animals with a non-processable form of p100 or with constitutive activation of RelB, suggested that RelB could directly inhibit TH17 differentiation^{29,30}. In line with this, *Relb*^{-/-} T cells, though they may have an impaired TH1 differentiation ability in vitro³¹, induced severe EAE upon transfer to immunodeficient recipients, associated with enhanced TH17 cytokines in the inflamed CNS⁸. However, conflicting results were also reported³⁰, and the specific contribution of RelB to TH polarization and T-cell mediated autoimmunity is thus still debated. This is largely due to the fact that the study of cell-autonomous functions was so far prevented by the early and lethal autoimmunity arising in mice with germline deletion of *Relb*²⁶. To overcome this issue, we used mice carrying specific *Relb* ablation in T cells. We found that T-cell development in vivo, TH polarization in vitro and T-cell-transfer-induced colitis did not require RelB activity. Conversely, the severity of EAE was significantly reduced in mice with *Relb*-deficient T cells, associated with impaired accumulation of GM-CSF⁺ T cells in the inflamed CNS. Our results reveal a discrete contribution of RelB in T-cell biology and highlight this NF- κ B subunit as a putative therapeutic target for the treatment of MS.

Results

RelB is dispensable for T-cell homeostasis at steady-state. To investigate the T-cell-autonomous functions of RelB, we crossed mice carrying *Relb*-floxed alleles with the CD4^{cre} strain, allowing the conditional ablation of *RelB* in T-cells (*Relb*-cKO)³². *Relb*-cKO offspring were viable and mutant mice displayed no signs of autoimmunity up to 12 months after birth (data not shown). Importantly, flow cytometry analyses in adult animals showed that T-cell distribution in the thymus remained unchanged compared to CD4^{cre} control mice (Fig. 1a and data not shown). The proportion and quantity of CD4⁺ and CD8⁺ mature T cells in the spleen and peripheral lymph nodes were not affected by the absence of RelB (Fig. 1a). Furthermore, in vivo activation and proliferation levels, measured through the expression of Ki67, CD44 and CD62L, were normal (Fig. 1b–c). Since NF- κ B signaling has been associated with the expression of inflammatory cytokines by T cells, we measured IFN- γ , IL-2 and TNF α expression by Tconv cells following ex vivo polyclonal restimulation of lymphoid tissues. Once again, the proportion of cytokine-producing T cells did not differ between control and *Relb*-cKO mice (Fig. 1d). Together, these data showed that *RelB* ablation did not impact steady-state homeostasis and function of Tconv cells.

In vitro properties and TH polarization are maintained in the absence of RelB. Next, we evaluated the impact of *Relb* ablation on T-cell behavior in vitro. Naïve Tconv cells isolated from the spleen and LN of control and *Relb*-cKO mice, displayed similar levels of proliferation following CD3/CD28 stimulation, in the presence or absence of IL-2 (Fig. 2a). In the same setting, the proportion of IFN γ ⁺, IL-2⁺, TNF α ⁺ and GM-CSF⁺ cells was unaltered, as well as the amount of secreted cytokines (Fig. 2b,c). Following stimulation in TH1-, TH2- or iTreg-polarizing conditions, we detected normal expression levels of IFN γ /T-bet, GATA-3, and Foxp3, respectively, suggesting that RelB was expendable for these TH subsets (Fig. 3a–c). Over the last few years, several reports have pondered over the implication of the alternative NF- κ B pathway in the biology of TH17 cells. We thus carefully examined the TH17 polarization potential of *Relb*-deficient Tconv cells. Surprisingly, the ability of Tconv cells to convert into IL-17A⁺ and ROR γ t⁺ TH17 cells when cultured with anti-CD3, feeders, TGF- β and IL-6 was not impacted by the absence of *Relb* (Fig. 3d). Similar results were obtained following the addition of IL-1 β and IL-23, and using plate-coated anti-CD3 and -CD28. Thus, though it was described that RelB activation may inhibit IL-17A production by TH17 cells, its ablation did not seem to modify the TH17 polarization capacity of naive Tconv cells.

RelB expression is not required for T-cell mediated colitis. To test the TH polarization capacity and pathogenic function of *Relb*-deficient T cells in vivo, we next used a T-cell-transfer model of colitis, in which naive Tconv cells are transferred to immunodeficient *Rag2*^{-/-} recipients. Transfer of control Tconv induced pronounced colon inflammation, leading to moderate weight loss (Fig. 4a). We observed a similar phenotype when *Relb*-deficient Tconv were used, which was also confirmed by histological analyses (Fig. 4b,c). FACS analyses 6 weeks after cell transfer revealed equivalent lymphoid tissue reconstitution and similar colon infiltration by Tconv, suggesting that RelB was dispensable for lymphopenia-induced proliferation and survival in immunocompromised hosts (Fig. 4d). Moreover, the proportion of Foxp3⁺ iTreg cells was unaltered between the two strains, thereby recapitulating our in vitro data (Fig. 4e). The expression of “TH1” markers such as T-Bet, IFN γ or TNF α was also stable (Fig. 4f). Interestingly, whereas the overall proportion of ROR γ t⁺ T cells was not impacted by the absence of RelB, we detected a significant increase in the percentage of IL-17A⁺ cells specifically in the mesenteric lymph nodes (Fig. 4g). Thus, in this setting, RelB may act as an inhibitor of IL-17A production,

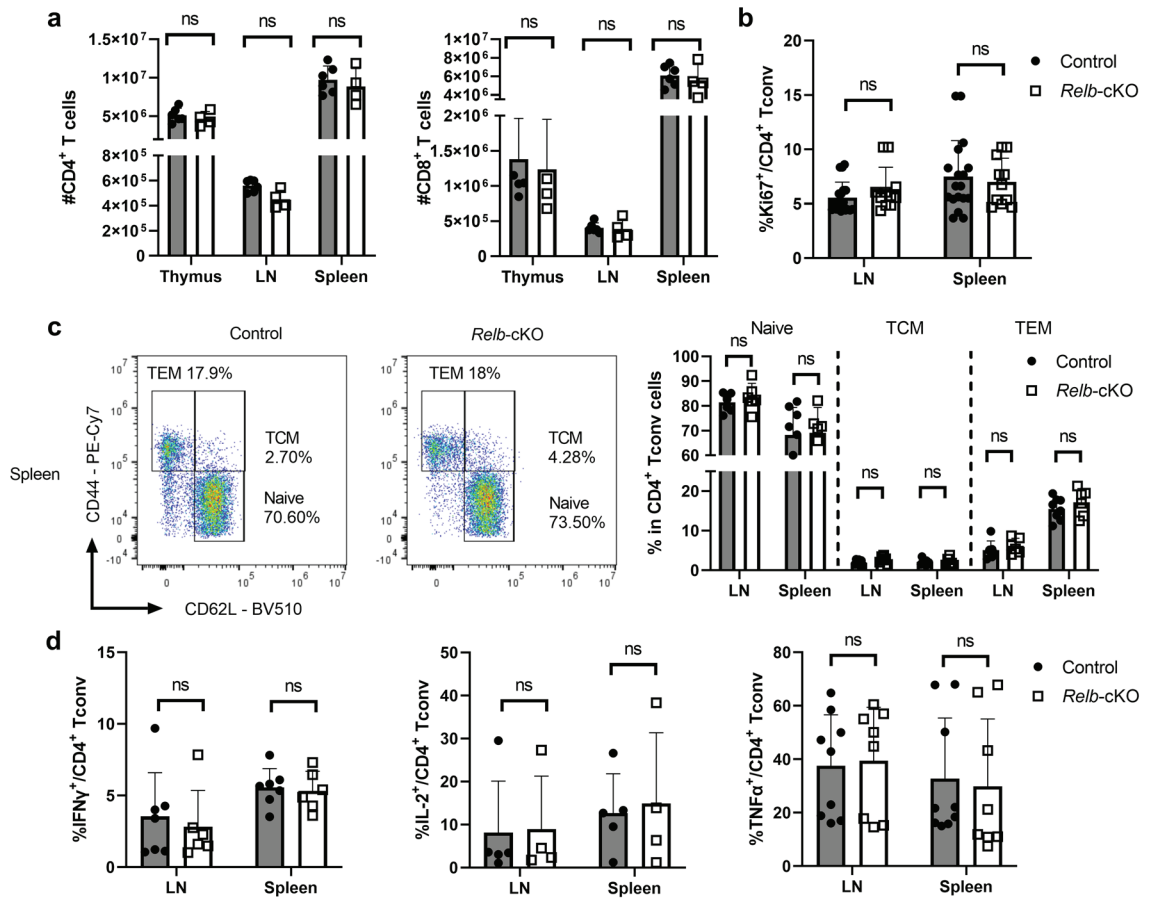


Figure 1. Conditional ablation of *Relb* in T cells does not impair their homeostasis at steady-state. Thymus, spleen and peripheral lymph nodes (LN) from CD4^{cre} (control) and CD4^{cre}*Relb*^{f/f} (*Relb*-cKO) mice were analyzed by flow cytometry. **(a)** Quantification of live TCR- β ⁺CD4⁺ and CD8⁺ cells. **(b)** Proportion of Ki67⁺ in CD4⁺Foxp3⁻ (Tconv) cells. **(c)** Representative dot plots in the spleen and cumulative data of CD44 and CD62L expression in Tconv cells. T_{CM}: T central memory; T_{EM}: T effector memory. **(d)** Cytokine expression by Tconv cells following restimulation with PMA/ionomycin. Each dot represents an individual mouse from 3-5 experiments. Mean \pm SEM is shown. *ns*: non-significant.

as previously reported in other systems. However, the clinical outcome did not differ, presumably because the expression of IL-17A and GM-CSF in the colon was independent of RelB (Fig. 4g). Collectively, this showed that RelB expression was not involved in the pathogenic function of TH cells upon transfer to lymphopenic hosts.

RelB promotes T-cell pathogenicity in EAE. To directly assess the role of RelB in a murine model of T-cell mediated autoimmunity, we immunized control and mutant mice with MOG₃₃₋₅₅ peptide to induce EAE. As expected, immunization of control mice led to detectable and severe clinical symptoms in most animals, characterized by a peak in the disease 2 weeks after induction, and followed by a spontaneous partial remission (Fig. 5a-c). Interestingly, even though the onset of disease was not delayed in *Relb*-cKO animals, maximal scores were significantly lower than that in the control group, suggesting that RelB may limit the pathogenic function of T cells. To understand this mechanism, we assessed the proportion and phenotype of T cells in the inflamed CNS and draining lymph nodes 20 days after immunization. Although we observed similar numbers of total and CD4⁺ T cells in draining lymph nodes (dLN), accumulation of CD45⁺ cells-and thus, of T cells- was drastically decreased in the brain and spinal cord of *Relb*-cKO animals; however the proportion of T cells among CD45⁺ cells was not modified (Fig. 5d,e). Moreover, the proportion of Foxp3⁺ Treg cells remained intact, suggesting an impairment of the Tconv compartment, rather than an enhanced accumulation of Treg cells (Fig. 5f). The proportion of activated (CD44^{hi}) and proliferating (Ki67⁺) cells was equivalent between strains (Fig. 5g), indicative of an intact T-cell priming but an impaired migration toward the CNS, and/or a defective survival in situ. We thus assessed the TH profile of each strain. The expression of TNF α as well as TH1 (T-bet and IFN γ) and classical TH17 (ROR γ t and IL-17A) markers was unaffected in *Relb*-cKO animals (Fig. 5g,h). IFN γ and IL-17A production by CD8⁺ T cells was not impacted either, suggesting that their function was not altered in the absence of *Relb* (Fig. 5i). We detected a specific and significant decrease in the proportion and numbers of GM-CSF⁺ Tconv cells in the brain of *Relb*-cKO mice (Fig. 5j,k). A similar trend was observed in the inflamed spinal cord, though the values did not reach statistical significance. Overall, the absolute numbers of GM-CSF⁺ Tconv cells, which directly impact the severity of the disease, were dramatically decreased in the brain and spinal cord of mutant

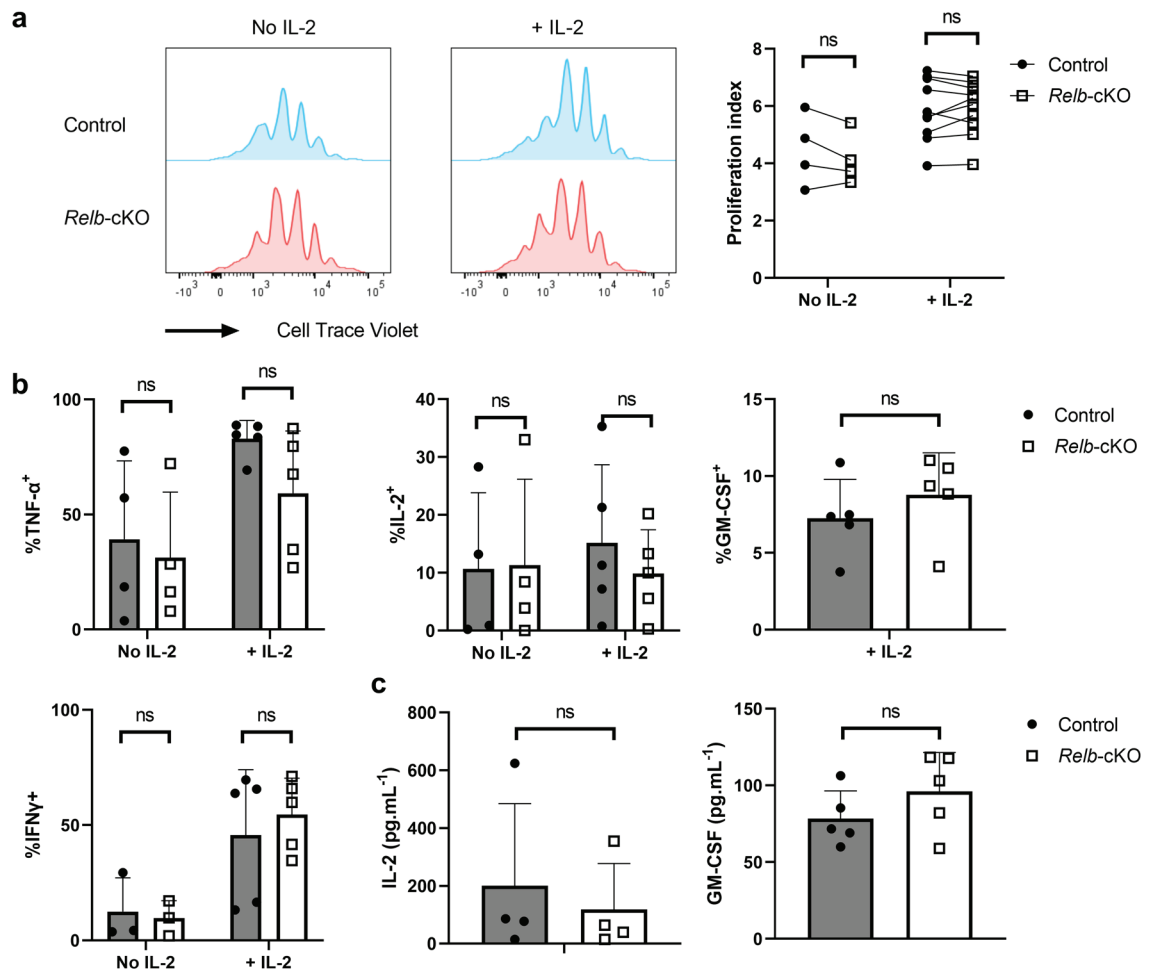


Figure 2. Normal proliferative capacity and cytokine expression of *Relb*-deficient T cells in vitro. CTV-labeled naïve Tconv cells were stimulated with soluble anti-CD3 + mitomycin C-treated feeders. **(a,b)** After 4 days of culture, cells were restimulated with PMA/ionomycin and analyzed by flow cytometry. **(a)** Representative CTV profile and cumulative proliferation index of live cells. **(b)** Cytokine expression following restimulation with PMA/ionomycin. **(c)** ELISA analysis of supernatants after 24 h of culture. Each dot represents an individual mouse from 5 experiments. Mean \pm SEM is shown. *ns*: non-significant.

mice (Fig. 5k). Altogether, these data highlight a pathogenic T-cell-intrinsic function of RelB in CNS autoimmunity, through its role in GM-CSF expression.

Discussion

The major roles of the canonical NF- κ B pathway in TH17 cell polarization and pathogenic function in autoimmunity are well established. However, despite growing literature, the roles of the alternative pathway and subunits remain poorly defined. This lack of knowledge is partly due to the absence of adequate mouse models to study the cell-autonomous functions of RelB. In the present study, although *Relb* expression was largely dispensable for Tconv biology at steady-state and was not required for TH polarization in vitro, the absence of *Relb* significantly improved clinical symptoms of EAE by limiting the pathogenic function of T cells in the inflamed CNS. These findings further our knowledge on the role of NF- κ B transcription factors in immune responses.

Our *Relb*-cKO model was viable, unlike mice carrying a germline deletion of *Relb*, and no autoimmune symptoms or inflammation could be detected in our animals, thus confirming previous literature establishing that the lethal autoimmunity and spontaneous T-cell activation observed in *Relb*^{-/-} mice is independent of the absence of RelB in T cells^{33,34}. As such, the phenotype and activation levels of *Relb*-deficient T cells was largely comparable to that of control cells. We next used our *Relb*-cKO strain to fully decipher the cell-autonomous function of RelB in T-cell features in vitro, including cell proliferation, cytokine expression and polarization toward different Thelper lineages. To date, conflicting data have illustrated the putative contribution of alternative NF- κ B subunits to TH polarization. For instance, total T cells from *Relb*^{-/-} animals, but not *Nfkb2*^{-/-} or *Map3k14*^{-/-} mice, displayed defects in TH1 polarization^{28,30,31}, suggesting an alternative pathway-independent function of RelB. Because we detected intact IFN γ and T-bet expression in TH1 cells from *Relb*-cKO mice, this early observation was likely due to a cell-extrinsic phenomenon. The role of this pathway in in vitro-differentiated TH17 cells is even more debated. Ablation of NIK or p100 reduced IL-17A expression in TH17 cells^{28,30}. At odds with these reports, it

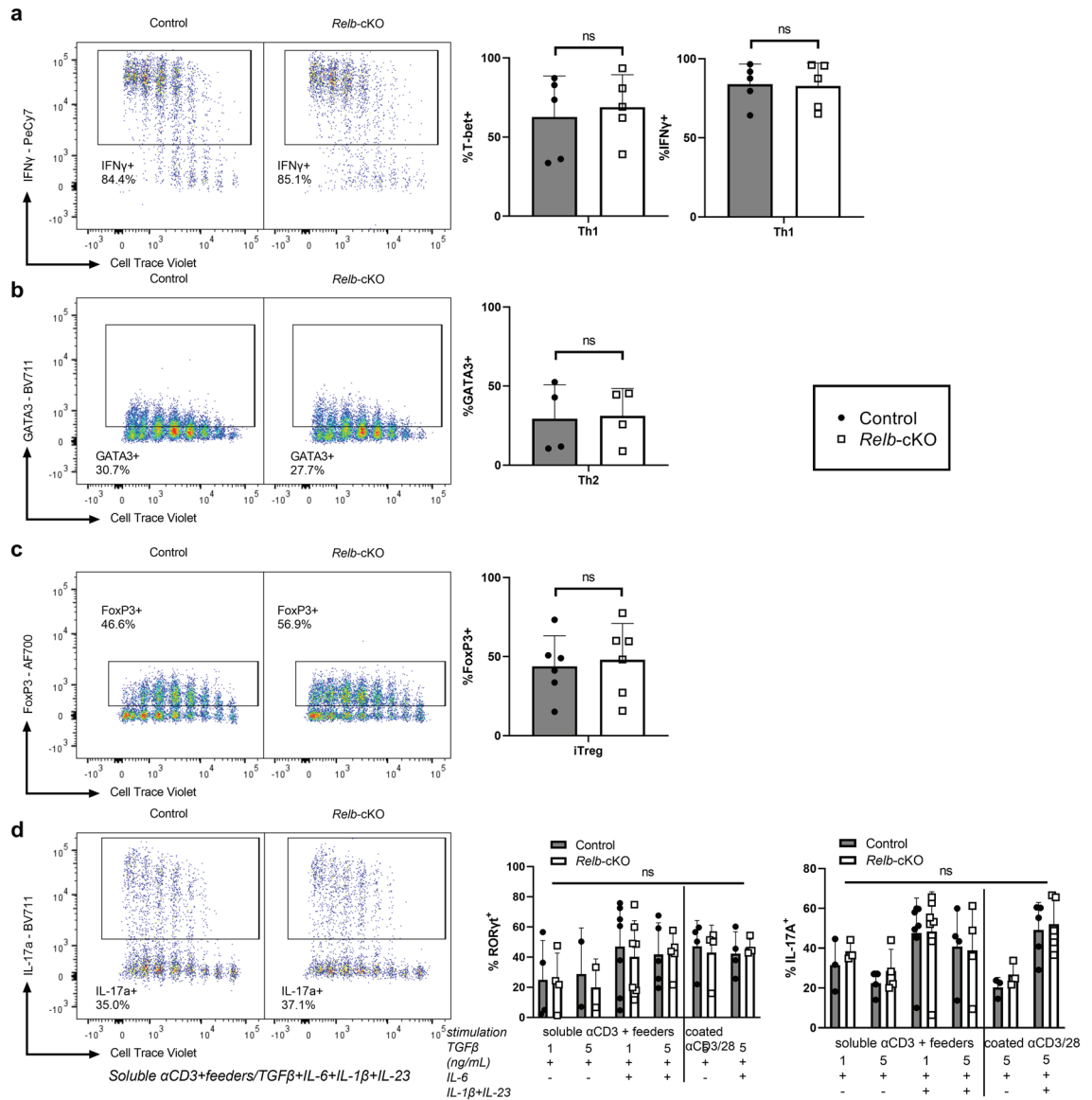


Figure 3. Thelper polarization profile is maintained in the absence of RelB. CTV-labeled naïve Tconv cells were stimulated in TH1, TH2, iTreg-polarizing conditions (a–c) or with different TH17 stimulation protocols (d) as described in the *Methods* section. After 4 days of culture, cells were restimulated with PMA/ionomycin and analyzed by flow cytometry. (a) Percentage of T-bet⁺ and IFN γ ⁺ cells in the TH1 condition, (b) GATA3⁺ cells in the TH2 condition, and (c) Foxp3⁺ cells in the iTreg condition. (d) Percentage of ROR γ t⁺ and IL-17a⁺ cells in various TH17 conditions. ns: non-significant.

was shown that forced activation and overexpression of RelB in T cells significantly impaired TH17 polarization. Mechanistically, following OX-40 engagement, RelB could directly bind to the *Il17* locus and recruit histone modifiers to inhibit *Il17a* expression⁸. Conversely, we showed here that T-cell-restricted ablation of *Relb* did not modify the ability of Tconv to polarize into ROR γ t⁺ IL-17A⁺ cells in vitro. This confirmed the conclusions of a previous report using *Lck^{cre}Relb^{flox}* animals³⁴. Thus, whereas strong activation of RelB may be deleterious for IL-17A expression, its absence did not impact polarization toward TH17 cells in vitro.

In addition, RelB was dispensable for lymphopenia-induced proliferation and colon inflammation following transfer of Tconv to immunodeficient recipients. This represents an important insight into the pathophysiology of IBD. Indeed, it was shown that NIK activity was integral, both in intestinal epithelial cells and dendritic cells, for the development of IBD in mouse models^{35,36}. In addition, *Chuk^{-/-}* T cells (deficient for IKK α), that have reduced activation of the canonical and alternative pathways, fail to induce IBD when transferred to *Rag1^{-/-}* recipients³⁷. Our experiments demonstrate that RelB activation per se was not involved in the pathogenic function of T cells in IBD, suggesting a cell type-specific contribution of the alternative NF- κ B pathway in intestinal autoimmunity.

Interestingly, T-cell-intrinsic *RelB* expression was critical to induce severe symptoms of EAE. This observation is in stark contrast with previous reports showing either no effect³⁰ or a deleterious impact⁸ of *Relb* ablation on the function of T cells during EAE. However, these two studies used cell transfer experiments to address the

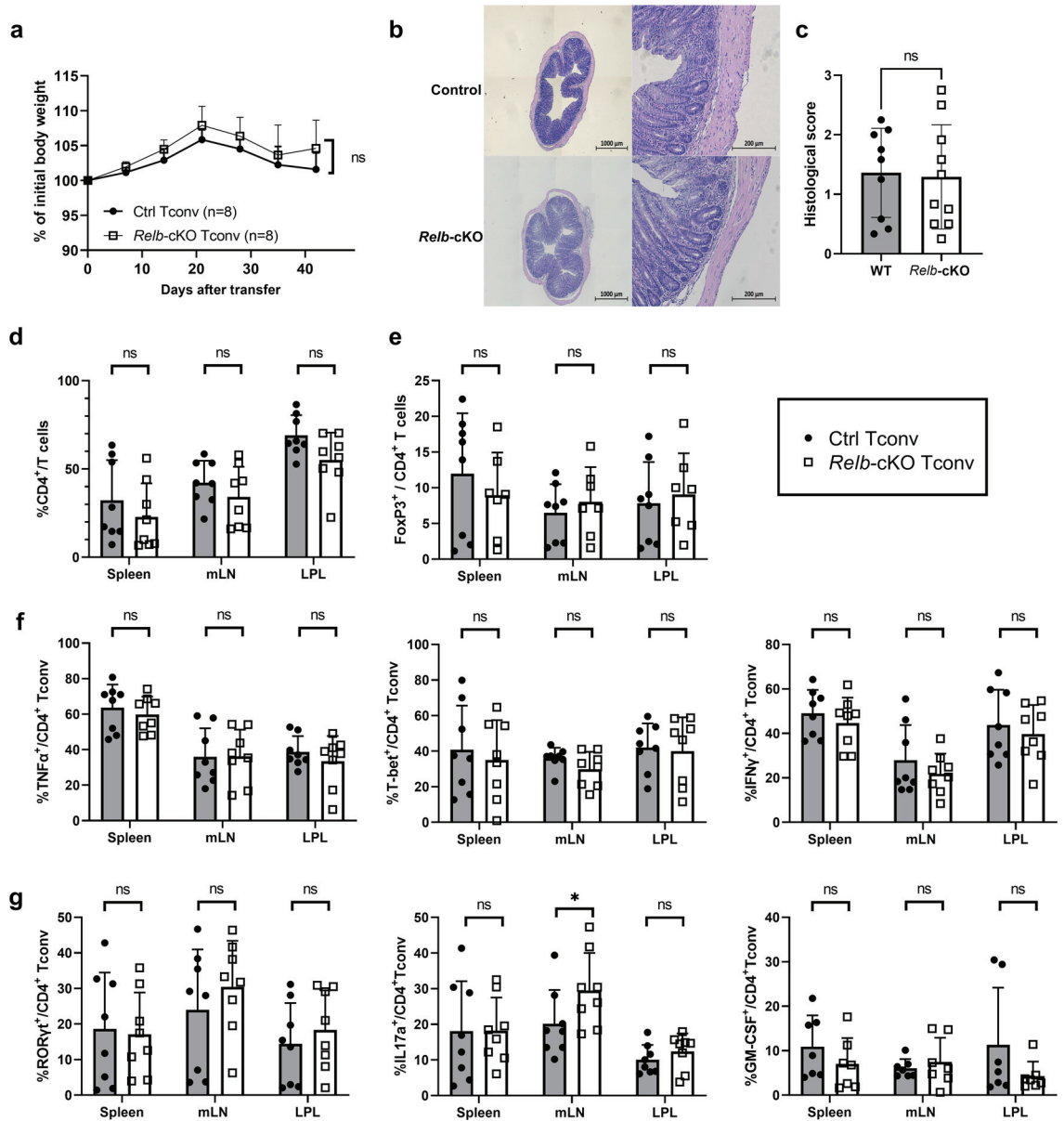


Figure 4. The colitogenic potential of Tconv cells is maintained in the absence of RelB. Naïve Tconv cells were transferred to sex-matched *Rag2*^{-/-} recipients. **(a)** Weight curves presented according to the % of initial body weight. **(b,c)** Histological analysis of colon sections, 6 weeks after transfer. **(b)** Representative section of colon stained with H/E. Bars: original magnification 10X (left), 50X (right). **(c)** Double-blinded histological score. **(d-g)** 6 weeks after transfer, spleens, mesenteric lymph nodes (mLN) and colon lamina propria leukocytes (LPL) were processed for FACS analyses following restimulation with PMA/ionomycin. Each dot represents a mouse from 3 independent experiments; mean +/- SEM is shown. **p* < 0.05, *ns*: non-significant.

question. Our results are to our knowledge the first to directly investigate the function of RelB in T cells using an active EAE model in otherwise unmanipulated animals. Thus, similarly to what was observed in oligodendrocytes or dendritic cells, RelB appears to exert a pathogenic effect in T cells during CNS autoimmunity^{38,39}.

From our results, RelB seems to be implicated in discrete steps of the pathogenic function of T cells during EAE, rather than being involved in the differentiation of the whole TH17 lineage in vivo. First, we observed a major decrease in the number of CD4⁺ and CD8⁺ T cells, both in the brain and spinal cord of *Relb*-cKO animals, 20 days after EAE induction. Because T-cell numbers and phenotype were intact in the dLN, this suggested an impaired in situ accumulation on T cells in the inflamed tissues. As the proportion of proliferating cells was untouched, this phenomenon was likely due to a defective survival of *Relb*-deficient T cells. This was in accordance with observations made in NIK- deficient animals²⁸. In addition to this reduced accumulation, we detected a specific impairment of GM-CSF⁺ Tconv cells in the brain of mutant mice, whereas the proportion of ROR γ ⁺ and IL-17A⁺ cells was not significantly altered. Importantly, the Tc1/Tc17 profile of CD8⁺ T cells also remained unchanged. Nevertheless, additional studies are necessary to investigate the potential involvement of RelB in the development and function of the diverse CD8⁺ T-cell subsets that were proposed to exert both immunoregulatory

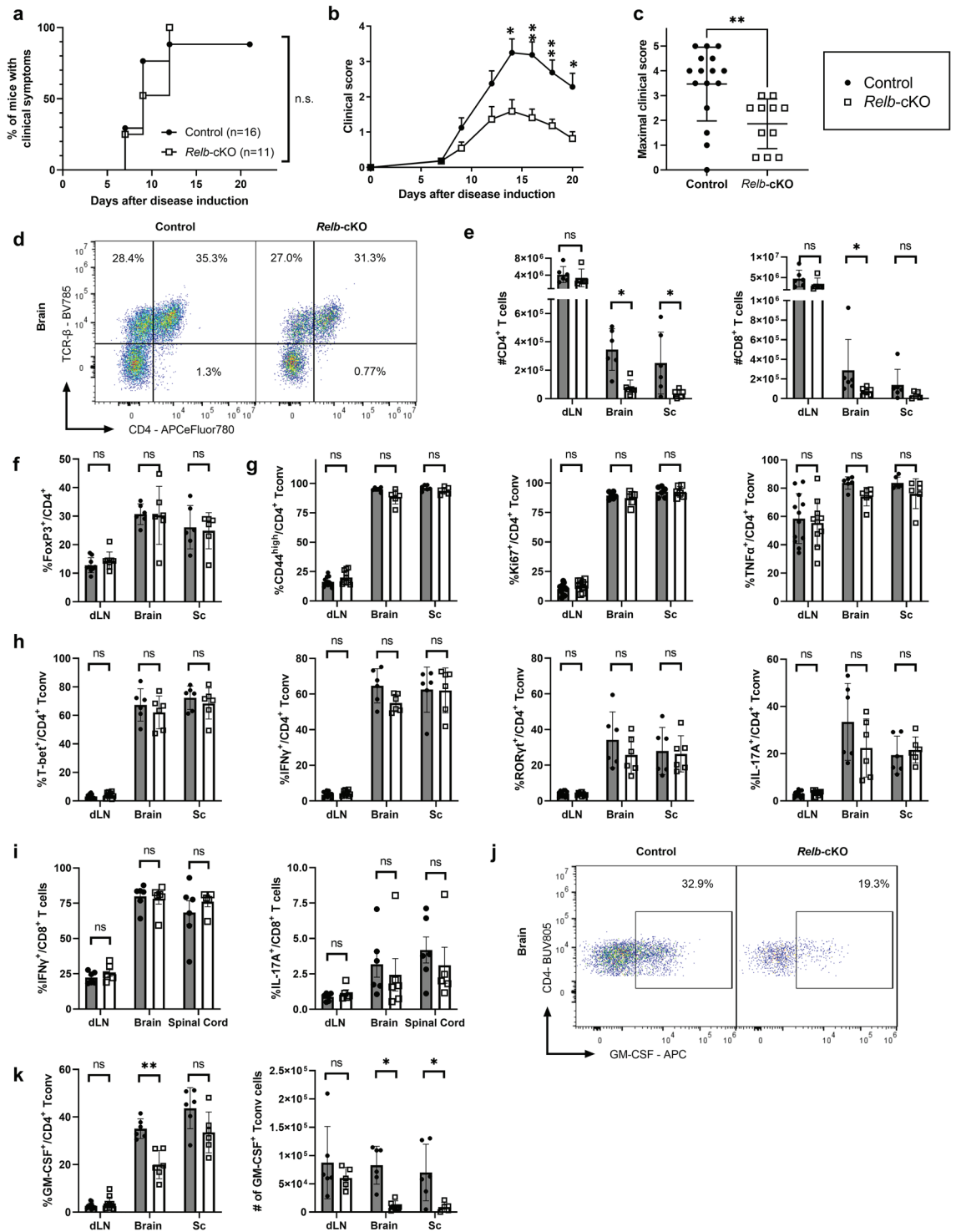


Figure 5. T-cell autonomous RelB is required for optimal pathogenicity in EAE. Active EAE was induced as described in the Methods. (a) Cumulative incidence of detectable disease (score > 0), (b) mean clinical scores and (c) maximal scores of each mouse during the course of disease were recorded. (d–k) 21 days after transfer, tissues were processed for FACS analyses following restimulation with PMA/ionomycin. (d) Representative TCRβ and CD45 staining in gated live brain cells. (e) Absolute numbers of CD4⁺ and CD8⁺ T cells (live CD45⁺TCRβ⁺CD4⁺ / CD8⁺) in the indicated tissues. (f) Percentage of Treg cells among CD4⁺ T cells. (g,h) Percentage of Tconv cells (live CD45⁺TCRβ⁺CD4⁺Foxp3⁺) expressing the indicated markers. (i) Percentage of IFNγ and IL-17A expressing CD8⁺ T cells (live CD45⁺TCRβ⁺CD8⁺) (j) Representative GM-CSF staining in brain Tconv cells. (k) Cumulative proportion and number of live CD45⁺TCRβ⁺CD4⁺Foxp3⁺GM-CSF⁺ Tconv cells. Each dot represents a mouse from 3 independent experiments; mean ± SEM is shown. *p < 0.05, **p < 0.005, ns: non-significant.

and pathogenic roles in neuroinflammation^{40,41}. The precise molecular mechanism underlying this defective GM-CSF expression remains unclear. In contrast to c-Rel and p52, it was proposed that RelB could not directly bind and activate the putative kB-binding site in the *Csf2* promoter in mouse T cells³⁰. However, divergent conclusions were reached using human cell lines⁴². It would be of interest to measure the binding of RelB to the *Csf2* locus in CNS-infiltrating Tconv cells during EAE, for instance using ChIP-Seq methods. Nevertheless, the low number of T cells that can be isolated from such non-lymphoid tissues poses a major technical challenge.

It would also be important to elucidate how RelB modulates GM-CSF expression in T cells. RelB was suggested to exert its pleiotropic functions in neuroinflammation through different molecular mechanisms⁴³: (i) activation of the alternative NF- κ B pathway leading to translocation of p52-RelB dimers, (ii) ‘canonical-like’ association of RelB-p50 and RelB-RelA dimers, and (iii) epigenetic modifications driven by RelB monomers or homodimers. Again, ChIP experiments as well as the use of mouse models with conditional ablation of other NF- κ B subunits would be relevant tools to address this specific question.

Collectively, our data offer new insights into the regulation of T-cell immunity by the different members of the NF- κ B family. While c-Rel seems critical to kickstart the expression of ROR γ t and the TH17 lineage¹⁹, we herein propose that RelB, exerts selective functions in the pathogenic programming of TH cells during ongoing CNS inflammation, rather than in the priming phase of the disease. Thus, we highlight this understudied NF- κ B subunit as a putative therapeutic target in EAE and MS.

Methods

Mice. *Relb*-Floxed mice were previously described⁴⁴. CD4^{cre} (Tg(CD4-cre)^{1Cw1}) on a C57Bl/6 J background were purchased from the Jackson Laboratory. *Rag2*^{-/-} and C57Bl/6 CD45.1 (*Ptprca*^a *Pepcb*^b/BoyJ) mice were purchased from Charles River Laboratories France. Mice were bred and used in specific-pathogen-free (SPF) conditions at the CRCL animal facility (Anican). Animals were housed in individually ventilated cages with temperature-controlled conditions under a 12-h-light/dark cycle with free access to drinking water and food. Adult (6–28-week-old) male or female mice were used for all experiments. Studies were conducted in accordance with the animal care guidelines of the European Union and French laws. Protocols were validated by the local Animal Ethic Evaluation Committee (committee C2A15, *Comité d’Evaluation Commun au Centre Léon Bérard, à l’Animalerie de transit de l’ENS, au PBES et au laboratoire P4*) (protocol CLB-2019061914498113). The authors complied with the ARRIVE guidelines.

Adoptive cell transfer-induced colitis. Donor mice were euthanized by cervical dislocation and spleens and peripheral lymph nodes were harvest in ice cold NaCl. Sterile single cell suspensions were obtained by mechanical dilaceration through a 70 μ m cell strainer. Red blood cells were lysed in RBC lysis buffer (NH₄Cl 0.154 M + NaHCO₃ 0.14 M + EDTA 0.1 mM) for 10 min at room temperature. Naïve CD4⁺ T cells were negatively isolated using the Naïve CD4⁺ T Cell Isolation Kit (Miltenyi), with a purity >90%. Cells were resuspended at 20 \times 10⁶ cells/mL in ice cold PBS 1X and 2 \times 10⁶ cells were injected intravenously in the retro orbital sinus of recipient *Rag2*^{-/-} mice under isoflurane-induced anesthesia. Mice were weighed once a week.

EAE. Mice were injected subcutaneously in each flank with 50 μ g of MOG₃₅₋₅₅ peptide (Smart Biosciences SB023) emulsified in 100 μ L of complete Freund adjuvant (Sigma-Aldrich) supplemented with 243 μ g of heat-killed *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (Difco-BD Bioscience 2311). Bordetella pertussis toxin (200 ng/injection, Enzo) was injected intravenously at the time of immunization and two days later. Disease severity was evaluated every other day following an established scoring system, in a semi-blinded fashion: 0, no clinical sign; 1, limp tail; 2, limp tail, impaired righting reflex, and paresis of one limb; 3, hindlimb paralysis; 4, complete hindlimb and partial forelimb paralysis; to 5, moribund/death. A score of 5 was permanently attributed to dead animals. After 21 days, mice were anesthetized with a mixture of ketamine and xylazine and perfused with ice-cold PBS1X. Draining (brachial) lymph nodes, brain and spinal cord were harvested in ice cold NaCl solutions.

Preparation of cell suspensions. Single cell suspensions from LN and spleens were obtained by mechanical dilaceration in FACS Buffer (PBS 1X + 2% FBS, 2 mM EDTA) with glass slides, strained, washed in complete RPMI and enumerated.

Brains and spinal cords were cut into small pieces and digested in RPMI 1640 (Gibco) supplemented with 1 mg/mL collagenase type IV (Sigma-Aldrich), 500 μ g/mL DNase I (Sigma-Aldrich) for 30 min at 37 °C followed by mechanical desegregation. Reactions were stopped by the addition of 15 mL PBS1X containing 5 mM EDTA. The solution was passed through a 70 μ m cell strainer and residual solid pieces were mechanically disrupted. After centrifugation, cell pellets were resuspended in 8 mL of Percoll 40% (Sigma-Aldrich) and then laid on 4 mL Percoll 80% in a 15 mL polypropylene tube. Tubes were spun at 2500 rpm for 20 min at RT. Mononuclear cells were collected from the interface of the 40:80% Percoll gradient, washed in complete RPMI and enumerated.

Colons were extensively washed and fragments were incubated in 5 mL of cell dissociation solution (Ca²⁺- and Mg²⁺-free containing 5 mM EDTA and 10 mM HEPES) and incubated for 20 min at 37 °C under slow rotation. Supernatant was discarded and fragments were minced and digested in 5 mL PBS containing 5% FBS, 1 mg/mL of Collagenase and 400 μ g/mL DNase I for 20 min at 37 °C under slow rotation. Digestion was stopped by adding 15 mL PBS1X supplemented with EDTA 5 mM. Lamina propria leukocytes (LPL) cells were passed through a 70 μ m cell strainer. Mononuclear cells were isolated by a Percoll gradient as above, washed in complete RPMI and enumerated.

In vitro T-cell proliferation and polarization assays. Naïve CD4⁺ T cells were negatively isolated using the Naïve CD4⁺ T Cell Isolation Kit (Miltenyi). Cells were labeled using the CellTrace Violet Cell Proliferation

Kit (CTV; Thermo Fisher Scientific). Cells were cultured in 120 μL of complete IMDM (10% FBS, 25,000 U Penicillin/Streptomycin, 10 mM sodium pyruvate, non-essential amino acids and 50 μM 2-Mercaptoethanol) (Gibco).

To study proliferation and inflammatory cytokine production, 3×10^4 cells were stimulated with 1.5×10^4 T cell-depleted mitomycin C-treated Ly5.1 splenocytes, 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ soluble anti-CD3 ϵ (clone 145-2C11, BioXcell) with or without 10 ng/mL mIL-2 (Miltenyi). For TH polarization assays, cells were either stimulated as above, or 5×10^4 cells were stimulated with coated anti-CD3 ϵ 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (BioXcell) and anti-CD28 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (clone 37.51, BioXcell). The culture medium was supplemented as follows: TH0: 10 ng/mL mIL-2; TH1: 20 ng/mL mIL-12 (Peprotech), 10 ng/mL mIL-2 (Miltenyi), 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti-mouse IL-4 (clone 11B11 BD Biosciences); TH2: 30 ng/mL mIL-4 (Peprotech), 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti-mouse IFN γ (clone XMG1.2 BD Biosciences), 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti-mouse IL-12 (clone C17.8 BD Biosciences); iTreg: 5 ng/mL hTGF- β (R&D Systems); 10 ng/mL mIL-2; TH17: 1 or 5 ng/mL hTGF- β , 20 ng/mL mIL-6 (Peprotech), 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti-mouse IFN γ , 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti-mouse IL-4, with or without 5 ng/mL mIL-1 β (Peprotech); 5 ng/mL hIL-23 (Peprotech) and 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti-mouse IL-2 (clone JES6-1A12, Biolegend).

After 4 days of culture, supernatants were collected and stored at -80°C until further use. Proliferation and subset-specific transcription factors and cytokine expression were assessed by FACS.

Flow cytometry. For cytokine analysis by FACS, single cell suspensions were stimulated for 4 h at 37°C with 50 ng/mL PMA (Sigma), 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ionomycin (Sigma-Aldrich) and 1X Protein Transport Inhibitor containing Brefeldin A (BD GolgiPlug). Cells were washed in PBS1X and stained with a viability marker for 10 min at RT in the dark. Cells were washed in PBS1X, and incubated with 50 μL surface marker antibody mix for 20 min at 4°C in the dark. Cells were then washed in PBS1X and fixed and permeabilized using the eBioscience Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (Thermo Fisher Scientific) according to manufacturer's instructions. Cells were washed and incubated with the intracellular marker antibody mix for 20 min at 4°C in the dark, washed in permeabilization buffer and resuspended in FACS Buffer. The complete list of antibodies can be found in Supplementary Table 1. Acquisition was performed on a LSR Fortessa (BD Biosciences) or an Aurora spectral cytometer (Cytex). Data were analyzed with FlowJO software V10.7.2 (Tree Star, www.flowjo.com).

Histology. Colons were fixed in 4% formaldehyde solution (Sigma) for 1 day and stored at 4°C in EtOH 70%. They were then embedded in paraffin, sectioned and stained with hematoxylin/eosin (Sigma-Aldrich). Intestinal inflammation was scored in a blinded fashion using a scoring system based on the following criteria: colon length, inflammatory cell infiltrate (severity and extent), crypt hyperplasia, and presence of neutrophils within the crypts, presence of crypt abscesses, erosion, granulation tissues and villous blunting.

ELISA. ELISA were performed using "ELISA MAX Deluxe Set Mouse IL-2", and "ELISA MAX Deluxe Set Mouse GM-CSF" (Biolegend) following manufacturer's instructions.

Statistics. Statistics were performed using GraphPad Prism Software v9 (<https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>). Unless mentioned otherwise, two-tailed Mann-Whitney t test was used to calculate statistical significance. P values <0.05 were considered significant. ns: non-significant; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Data availability

Flow cytometry and other raw data will be made available upon request.

Received: 10 August 2021; Accepted: 21 September 2021

Published online: 04 October 2021

References

- Hayden, M. S. & Ghosh, S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* **132**, 344–362. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.020> (2008).
- Voisin, A. & Grinberg-Bleyer, Y. The many-sided contributions of NF-kappaB to T-cell biology in health and disease. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **361**, 245–300. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2020.10.006> (2021).
- Oeckinghaus, A., Hayden, M. S. & Ghosh, S. Crosstalk in NF-kB signaling pathways. *Nat. Immunol.* **12**, 695–708. <https://doi.org/10.1038/ni.2065> (2011).
- Derudder, E. *et al.* RelB/p50 dimers are differentially regulated by tumor necrosis factor-alpha and lymphotoxin-beta receptor activation: critical roles for p100. *J. Biol. Chem.* **278**, 23278–23284. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300106200> (2003).
- Shih, V. F. *et al.* Control of RelB during dendritic cell activation integrates canonical and noncanonical NF-kappaB pathways. *Nat. Immunol.* **13**, 1162–1170. <https://doi.org/10.1038/ni.2446> (2012).
- Chen, X., El Gazzar, M., Yoza, B. K. & McCall, C. E. The NF-kappaB factor RelB and histone H3 lysine methyltransferase G9a directly interact to generate epigenetic silencing in endotoxin tolerance. *J. Biol. Chem.* **284**, 27857–27865. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.000950> (2009).
- Yoza, B. K., Hu, J. Y., Cousart, S. L., Forrest, L. M. & McCall, C. E. Induction of RelB participates in endotoxin tolerance. *J. Immunol.* **177**, 4080–4085. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.6.4080> (2006).
- Xiao, X. *et al.* The costimulatory receptor OX40 inhibits interleukin-17 expression through activation of repressive chromatin remodeling pathways. *Immunity* **44**, 1271–1283. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.05.013> (2016).
- Siebenlist, U., Brown, K. & Claudio, E. Control of lymphocyte development by nuclear factor-kappaB. *Nat Rev Immunol* **5**, 435–445 (2005).
- Oh, H. & Ghosh, S. NF-kB: roles and Regulation In Different CD4+ T cell subsets. *Immunol. Rev.* **252**, 41–51. <https://doi.org/10.1111/imr.12033> (2013).
- Ziegler, S. F. Division of labour by CD4(+) T helper cells. *Nat Rev Immunol* **16**, 403. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.53> (2016).

12. Domingues, H. S., Mues, M., Lassmann, H., Wekerle, H. & Krishnamoorthy, G. Functional and pathogenic differences of Th1 and Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS ONE* **5**, e15531. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015531> (2010).
13. Imam, T., Park, S., Kaplan, M. H. & Olson, M. R. Effector T helper cell subsets in inflammatory bowel diseases. *Front Immunol* **9**, 1212. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01212> (2018).
14. Komuczki, J. *et al.* Fate-mapping of GM-CSF expression identifies a discrete subset of inflammation-driving T helper cells regulated by cytokines IL-23 and IL-1beta. *Immunity* **50**, 1289–1304. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.04.006> (2019).
15. Lee, Y. *et al.* Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nat. Immunol.* **13**, 991–999. <https://doi.org/10.1038/ni.2416> (2012).
16. Josefowicz, S. Z., Lu, L.-F. & Rudensky, A. Y. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 531–564. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623> (2012).
17. McGeachy, M. J., Stephens, L. A. & Anderton, S. M. Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system. *J. Immunol.* **175**, 3025–3032. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.5.3025> (2005).
18. Greve, B. *et al.* I kappa B kinase 2/beta deficiency controls expansion of autoreactive T cells and suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol. (Baltimore, Md.: 1950)* **179**, 179–185. doi:<https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.1.179> (2007).
19. Ruan, Q. *et al.* The Th17 immune response is controlled by the Rel-ROR γ -ROR γ T transcriptional axis. *J. Exp. Med.* **208**, 2321–2333. <https://doi.org/10.1084/jem.20110462> (2011).
20. Chen, G. *et al.* The NF- κ B transcription factor c-Rel Is required for Th17 effector cell development in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* **187**, 4483–4491. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101757> (2011).
21. Oh, H. *et al.* An NF- κ B transcription factor-dependent, lineage specific transcriptional program promotes regulatory T cell identity and function. *Immunity* **47**, 450–465. doi:<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.08.010> (2017).
22. Grinberg-Bleyer, Y. *et al.* NF- κ B c-Rel Is crucial for the regulatory T cell immune checkpoint in cancer. *Cell* **170**, 1096–1108. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.004> (2017).
23. Shinkura, R. *et al.* Alymphoplasia is caused by a point mutation in the mouse gene encoding NF-kappa b-inducing kinase. *Nat. Genet.* **22**, 74–77. <https://doi.org/10.1038/8780> (1999).
24. Willmann, K. L. *et al.* Biallelic loss-of-function mutation in NIK causes a primary immunodeficiency with multifaceted aberrant lymphoid immunity. *Nat. Commun.* **5**, 5360. <https://doi.org/10.1038/ncomms6360> (2014).
25. Sharfe, N. *et al.* The effects of RelB deficiency on lymphocyte development and function. *J. Autoimmun.* **65**, 90–100. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2015.09.001> (2015).
26. Weih, F. *et al.* Multiorgan inflammation and hematopoietic abnormalities in mice with a targeted disruption of RelB, a member of the NF-kappa B/Rel family. *Cell* **80**, 331–340 (1995).
27. Jin, W., Zhou, X.-F., Yu, J., Cheng, X. & Sun, S.-C. Regulation of Th17 cell differentiation and EAE induction by MAP3K NIK. *Blood* **113**, 6603–6610. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-192914> (2009).
28. Li, Y. *et al.* Cell intrinsic role of NF- κ B-inducing kinase in regulating T cell-mediated immune and autoimmune responses. *Sci. Rep.* **6**, 22115. <https://doi.org/10.1038/srep22115> (2016).
29. Koliesnik, I. O. *et al.* RelB regulates Th17 differentiation in a cell-intrinsic manner. *Immunobiology* **223**, 191–199. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2017.10.026> (2018).
30. Yu, J. *et al.* T cell-intrinsic function of the noncanonical NF- κ B pathway in the regulation of GM-CSF expression and experimental autoimmune encephalomyelitis pathogenesis. *J. Immunol. (Baltimore, Md.: 1950)* **193**, 422–430. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303237> (2014).
31. Corn, R. A., Hunter, C., Liou, H.-C., Siebenlist, U. & Boothby, M. R. Opposing roles for RelB and Bcl-3 in regulation of T-box expressed in T cells, GATA-3, and Th effector differentiation. *J. Immunol. (Baltimore, Md.: 1950)* **175**, 2102–2110. doi:<https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.4.2102> (2005).
32. Grinberg-Bleyer, Y. *et al.* The Alternative NF- κ B Pathway in Regulatory T Cell Homeostasis and Suppressive Function. *J. Immunol. (Baltimore, Md.: 1950)* **200**, 2362–2371. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800042> (2018).
33. Li, J. *et al.* Role of the NF- κ B Family Member RelB in Regulation of Foxp3+ Regulatory T Cells In Vivo. *J. Immunol. (Baltimore, Md.: 1950)* **200**, 1325–1334. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701310> (2018).
34. Powlony-Budnicka, I. *et al.* RelA and RelB transcription factors in distinct thymocyte populations control lymphotoxin-dependent interleukin-17 production in $\gamma\delta$ T Cells. *Immunity* **34**, 364–374. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.02.019> (2011).
35. Ramakrishnan, S. K. *et al.* Intestinal non-canonical NFkappaB signaling shapes the local and systemic immune response. *Nat. Commun.* **10**, 660. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08581-8> (2019).
36. Jie, Z. *et al.* NIK signaling axis regulates dendritic cell function in intestinal immunity and homeostasis. *Nat. Immunol.* **19**, 1224–1235. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0206-z> (2018).
37. Chen, X. *et al.* IKKalpha is required for the homeostasis of regulatory T cells and for the expansion of both regulatory and effector CD4 T cells. *FASEB J.* **29**, 443–454. <https://doi.org/10.1096/fj.14-259564> (2015).
38. Gupta, A. S. *et al.* A detrimental role of RelB in mature oligodendrocytes during experimental acute encephalomyelitis. *J. Neuroinflammation* **16**, 161. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1548-7> (2019).
39. Andreas, N. *et al.* RelB deficiency in dendritic cells protects from autoimmune inflammation due to spontaneous accumulation of tissue T regulatory cells. *J. Immunol.* **203**, 2602–2613. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1801530> (2019).
40. Sinha, S., Boyden, A. W., Itani, F. R., Crawford, M. P. & Karandikar, N. J. CD8(+) T-cells as immune regulators of multiple sclerosis. *Front. Immunol.* **6**, 619. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00619> (2015).
41. Salou, M., Nicol, B., Garcia, A. & Laplaud, D. A. Involvement of CD8(+) T cells in multiple sclerosis. *Front. Immunol.* **6**, 604. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00604> (2015).
42. Sasaki, C. Y., Ghosh, P. & Longo, D. L. Recruit(ment of RelB to the Csf2 promoter enhances RelA-mediated transcription of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J. Biol. Chem.* **286**, 1093–1102. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.119438> (2011).
43. Mockenhaupt, K., Gonsiewski, A. & Kordula, T. RelB and Neuroinflammation. *Cells* **10**, 1. <https://doi.org/10.3390/cells10071609> (2021).
44. De Silva, N. S. *et al.* Transcription factors of the alternative NF- κ B pathway are required for germinal center B-cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **113**, 9063–9068. <https://doi.org/10.1073/pnas.1602728113> (2016).

Acknowledgements

We are grateful to all members of the team for their technical help and constructive discussions; to Christophe Caux and his team for technical support; to the staff of the core facilities at CRCL for their expertise; and to Brigitte Manship for critical reading of the manuscript. This work was supported by the CNRS/INSERM ATIP-Avenir young investigator program, the Labex DEVweCAN and the Association pour la Recherche sur la Sclérose en Plaques (ARSEP Foundation). AV is supported by a postdoctoral fellowship from the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC).

Author contributions

S.G. and Y.G.B. conceptualized the project. G.L., R.L. and Y.G.B. designed experiments. G.L., R.L., A.V., J.T., P.S. and M.P.N. performed experiments. G.L., R.L., A.V., R.I., S.S. and Y.G.B. analyzed the data. J.M., M.V., N.D.S. and U.K. provided reagents. Y.G.B. wrote the paper and secured funding. All authors reviewed the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99134-x>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Y.G.-B.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

Introduction du second article (Manuscrit en préparation)

Il a été montré que les souris CD4-cre *Ikkkb*^{fl/fl} sont totalement protégées contre l'EAE ce qui suppose que les sous-unités de la voie canonique de NF-κB contrôle le phénotype pathogénique des Tconv. En parallèle, des études sur les modèles CD4-cre *Ikkkb*^{fl/fl} et CD4-cre *Ikkkb*^{CA} ont aussi montré que la voie canonique de NF-κB est nécessaire au programme anti tumoral des LT. Ces différentes études suggèrent un rôle primordial des facteurs de transcription canoniques de NF-κB mais leurs fonctions spécifiques n'ont pas été explorées.

Dans ce second axe de ma thèse, j'ai donc étudié les différentes fonctions de RelA et c-Rel dans les Tconv. Pour ce faire, j'ai utilisé des modèles murins avec des délétions conditionnelles de RelA ou c-Rel dans les Tconv et j'ai aussi mis au point un protocole de CRISPR/Cas9 pour déléter les deux sous-unités dans des Tconv primaires humains. Grâce à ces modèles, j'ai conduit des analyses fonctionnelles et transcriptomiques qui ont permis de mettre en évidence une implication différentielle de RelA ou c-Rel dépendant du contexte physiologique.

A l'état basal, RelA module fortement le transcriptome des Tconv humains et murins. D'un point de vue fonctionnel, il semble être impliqué dans l'activation, la prolifération (seulement chez les souris) et l'expression de cytokines inflammatoires. c-Rel aussi a un effet sur ces différents processus mais avec une ampleur moindre.

Dans l'EAE, l'ablation de c-Rel ne change pas du tout le cours de la maladie ni le profil fonctionnel des Tconv. A l'inverse, RelA est critique pour l'accumulation et la pathogénicité des Tconv dans le CNS. L'ablation de RelA entraîne notamment une forte diminution du profil Th17 et de l'expression du GM-CSF par les Tconv. La délétion de RelA après l'apparition des symptômes de l'EAE n'ayant aucun effet, il semble que ce facteur de transcription contrôle l'activation de la pathogénicité plutôt que son maintien.

Enfin, dans des modèles murins de cancer, seul c-Rel semble avoir un effet sur le contrôle de la pousse tumorale par les Tconv. La délétion de c-Rel dans les Tconv augmente fortement la pousse tumorale ce qui est corrélé à une diminution de l'activation et de la polyfonctionnalité des Tconv dans la tumeur. A l'aide de nos données, nous avons défini signature NF-κB canonique chez l'homme qui a une valeur pronostique de survie dans le mélanome.

Ainsi, nos travaux démontrent une division du travail entre les différentes sous-unités de la voie NF-κB, ouvrant la voie à des immunothérapies ciblées visant les sous-unités de NF-κB.

Ce projet a été mené en collaboration avec Raphaëlle Lautreite, co-première auteure du manuscrit en cours de rédaction et qui a notamment obtenu la majorité des résultats des parties polarisation et EAE.

NF- κ B transcription factors RelA and c-Rel selectively control CD4⁺ T cell function in autoimmunity and cancer.

Guilhem Lalle^{1,#}, Raphaëlle Lautreite^{1,#}, Maud Plaschka¹, Allison Voisin¹, Khaled Bouherrou¹, Marlène Perrin-Niquet¹, Laurie Tonon¹, Cyril Degletagne¹, Alain Viari¹, Thomas S. Postler², Jingyao Zhao², Christophe Caux¹, Julie Caramel¹, Stéphane Dalle¹, Philippe Cassier¹, Ulf Klein³, Sankar Ghosh² and Yenkel Grinberg-Bleyer^{1,*}

¹ Cancer Research Center of Lyon, UMR INSERM 1052, CNRS 5286, Université Claude Bernard Lyon 1, Labex DEV2CAN, Centre Léon Bérard, Lyon, France.

² Department of Microbiology & Immunology, College of Physicians & Surgeons, Columbia University, New York, NY 10032, USA.

³ Division of Haematology & Immunology, Leeds Institute of Medical Research at St. James's, University of Leeds, Leeds, UK.

Equal contribution

* Lead contact: Yenkel.grinberg-bleyer@inserm.fr

Abstract

The outcome of both cancer and autoimmunity is dictated by the recruitment and effector functions of CD4⁺ conventional T cells (Tconv cells). Therefore, identifying the common and selective transcriptional regulators that orchestrate their biology in each disease context, is of utmost therapeutic interest. The NF- κ B (NF- κ B) family of transcription factors has been implicated in a large variety of immune responses and in the control of Tconv cells activation and cytokine expression. Here, we explored the contributions of the canonical RelA and c-Rel subunits to Tconv function using conditional ablation of each gene in Tconv cells. We found that RelA, rather than c-Rel, shaped the transcriptome of Tconv cells in the steady-state through both direct and indirect mechanisms. RelA was required for Tconv polarization toward the TH17 lineage *in vitro*. Similar conclusions could be reached using gene-edited primary human Tconv cells. Consistently, RelA-deficient mice were protected against neuro-inflammation in a murine model of multiple sclerosis, because of defective activation and transition to a pathogenic TH17 gene expression program in the central nervous system. In contrast, Tconv-restricted ablation of c-Rel, but not RelA, impaired their function in the microenvironment of transplanted tumors, resulting in enhanced cancer burden. Together, our data demonstrate a division of labor between the different subunits of the NF- κ B pathway, paving the way to subunit-targeted immunotherapies.

Introduction

Conventional CD4⁺Foxp3⁻ T cells (Tconv cells) exhibit pleiotropic functions in immunity. While they are critical for the clearance of a broad spectrum of pathogens, a growing body of literature suggest that Tconv cells are also potent effectors of anti-tumor responses. Their accumulation and activation often confer good prognosis in solid cancers, and it appears that response to cancer immunotherapies such as checkpoint-blockade based therapies is associated with – or even requires- proper Tconv cell function^{1,2}. Conversely to these protective properties, uncontrolled Tconv cell activation can also promote autoimmune manifestations; for instance, they are key players of Crohn's disease, rheumatoid arthritis or multiple sclerosis³. This variety of functions relies on the existence of a myriad of different Tconv cells subsets. Indeed, the type of antigenic stimulation and the cytokine microenvironment drives the polarization toward

different flavors of Thelper (TH) cells that display selective roles in immune responses⁴. For instance, TH1 and T follicular helper (TFH) cells often orchestrate immune responses to tumors², whereas GM-CSF-producing, pathogenic TH17 cells emerge as the main drivers of multiple sclerosis (MS) and its murine model experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)^{5,6}.

In addition to specific transcription factors that drive the effector functions of each TH subset, a series of pioneering transcriptional regulators have been proposed to impact the fate of naïve Tconv cells. Downstream of the T-cell receptor (TCR) and co-stimulation molecules, nuclear factor of activated T-cells (NFAT), AP-1 or Forkhead box protein O (Foxo), as well as Nuclear Factor-kappaB (NF-κB) transcription factors are required for the activation, proliferation and cytokine expression of Tconv cells⁷. However, whether these proteins actually selectively dictate the fate of Tconv and TH cells depending on the disease context, is unknown.

NF-κB is composed of a series of 5 subunits that share a Rel-homology domain and modulate transcription as homo- or heterodimers. NF-κB proteins are classically split in two families: NF-κB1, RelA (encoded by *Rela*) and c-Rel (*Rel*) belong to the canonical pathway, whereas NF-κB2 and RelB are alternative subunit⁸. NF-κB has been long involved in T-cell biology through the use of mouse models carrying germline or conditional ablation of upstream regulators of the NF-κB pathway (reviewed in ^{9,10}). NF-κB is often constitutively activated in tissues exposed to chronic inflammation, such as in brains of patients with MS- and may even serve as a biomarker for relapse¹¹⁻¹³. In line with this, T-cell restricted ablation of the upstream kinase IKK2 confers resistance to EAE in mice¹⁴. Conversely, impaired activation of NF-κB has been shown in T cells from patients with cancer¹⁵; moreover, in mice, anergic T cells, that resemble tumor-infiltrating exhausted cells, display decreased NF-κB activity¹⁶. Consistent with this idea, constitutive NF-κB activation in T cells has been shown to drive tumor rejection in mouse models¹⁷. Furthermore, the efficacy of checkpoint-blockade therapies has been reported to require CD28-signaling in T cells, a cascade which triggers NF-κB activation¹⁸. RNA-seq analyses have highlighted the enrichment of NF-κB-driven signatures in patients responding to anti-PD-1 and anti-CTLA-4 therapies¹⁹.

Nevertheless, the selective contribution of each subunit to the activation and differentiation processes of T cells in cancer and autoimmunity is elusive. Such investigations have been so far prevented by the lack of good study models: for instance, germline ablation of *Rela* leads to embryonic lethality²⁰, whereas *Relb*-deficiency drives systemic autoimmunity²¹. Data on the Tconv-cell autonomous roles of alternative NF-κB subunits are scarce²²; generally speaking, canonical signaling appears to play the most critical roles in Tconv biology. The use of *Rel*-deficient animals, as well as the recent identification of *REL*-mutant patients, has highlighted the role of this subunit in Tconv cell proliferation, IL-2 expression, and TH17 differentiation²³⁻²⁶. *Rel* and *Nfkb1*-deficient mice are largely resistant to EAE^{23,27}. Reciprocally, canonical NF-κB activation in all T cells has been shown required for the control of cancer growth, though this phenotype likely relied on CD8⁺ T-cell intrinsic mechanisms²⁸. In fact, it is unclear whether the two closely related proteins RelA and c-Rel exhibit selective contributions to the development and function of T-cell subsets. Our recent studies suggested a context-dependent role of these TFs in Foxp3⁺ regulatory T cells (Treg cells)²⁹⁻³¹, but their putative roles in Tconv cells are poorly understood. Here we used a series of conditional knock-out mouse models and gene-edited primary human cells to document the functions of RelA and c-Rel in Tconv cells at steady-state, in EAE and in cancer.

Results

NF-κB RelA directs Tconv cell activation in the steady-state

We first aimed at deciphering the distinct roles of RelA and c-Rel in the control of Tconv cell biology at homeostasis. *CD4^{cre}* mice were crossed to animals carrying floxed alleles for *Rela* and *Rel* (hereafter named cKO mice), resulting in the ablation of these genes in all T-cell subsets accompanied by green fluorescent protein (GFP) expression³². Of note, the gross distribution and cell numbers of T-cell subsets in the thymus and secondary lymphoid tissues was maintained in the absence of either RelA or c-Rel, with the exception of impaired Treg cell development, as we and others previously reported ^{30,33}, and a slight but significant reduction in the number of CD8⁺ T cells in the lymph nodes (LN) and spleens of *Rela*-cKO mice

(Supplementary Figure 1). In order to examine the Tconv-cell intrinsic functions of NF- κ B subunits, we performed mixed bone marrow (BM) transfer experiments of CD45.1⁺ WT cells and control or cKO CD45.2⁺ cells (Figure 1A). Flow cytometry analysis of spleen cells 8 weeks after BM transfer, unraveled a competitive disadvantage of *Rela*-but not *Rel*-deficient T cells (Figure 1B). As expected, the accumulation of Treg cells was strongly impaired in the absence of either RelA or c-Rel (Supplementary Figure 2A). Among CD4⁺Foxp3⁻ Tconv cells, we detected a reduced proportion of activated CD44^{high} (in particular CD44^{high}CD62L^{low} effector memory cells) and proliferating Ki67⁺ cells in the *Rela*-cKO compartment and to a lesser extent in the *Rel*-cKO BM, compared to the controls (Figure 1B-C and Supplementary Figure 2B). Next, we examined cytokine expression following polyclonal restimulation. We found that RelA had a more prominent role than c-Rel in the expression of classical T-cell cytokines IL-2 and IFN γ ; in contrast the proportion of TNF- α ⁺ cells was equally reduced in both genotypes (Figure 1D). To obtain a global view of the regulation of gene expression by NF- κ B, we next ran RNA-sequencing analyses on control and mutant Tconv cells, stimulated with anti-CD3/CD28 and IL-2 for 5 hours. Differential gene expression analyses revealed deep alterations in the transcriptome of *Rela*-cKO Tconv cell, with 933 genes showing significantly up-or down regulated expression. *Rel*-cKO Tconv showed an intermediate transcriptomic state between control and *Rela*-cKO cells, with 199 differentially expressed genes; among those only 16 genes were uniquely altered in *Rel*-cKO cells (Figure 1E-F and Supplementary Figure 2C-D). Among altered genes in *Rela*-cKO Tconv cells were many activation markers (such as *Cd83*, *Icos*, *Tnfrsf9*) as well as inducible cytokines (notably the TH1/2/17 cytokines *Ifng*, *Il4* and *Il17a*) and chemokines (Figure 1G). Interestingly, a series of type I IFN signaling and IFN stimulated genes were down-regulated as well (e.g. *Mx2*, *Ifit1* and *Irf7*). As shown in other cell types, RelA was also necessary for the optimal expression of NF- κ B-pathway related genes (e.g. *Tnfaip3*, *Nfkbia* or the *Nfkb1*, *Nfkb2* or *Relb* subunits). Gene ontology analyses highlighted altered cytokine/cytokine receptor interactions as well as diverse inflammation-related signatures and NF- κ B signaling as a positive control (Figure 1H and Supplementary Figure 2E). Thus, RelA, rather than c-Rel appears a prime determinant of Tconv cell activation status. To gain further insight in the regulation of gene expression by RelA, we utilized our previously published RelA-ChIP-Seq data from CD3/CD28 stimulated Tconv cells³⁰ (GSE99319). Intriguingly, out of the 933 genes differentially expressed in *Rela*-cKO Tconv, only 249 were directly bound by RelA (Figure 1I), including expected targets such as *Nfkbia*, *Tnf* or *Ifng*, but also a series of 34 transcriptional regulators (transcription factors or epigenetic regulators) (Figure 1J and Supplementary Figure 2F-G). Interestingly, we found that the AP-1 members BATF and c-Jun were bound to nearly all 684 genes indirectly regulated by RelA (Figure 1K). These transcription factors are largely involved in T-cell activation and function, including in cancer^{34,35}. Together, these observations provide a mechanistic understanding of gene regulation by NF- κ B in Tconv cells, and highlight a crosstalk between NF- κ B and MAPK pathways.

The contribution of RelA and c-Rel to human Tconv cell identity

The absence of description of homozygous loss-of-function *RELA* mutations has so far prevented the study of T-cell-autonomous functions of this subunit in humans. To overcome this limitations, we developed a CRISPR-Cas9/Ribonucleoprotein electroporation approach to ablate *RELA* or *REL* in recently stimulated primary human Tconv cells from healthy donors. This approach enabled a deletion superior to 90% at the protein level in routine experiments (Figure 2A). We first deciphered gene expression patterns in control and mutant cells by RNA-seq after 5 hours of re-stimulation with antiCD3/CD28 and IL-2. Whereas only 12 genes were altered in *REL*-deficient cells, loss of *RELA* drove significant expression changes in 378 genes (of those, 6 were common to *REL*^{-/-} cells (Figure 2B-C and Supplementary Figure 3A). Similar to what was observed in mouse cells, human *RELA* controlled the expression of genes related to NF- κ B and other signaling pathways, of activation markers, as well as cytokines and chemokines (Figure 2D). This was further confirmed by gene enrichment analyses, which reinforced the likely involvement of *RELA* in TH17 cells (Supplementary Figure 3B). Of note, out of the 172 down-regulated human genes in *RELA*^{-/-} that had mouse orthologues, 80 were also found significantly downregulated in our mouse data; the correlation was lower for up-regulated genes (Supplementary Figure 3C). KEGG enrichment analyses on common down-regulated genes highlighted once again the involvement role of *RELA* in TH17 signature genes (Supplementary Figure 3D). Next, we explored the proliferation capacity of Tconv cells in vitro, and found

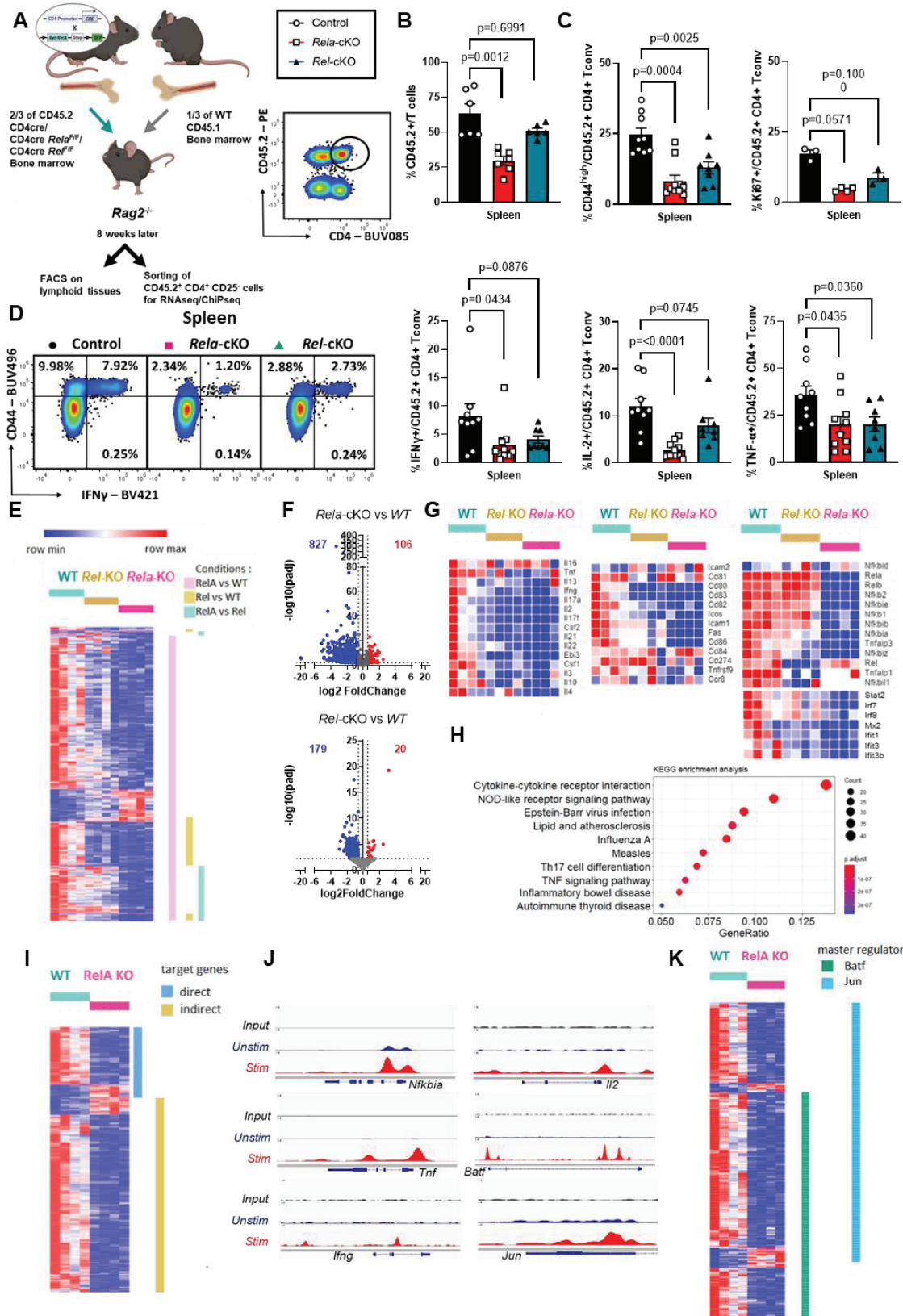


Figure 1: Mouse Tconv cell homeostasis and transcriptome are predominantly controlled by NF-κB RelA. (A) Experimental scheme of the Mixed Bone-marrow chimera model used. **(B-D)** Spleen cells were analyzed by flow cytometry. **(B)** Proportion of T cells that are of CD45.2 origin. **(C)** Proportion of CD44^{high} and Ki67⁺ in CD45.2⁺ TCR-

$\beta^+CD4^+CD8^+Foxp3^-$ Tconv. (D) Spleen cells were restimulated with PMA-ionomycin. Representative dot plots and proportions of cytokine expression by CD45.2⁺ Tconv. (E-H) RNA-seq analysis of CD45.2⁺ Tconv sorted from spleen and LN and stimulated for 4 hours with anti-CD3/CD28 and IL-2 (E) Heatmap showing expression of all 949 differentially expressed genes (DEG) (log₂ fold change >0.58, p < 0.005). (F) Volcano Plot of DEGs (G) Heatmaps of selected DEGs. (H) KEGG enrichment analysis of *Rela*-cKO DEGs. (I-J) RelA DNA-binding analysis in WT Tconv (I) Heatmap of the DEG that are directly (in blue) and indirectly (in yellow) bound by RelA. (J) Visualization of RelA binding in selected loci using Integrative Genome Viewer (K) BATF and c-Jun binding on DEGs not directly bound by RelA. Our RNA-seq and ChIP-seq data were confronted to publicly available ChIP-seq data of Batf and Jun. The heatmap represents DEG in *Rela*-cKO cells that might be regulated by Batf and Jun. FACS data are shown as mean \pm SEM of 2 experiments; each dot represents a mouse; multiple Mann-Whitney tests were used. RNA-seq data are from 4 independent samples.

that *REL*- but not *RELA*-ablation, significantly altered Tconv cell cycle after 4 days of culture with anti-CD3/28 stimulation; this defect was only partially rescued by exogenous IL-2 (Figure 2E).

In addition, FACS analyses following PMA-ionomycin restimulation showed a reduction of both TNF and IL-2 expressing *RELA*^{-/-} cells compared to the control, whereas *REL* deletion only decreased TNF- α (Figure 2F). At odds with mouse data and recently published literature, IFN γ expression did not require intact *RELA* or *REL* in human cells, perhaps because of the series of 2 stimulations required in our experimental scheme. Together, these results reinforce the role of RelA in shaping the transcriptome of Tconv cells both in mice and humans.

Discrete functions of RelA and c-Rel in Thelper cell polarization

Because our transcriptome analyses suggested cell-autonomous roles for NF- κ B subunits in TH differentiation, we next performed *in vitro* culture assays using naïve Tconv from cKO mice. In TH1-polarizing conditions, the proportion of IFN γ ⁺ cells was significantly altered in the absence of RelA, but not c-Rel (Figure 3A), without affecting the expression of the TH1 master TF T-Bet. Consistent with published data³⁶, RelA was found bound to the *Irfng* locus in anti-CD3/CD28 stimulated cells (Figure 1J). In TH2 differentiation, both RelA and c-Rel were necessary for optimal IL-4 secretion (Figure 3B); nevertheless GATA-3 expression was slightly decreased –though not significantly- solely in *Rela*-cKO cells. This was in line with a recent report³⁷ and was associated with direct RelA binding to an intronic region of the *Gata3* locus (Supplementary Figure 4B). Finally, we detected a selective contribution of RelA in the differentiation of TH17 cells. Indeed, the proportions of ROR γ t⁺ and IL-17A⁺ cells were decreased by about 50% in the absence of RelA in ‘classical’ (TGF- β +IL-6) culture conditions, whereas *Rel*-deficient cells showed unaltered differentiation. This intriguing phenotype was further confirmed in ‘pathogenic’ (TGF β +IL-6+IL1b+IL-23+anti-IL-2) culture conditions. Mechanistically, RelA could directly bind the *Rorc* locus, even in “TH0” conditions, but not the *Irf17a* locus (Supplementary Figure 4C). Together, this illustrates specific contributions of canonical NF- κ B subunits to *in vitro* TH subset differentiation.

RelA promotes Tconv cell pathogenicity in autoimmunity

Next, we investigated whether these roles in TH1 and TH17 differentiation could impact the development of autoimmunity. We used an active EAE model, whose severity relies on the activity of pathogenic, GM-CSF-producing, Tconv cells that adopt a pathogenic TH17 phenotype. Whereas all the control mice developed a severe EAE, we observed a strong protection of *Rela*-cKO mice against disease development. Only about half of the animals developed detectable clinical symptoms, and their maximal scores peaked at 1.5 (Figure 4A-C). This protection was further confirmed at the histological level, with decreased immune infiltrates and myelin destruction (Figure 4D). In contrast, and at odds with our expectations, *Rel*-deficiency in T cells did not impact the onset or progression of EAE. Nevertheless, it has to be noted that the sensitivity of *Rel*-cKO mice to EAE was observed in 2 different Specific and Opportunistic Pathogen Free (SOPF) facilities, but that mice housed in a Specific Pathogen Free (SPF) facility were largely resistant to the disease (Supplementary Figure 5A-B). This suggested a microbiota-dependent role of c-Rel in pathogenic TH17

differentiation, which is in line with the critical role of intestinal bacteria in EAE pathogenesis³⁸. To dissect

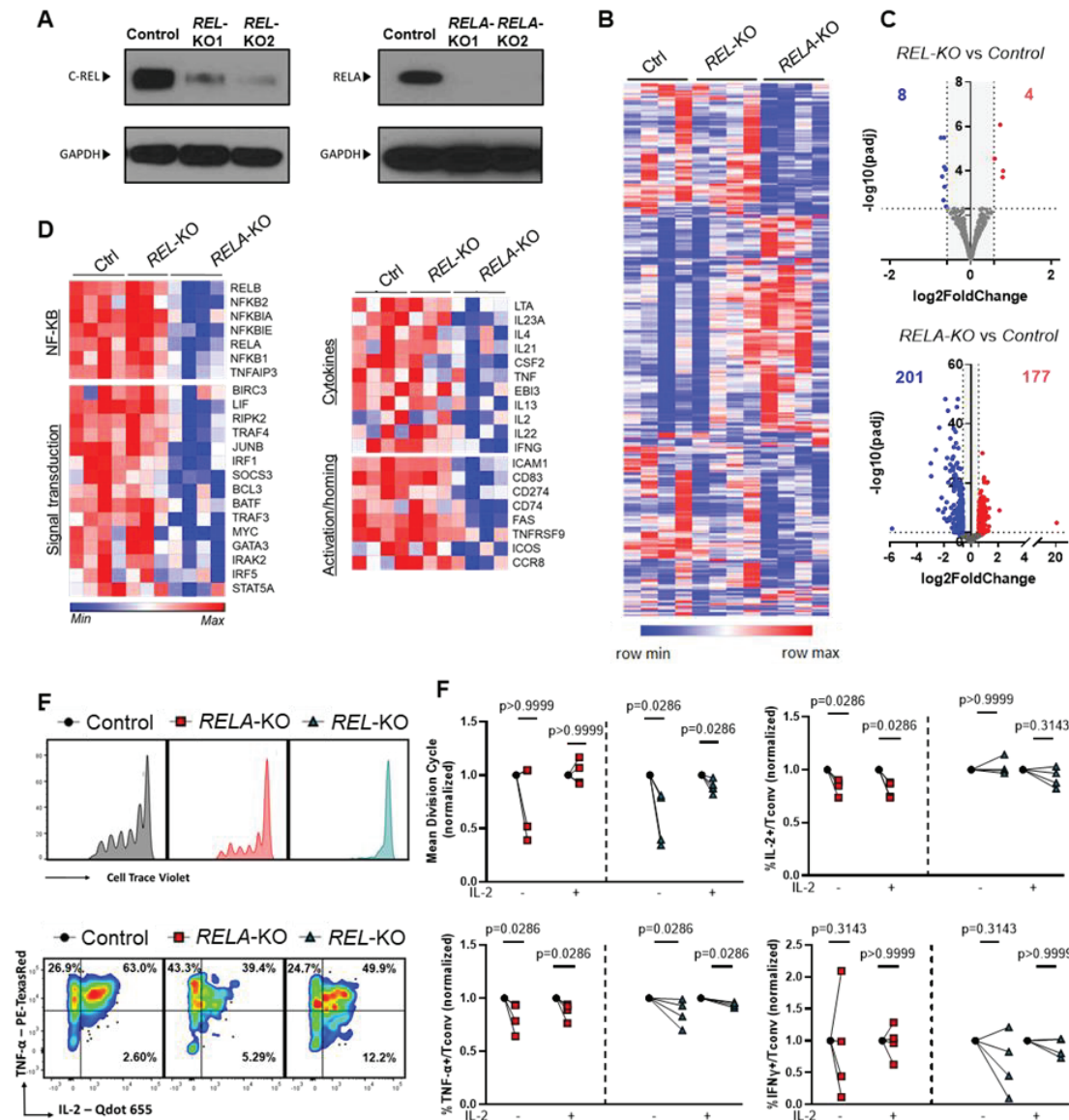


Figure 2: RelA deeply modulates the transcriptome and effector program of human Tconv while c-Rel functions are limited. Primary Human Naive CD4⁺ T cells were isolated from the blood of healthy donors. RELA and REL genes were knocked-out by CRISPR/Cas9 as detailed in the *Methods*. **(A)** Western Blot validation of gene editing efficiency after ATTO550⁺ live cell sorting **(B-D)** RNA-seq analysis following 4-hour stimulation with anti-CD3/CD28 and IL-2. **(B)** Heatmap showing expression of all 384 DEGs (log2 fold change >0.58, p < 0.005). **(C)** Volcano Plot of DEGs **(D)** Heatmaps of selected DEGs. **(E-F)** Gene-edited Tconv cells were sorted and rested for two days and then labelled with CTV and stimulated 3 days with anti CD3/CD28 and IL-2. Cells were analyzed by FACS after PMA-ionomycin restimulation. Representative **(E)** and cumulative data from 3-4 donors **(F)** are shown. Each KO sample is normalized against control sample from the same donor. Western Blot shows 1 representative of 2 experiments. RNA-seq data are from 4 independent donors. multiple Mann-Whitney tests were used.

the mechanism underlying the protection of *Rela*-cKO animals, we analyzed the distribution and phenotype of brain and draining lymph nodes (dLN) cells by spectral flow cytometry 20 days after disease induction. Whereas the number of Tconv cells in dLN was similar in all genotypes, a trend toward lower Tconv numbers could be detected in the brain of *Rela*-cKO mice, suggesting defective recruitment, proliferation and/or

survival in non-lymphoid tissues (Figure 4E). As previously shown in the steady-state, the proportion of Treg cells was decreased in both mutant mice (Supplementary Figure 5C). Importantly, the proportion of CD44^{high} effector/memory Tconv cells was selectively reduced in the brain of *Rela*-cKO animals, suggesting a defective activation process in the non-lymphoid compartment (Figure 4F). In addition, we detected major alterations in the expression of TH17-related cytokines and transcription factors ROR γ t, IL-17A, IL-17F and GM-CSF in *Rela*-cKO Tconv cells, whereas the profile of *Rel*-cKO was similar to the controls (Figure 4G-H). In contrast, TH1 hallmarks T-Bet, TNF- α and IFN γ were found identical in all strains. Of note, TH17 profiles in the dLN were similar in all strains (Supplementary Figure 5 D-E). Thus, RelA activity in Tconv cells is critical for the acquisition of pathogenic features in the central nervous system (CNS). To better understand how RelA and c-Rel differentially shape gene expression and Tconv cell function, we analyzed their transcriptome at the single-cell level by droplet-based scRNA-seq (10X Genomics). A total of 9912 CD4⁺ T cells from dLN and CNS of control, *Rela*-cKO and *Rel*-cKO mice were successfully sequenced. In dLN, 7 clusters could be identified (Supplementary Figure 6A-B). The proportion of 'classical' naïve T cells remained unchanged in all samples (Supplementary Figure 6B). Intriguingly, a cluster of naïve cells enriched for IFN signature (high expression of *Ifit1*, *Ifit3* or *Irf7*, but lacking the expression of co-inhibitory receptors) was found largely enhanced in *Rela*-cKO DLNs (Supplementary Figure 6C-D); this observation was at odds with the *in vitro* transcriptome profile of *Rela*-cKO Tconv cells (Figure 1). *Rel*-cKO DLNs comprised slightly more of the CD44^{high} activated/effector cluster that included all TH1, TH2, TH17 and TFH subsets. As observed by FACS, the proportion of Treg cells was reduced in both mutant strains (Supplementary Figure 6C). Overall, the transcriptomic profiles of dLN Tconv was therefore largely intact in the absence of canonical NF- κ B signaling, reinforcing the idea of a CNS-restricted role of RelA. In fact, scRNA-seq analyses of CNS-infiltrating Tconv supported this hypothesis. 8 clusters could be defined, corresponding to different states of activation as well as a cluster of Treg cells (Figure 4I and Supplementary Figure 6E). Strikingly, we found a massive enrichment of a cluster of naïve cells (characterized by high expression of *Tcf7*, *Sell*, *Ccr7* and *Ly6c1*) in *Rela*-cKO mice, at the expense of *Rorc*⁺ 'classical' (*Csf2* negative) and 'pathogenic' (*Csf2*⁺, *Irfng*^{high}) cell clusters (Figure 4J-K). Interestingly, whereas the proportion of classical TH17 was also reduced in *Rel*-cKO mice, the pathogenic TH17 cluster was unaltered, providing a molecular explanation to the conserved sensitivity of this strain to EAE. To investigate the putative role of RelA in already differentiated TH17 cells, we analyzed gene expression profiles of the 2 TH17 clusters, and found that neither *Rorc*, nor *Il17a*, *Il17f* or *Csf2* expressions, were altered in the absence of RelA (Supplementary Figure 6 F-G). Thus, RelA was clearly involved in the transition from "naïve-like" to TH17 cells in the CNS, but was dispensable for the maintenance of pathogenic cells. Finally, we noted the presence, exclusively in *Rel*-cKO mice, of a cluster of cells closely resembling exhausted T cells, with high expression, of *Tox*, *Pdcd1*, *Lag3* and *Gzmk* (Figure 4J-K and Supplementary Figure 6H); this notion was further supported by the comparison of our data to the projectTILs database³⁹ (Supplementary Figure 6I). The absence of *Cxcr5*, *Tcf7*, *Il6ra* or *Il6st* expression suggested that these cells were not TFH cells (data not shown). In sum, NF- κ B RelA orchestrated Tconv activation in the CNS rather than in the dLN – at least at this time point.

In order to rule out a possible involvement of CD8⁺ T cells, we also analyzed the incidence and severity of EAE in *Rela*-floxed mice crossed to the CD8a^{cre} (E8I^{cre}) background, thereby restricting the ablation of NF- κ B to mature peripheral CD8⁺ T cells. In this context, clinical scores were not reduced in *Rela*-mutant mice compared to controls, thereby confirming the role of RelA in CD4⁺ cells (Supplementary Figure 7A).

Our data show that ablation of *Rela* in T cells conferred global protection against EAE. To better discriminate its putative functions in the priming and the maintenance of the disease, we next crossed *Rela*-floxed mice to the CD4^{cre-ERT2} strain (termed icKO mice), enabling tamoxifen-inducible acute ablation of the gene in peripheral CD4⁺ T cells. Interestingly, we observed that tamoxifen administration induced a recombination-attested by the expression of GFP, that was up to 10-fold higher in Tconv than that in Treg cells (Supplementary Figure 7B). Thus, this strategy allowed not only to keep CD8⁺ T cells intact, but was also largely harmless to Treg cells, enabling the Tconv cell-intrinsic study of RelA. When tamoxifen was administered prior to EAE induction, *Rela*-icKO mice were entirely protected against disease symptoms, confirming the function of RelA in the early pathogenesis process (Figure 4L). In contrast, when tamoxifen injections were started after the appearance of the first symptoms (from D7 on), the course of the disease was similar between control and *Rela*-deficient animals (Figure 4M). This demonstrated that Tconv cell-autonomous RelA was required for the initiation of the disease but dispensable for its extension. Together, this established RelA as a novel and critical regulator of Tconv cell function in autoimmunity.

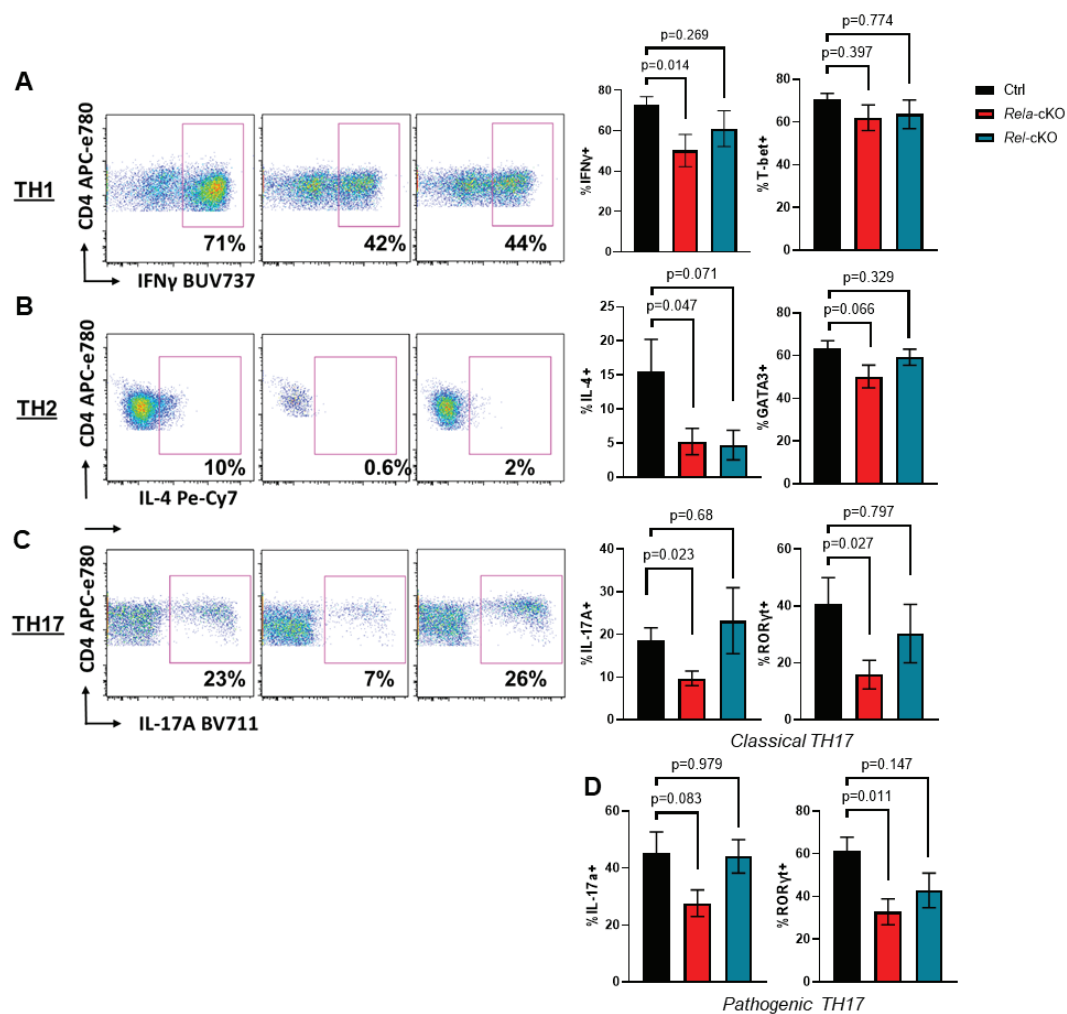


Figure 3: Discrete contributions of RelA and c-Rel in Thelper polarization *in vitro*. Naïve Tconv cells from control, *RelA*-cKO and *Rel*-cKO mice were isolated and cultured under Th1 (A), Th2 (B), Th17 (C) or pathogenic Th17 (D) conditions for 4 days as detailed in the Methods, and their phenotype was analyzed by FACS after PMA-ionomycin restimulation. Representative (left panels) and mean \pm SEM of >3 experiments is shown; multiple Mann-Whitney tests were used.

c-Rel orchestrates the anti-tumor function of Tconv cells

In opposition to their deleterious role in autoimmunity, Tconv cells are currently emerging as critical actors of anti-tumor immunity. Therefore, we wondered whether our discoveries in the settings of EAE could be mirrored in cancer. To overcome the possible roles of NF- κ B in CD8 $^+$ T cells, we used again CD4^{cre-ert2} mice. Control, *RelA* and *Rel*-cKO mice were transplanted with MC38 colon carcinoma cells and treated with tamoxifen from D-1 to D7. Intriguingly, the ablation of c-Rel led to a significant increase in tumor growth, whereas RelA deletion had no impact (Figure 5A-B). Mechanistically, the accumulation of *Rel*-deficient Tconv cells in the tumor bed was significantly impaired, as well as their activation status (CD44, CD25, PD-1) and expression of IFN γ ; overall the proportion of polyfunctional TNF- α ⁺IL2⁺IFN γ ⁺ cells was drastically reduced (Figure 5C-D). In contrast, tumor-infiltrating Tconv cell numbers and functionality was maintained in the absence of RelA. Of note, the proportions of CD44^{hi} and CD25⁺ Tconv cells were reduced in the dLN of both *RelA* and *Rel*-deficient animals (Supplementary Figure 8A). Because tumor growth was not altered

in *Rela*-icKO mice, this suggested that the activity of c-Rel in the tumor bed was a prime determinant of cancer control. In addition, we detected a trend toward reduced cytokine expression by tumor-infiltrating CD8⁺ T cells, showing a decreased CD4 → CD8 help (Supplementary Figure 8A). In order to confirm these data in other model of cancer, we next transplanted B16F10-OVA melanoma cells, to control and icKO mice. The selective acceleration of tumor growth in *Rel*-icKO mice, associated with lower activation and functionality in the tumor, was confirmed in this context (Figure 5E-F); as above, the expression of activation markers and cytokines by Tconv cells, was significantly altered in *Rel*-icKO tumors (Figure 5 G-H). To unequivocally demonstrate that increased tumor growth in *Rel*-icKO animals relied on a Tconv-cell intrinsic role of c-Rel, we utilized a cell-transfer approach. *Rag1*-deficient mice were reconstituted with WT CD8⁺ T cells, Treg cells and B cells, as well as control or *Rel*-cKO CD4⁺ Tconv cells; and subsequently transplanted with MC38 cells (Figure 5I). Again, we observed a dramatic acceleration of tumor growth in animals grafted with *Rel*-deficient Tconv cells (Figure 5J-K). This was again associated with an impaired polyfunctionality in the tumor (Figure 5L). Therefore, these data demonstrate the specific implication of c-Rel in the control of Tconv cell function in tumors.

We next investigated the relevance of these findings in human melanoma. We utilized our bulk RNA-seq data to extract a canonical NF-κB synthetic signature, i.e. genes whose expression was downregulated in all mouse and human *Rel* and *Rela*-deficient Tconv (Figure 6A-B). The prognosis value of this 42-gene signature was assessed using bulk RNA-seq data from melanoma patients obtained at diagnosis. We found a significant improvement of overall survival in patients of the TCGA cohort showing a high NF-κB score (Figure 6C). These findings were further confirmed in cohorts of patients receiving anti-PD-1checkpoint-blockade therapy, and a similar trend was detected in anti-CTLA-4 treated patients (Figure 6D-F).

Altogether, our data suggest that that NF-κB, in particular through its c-Rel subunit, is a prime determinant of anti-tumor immunity.

Discussion

Three decades of literature have demonstrated the critical functions of NF-κB in a myriad of biological processes, especially in innate and adaptive immune responses. However surprisingly, the selective and T-cell autonomous contributions of each of the 5 subunits that compose the family are still largely unresolved. In particular, the role of RelA, which is ubiquitously expressed and widely accepted as a major orchestrator of gene expression profiles, is elusive. RelA was proposed to drive both *Irfng* and *Rorc* expression in mouse T cells^{24,36}; recent CRISPR screening approaches have unraveled its role in human Tconv cell proliferation and *Ii2* expression^{40,41}. In this study, we unequivocally demonstrated that RelA and c-Rel have distinct functions in Tconv cells depending on the disease context. This allows revisiting the paradigm seeing NF-κB as single entity with many roles, to a family of proteins with a restricted set of functions.

These conclusions are enabled by the use of conditional KO mouse models, which, at odds with germline ablations, allowed cell-type restricted ablation of each gene. This was particularly important in the context of immune responses, as NF-κB subunits have been implicated in both the innate and adaptive compartment. The results we have obtained lead to reconsider some of the conclusions that were previously drawn from the study of germline KO animals and mutant patients. For instance, we showed here that RelA, rather than c-Rel, was critical for the acquisition of a pathogenic TH17 profile and for the development of EAE symptoms. This suggested that protection of EAE in *Rel*^{-/-} mice, relied largely on Tconv-cell extrinsic mechanisms, such as dendritic cells or macrophages^{23,42}.

In the steady-state and in autoimmunity, RelA appeared to have a more prominent role than c-Rel in shaping the transcriptome of Tconv cells. This function was achieved both through direct binding to target genes and through the induction of other transcription factors such as AP-1 members. This established RelA as an apex regulator of gene expression in Tconv cells. However, c-Rel, but not RelA, was required for the anti-tumor function of Tconv cells. This critical observation not only reinforced the role of CD4⁺ T cells in cancer immunity, but also unraveled a selective molecular mechanism orchestrating their accumulation and function in the tumor bed. Many different roles have been attributed to Tconv cells in limiting tumor growth, more notably the expression of inflammatory cytokines such as

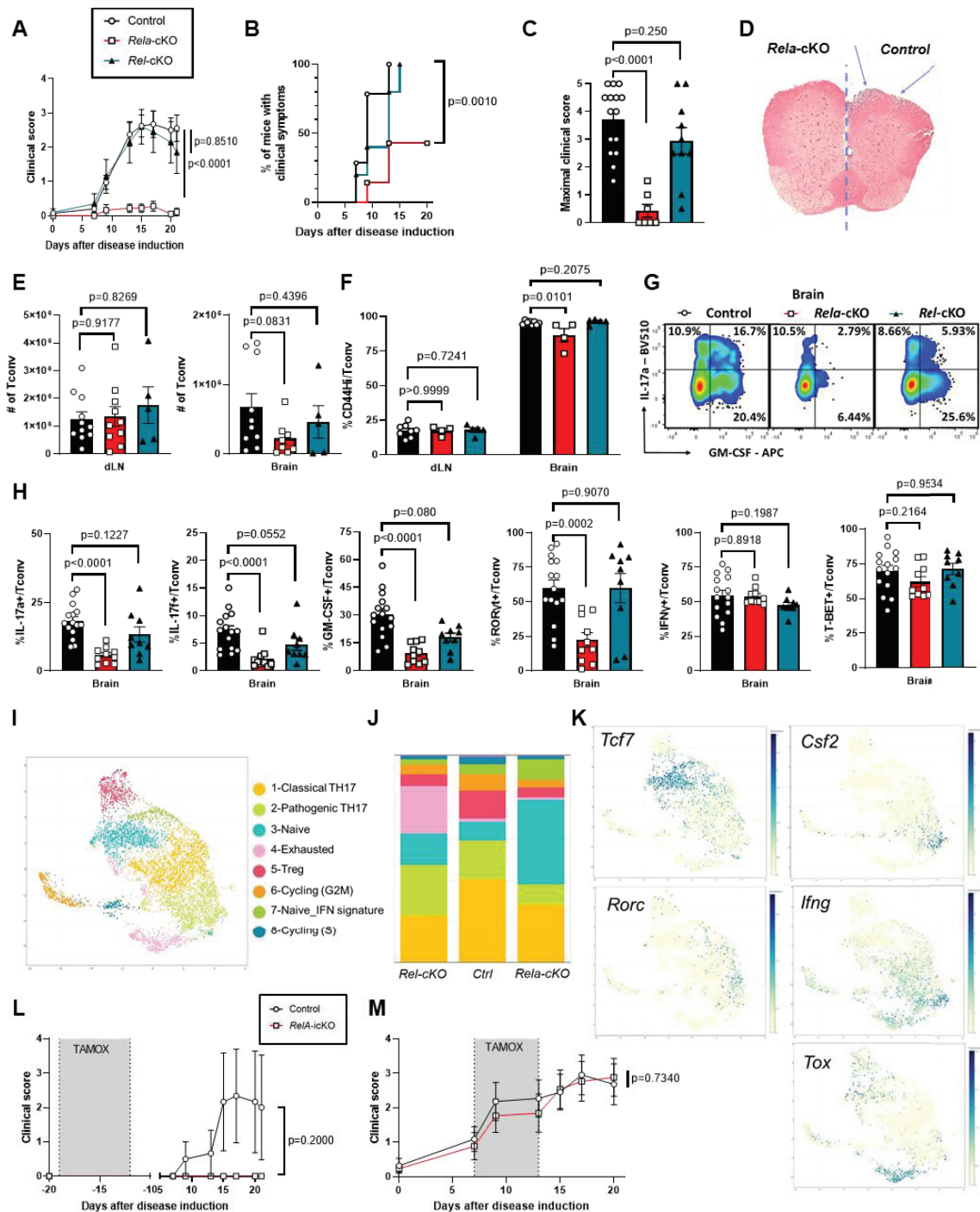


Figure 4: RelA but not c-Rel, is required for Tconv cell pathogenic function in EAE. (A-K) EAE was induced in control, *Rela*-cKO and *Rel*-cKO mice in an SOPF animal facility (CRCL, Lyon, France). (A) Clinical scores progression. (B) Disease incidence. (C) Maximal clinical score. (D) Histological section of spinal cords fixed at D20 and stained with H&E. Blue arrows indicate lesions. (E-H) Immunophenotyping of dLNs and brains by FACS at D20. (E) Absolute numbers of live CD45.2⁺TCRβ⁺CD4⁺CD8⁺Foxp3⁻ Tconv in dLNs and brains. (F) Proportion of CD44^{High} effector/memory Tconv (G-H) Cell suspensions were restimulated with PMA-ionomycin (G) Representative dot plots of IL-17a and GM-CSF expression in brain-infiltrating Tconv. (H) Cumulative proportion of cytokine and transcription factor expression in brain-infiltrating Tconv. (I-K) Brain-infiltrating CD4⁺ T cells were subjected to sc-RNAseq analysis 15 days after EAE induction. (I) Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) plots of single-cell transcriptomic

profiles with 8 clusters projected. (J) Relative proportions of the 8 clusters in the three genotypes. (K) Expression of key marker genes over the UMAP representation. (L-M) EAE was induced in control and *Rela*-icKO mice. Tamoxifen administration (grey boxes) was done prior to EAE induction (L) or after the appearance of clinical symptoms (M). EAE scores and FACS data are shown as mean \pm SEM of 3 (A-H) or 2 (L-M) independent experiments. Each dot represents a mouse; scRNA-seq was done once with 4 pooled mice/sample. 2-way ANOVA with a Bonferroni correction were used to analyze the progression of EAE clinical course. For disease incidence, a Mantel-Cox was used. For maximal EAE scores and immunophenotyping, Mann-Whitney tests were used.

IFN γ ; a help toward CD8⁺ T cells; and a direct cytotoxicity against tumor cells through the secretion of perforin and granzymes. In our data in transplantable tumor models, very few CD4⁺ T cells adopted a cytotoxic phenotype. In contrast, many Tconv cells expressed IFN γ and/or IL-2 in the tumor microenvironment, and these two parameters were strongly altered in *Rel*-icKO animals. Because Tconv cells are also emerging as important actors of the response to immunotherapies such as Chimeric Antigen Receptor-T cells or anti-PD(L)1 checkpoint blockers, it would be interesting to investigate the role of c-Rel in the clinical efficiency of these drugs. Our analyses of public transcriptomic data, suggest that c-Rel activity is of good prognosis for the overall survival of melanoma patients, and their response to anti-PD-1 treatment.

The distinct roles of RelA and c-Rel in autoimmunity and cancer are obviously a puzzling observation. Generally speaking, RelA and c-Rel seemed to control Tconv cell activation in the same manner, i.e. by controlling the transition from naïve/early activated to effector T cells directly in non-lymphoid tissues. However, the molecular basis underlying the selective function of these two transcription factors is yet unclear. One explanation might be the existence of specific binding patterns to target genes. The definition of consensus binding sequences for RelA and c-Rel in Tconv, done by us and others^{26,30}, resulted from ChIP-Seq experiments done *in vitro*, and therefore prevent drawing any conclusions *in vivo*. Moreover, systematic analyses of NF- κ B subunits binding in lymphoma cells lines revealed similar consensus binding sequences^{43,44}. Thus, it is unlikely that a simple separation of DNA binding by RelA and c-Rel could explain this phenotypic discrepancy, although this is still worth additional investigation *in vivo*. Moreover, it remains possible that the dimer composition could impact the preferred binding motif, as shown in cell lines⁴⁵. Another possibility would be the selective expression (or up-regulation) of RelA and c-Rel in CNS and tumor-infiltrating Tconv, respectively. The final hypothesis relies on a differential type, duration and strength of stimulation of surface receptors (TCR, CD28, TNFRSF and other cytokine receptors) that would drive the preferential translocation and DNA-binding of a given subunit. This concept of 'activation modules' has been elegantly approached by Alexander Hoffmann and colleagues, who showed, in primary macrophages, that RelA activation and expression of target genes were dependent on such dynamical features^{46,47}. Added to the complexity of dimer composition and affinity for target genes⁴⁸, this concept may allow generate multi-parameter explanations for the specificity of NF- κ B subunits in inflammation. Such analyses done in Tconv cells, concomitantly for RelA and c-Rel, would undoubtedly provide mechanistic insights to the distinct regulation of disease outcomes by NF- κ B subunits.

In addition to these biological insights, our observations have strong therapeutic implications. Extensive literature highlighting the deleterious roles of (canonical) NF- κ B in autoimmunity and cancer, has led to the development of inhibitors of upstream kinases of the pathway, in particular IKK inhibitors^{49,50}. Nevertheless, despite promising results in murine models of EAE and transplanted melanoma among others, very few compounds were pushed forward to advanced clinical trials, because of lack of efficacy and/or high toxicity⁵¹. One may reason that these failures were in part due to the absence of selective targeting of specific NF- κ B subunits. Our data may thus pave the way toward more potent agents. In autoimmunity, the time-controlled inhibition of RelA appears a promising solution. Although only few chemical inhibitors have been described yet, other approaches such a siRNA targeting *Rela*, may be effective⁵². Ideally, such inhibitors should be directly targeted to T cells, for instance by using antibody-drug conjugates. In cancer, we and others have shown that systemic inhibition of c-Rel restricted tumor growth in mouse models, by targeting the activity of Treg cells and/or myeloid derived suppressor cells^{29,53}. Our results suggest an alternative therapeutic approach consisting in *activating* c-Rel in Tconv cells. This could for instance be achieved by using gene-edited cellular products. A proof-of-concept approach using TCR-transgenic CD8⁺ T cells expressing constitutively active IKK β , or deficient for A20,

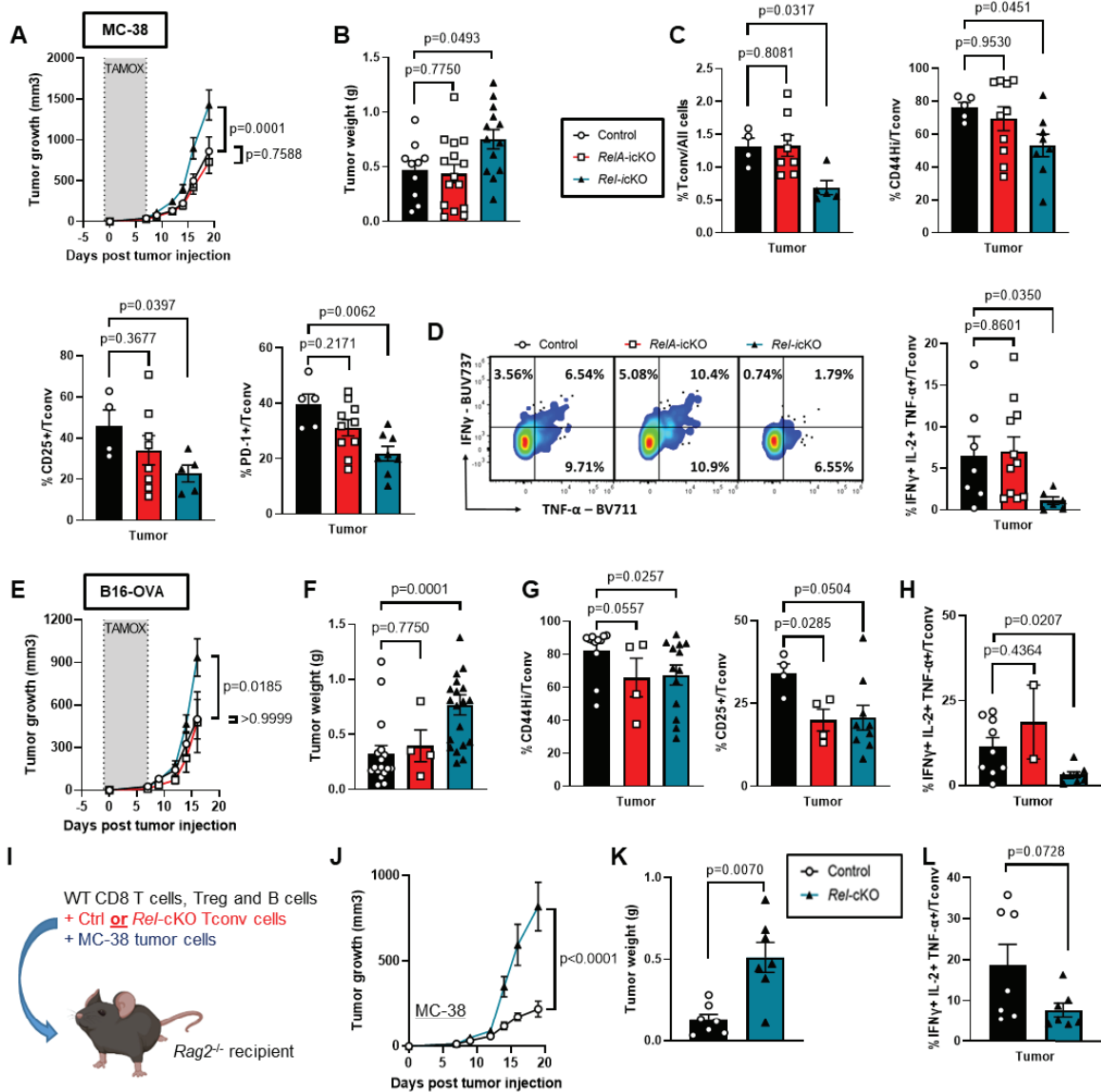


Figure 5. c-Rel orchestrates Tconv cell function in the tumor microenvironment. (A-D). Ctrl, *RelA-icKO* and *Rel-icKO* mice were treated with tamoxifen as indicated (gray box) and transplanted with MC-38 colon adenocarcinoma cells. **(A)** Tumor growth. **(B)** Tumor weight at D19 without **(C)** or with **(D)** PMA-ionomycin restimulation. The proportion of CD45⁺TCR β ⁺CD4⁺CD8⁺Foxp3⁻ Tconv cells among total live cells and their expression of indicated markers in the tumor is shown. **(E-H)** Mice were treated as above and transplanted with B16F10-OVA (B16-OVA) melanoma cells. **(E)** Tumor growth. **(F)** Tumor weight at D19. **(G-H)** FACS analysis at D19 without **(G)** or with **(H)** PMA-ionomycin restimulation. **(I-L)** *Rag2*^{-/-} mice were reconstituted with T and B cells as indicated in I and transplanted with MC-38 cells. **(J)** Tumor growth. **(K)** Tumor weight at D19. **(L)** FACS analysis at D19 following PMA-ionomycin restimulation. Tumor growth, weight and FACS data are shown as mean \pm SEM of ≥ 3 **(A-D)**, 3 **(E-H)** or 2 **(I-L)** independent experiments. Each dot represents a mouse. 2-way ANOVA with a Bonferroni correction were used to analyze tumor growth. For tumor weight and immunophenotyping, Mann-Whitney tests were used.

in murine cancer, provided a rationale for such strategies^{54,55}. Similarly, a gain of function screening approach has recently highlighted that ectopic expression of lymphotoxin-beta receptor in CAR-T cells improved tumor control in an NF- κ B-dependent manner⁵⁶. It would be therefore interesting to investigate the putative superiority of *Rel*-overexpressing TCR-T cells or CAR-T cells, as recently shown with BATF-overexpressing CD19-CAR T cells.

Methods

Mice.

Rel- and *Rela*-Floxed mice were a gift from U. Klein (Leeds University, UK) (Heise et al., 2014). CD4^{cre} (Tg(CD4-cre)^{1Cw1}) on a C57Bl/6 J background were purchased from the Jackson Laboratory. *Rag2*^{-/-} and C57Bl/6 CD45.1 (*Ptprc*^a *Pepc*^b /BoyJ) mice were purchased from Charles River Laboratories France. Mice were bred and used in specific-pathogen-free (SPF) conditions at the CRCL animal facility (Anican). Animals were housed in individually ventilated cages with temperature-controlled conditions under a 12-h-light/dark cycle with free access to drinking water and food. Adult (6–30-week-old) male or female mice were used for all experiments. Studies were conducted in accordance with the animal care guidelines of the European Union and French laws. Protocols were validated by the local Animal Ethic Evaluation Committee (committee C2A15, Comité d'Evaluation Commun au Centre Léon Bérard, à l'Animalerie de transit de l'ENS, au PBES et au laboratoire P4) (Protocol CLB-2018052217411370 and CLB-2019061914498113). The authors complied with the ARRIVE guidelines.

Human subjects

Blood samples from healthy volunteers were obtained through Etablissement Français du Sang (EFS). Clinical and RNA-seq data from melanoma patients were publicly available (TCGA database and REFS)

Cell lines and transplantation.

B16F10 were purchased from the American Tissue Culture Collection (ATCC), and MC-38 cells were a gift from Benoit Salomon (Paris, France). B16F10-OVA cells were made in-house by transfection of the full length ovalbumin pcDNA3-OVA plasmid (Addgene 64599) and validated by PCR and functional assays. Cell lines were maintained in DMEM (Gibco)+10% Fetal Bovine Serum (FBS, Thermo Fisher Scientific). 2×10^5 MC38 or 3.5×10^5 B16F10-OVA cells diluted in 50 μ l ice cold sterile PBS1X were injected subcutaneously into the shaved flank of each mouse. After seven days, tumor size was monitored every other day with a Caliper. Tumor volume was obtained by using the formula: $\text{Width}^2 \times \text{Length}$.

EAE

Mice were injected subcutaneously in each flank with 50 μ g of MOG35-55 peptide (Smart Biosciences SB023) emulsified in 100 μ L of complete Freund adjuvant (Sigma-Aldrich) supplemented with 243 μ g of heat killed *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (Difco-BD Bioscience 2311). Bordetella pertussis toxin (200ng/ injection, Enzo) was injected intravenously at the time of immunization and two days later. Disease severity was evaluated every other day following an established scoring system, in a semi-blinded fashion: 0, no clinical sign; 1, limp tail; 2, limp tail, impaired righting reflex, and paresis of one limb; 3, hindlimb paralysis; 4, complete hindlimb and partial forelimb paralysis; to 5, moribund/death. A score of 5 was permanently attributed to dead animals. After 21 days, mice were anesthetized with

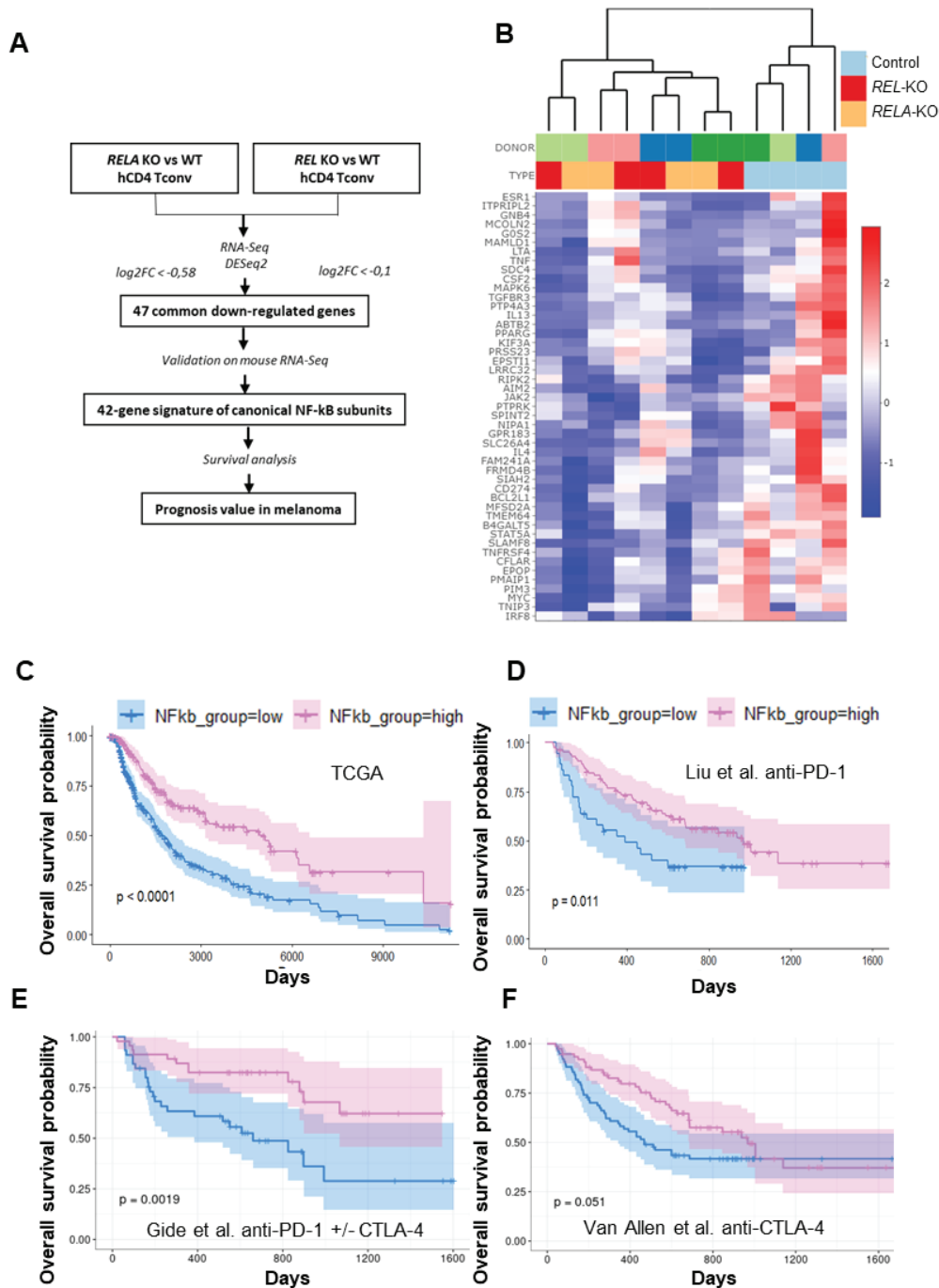


Figure 6. A Tconv-derived canonical NF- κ B signature predicts survival in melanoma patients. (A) Extraction of the 42-gene signature. **(B)** Heatmap depicting expression of the 42 genes in human Tconv cells. **(C-F)** Overall survival of patients from 4 separate melanoma cohorts, using a Cox proportional hazards regression model (coxph, survfit). Tumors were segregated into two group depending on the NF- κ B canonical score (low in blue, high in pink). Plots were done manually **(C)** or using the TIGER database **(D-F)**.

a mixture of ketamine and xylazine and perfused with ice cold PBS1X. Draining (brachial) lymph nodes, brain and spinal cord were harvested in ice cold NaCl solutions.

Preparation of cell suspensions.

Single cell suspensions from LN and spleens were obtained by mechanical dilaceration in FACS Buffer (PBS 1X + 2% FBS, 2 mM EDTA) with glass slides, strained, washed in complete RPMI and enumerated.

Brains and spinal cords were cut into small pieces and digested in RPMI 1640 (Gibco) supplemented with 1 mg/mL collagenase type IV (Sigma-Aldrich), 500 µg/mL DNase I (Sigma-Aldrich) for 30 min at 37 °C followed by mechanical desegregation. Reactions were stopped by the addition of 15 mL PBS1X containing 5 mM EDTA. The solution was passed through a 70 µm cell strainer and residual solid pieces were mechanically disrupted. After centrifugation, cell pellets were resuspended in 8 mL of Percoll 40% (Sigma-Aldrich) and then laid on 4 mL Percoll 80% in a 15 mL polypropylene tube. Tubes were spun at 2500 rpm for 20 min at RT. Mononuclear cells were collected from the interface of the 40:80% Percoll gradient, washed in complete RPMI and enumerated.

Tumors were cut in small pieces and digested in RPMI 1640 (Gibco) supplemented with 1 mg/mL collagenase type IV (Sigma-Aldrich), 250 µg/mL DNase I (Sigma-Aldrich) for 25 min at 37 °C followed by mechanical desegregation. Reactions were stopped by the addition of 15 mL PBS1X containing 5 mM EDTA. The solution was passed through a 70 µm cell strainer and residual solid pieces were mechanically disrupted. After centrifugation, cell pellets were resuspended in 8 mL of Percoll 44% (Sigma-Aldrich) and then laid on 4 mL Percoll 67% in a 15 mL polypropylene tube. Tubes were spun at 2500 rpm for 20 min at RT. Mononuclear cells were collected from the interface of the 40:80% Percoll gradient, washed in complete RPMI and enumerated.

Flow cytometry

For cytokine analysis by FACS, single cell suspensions were stimulated for 4 h at 37 °C with 50 ng/mL PMA (Sigma), 1 µg/mL ionomycin (Sigma-Aldrich) and 1X Protein Transport Inhibitor containing Brefeldin A (BD GolgiPlug). Cells were washed in PBS1X and stained with a viability marker for 10 min at RT in the dark. Cells were washed in PBS1X, and incubated with 50 µL surface marker antibody mix for 20 min at 4 °C in the dark. Cells were then washed in PBS1X and fixed and permeabilized using the eBioscience Foxp3/ Transcription Factor Staining Buffer Set (Thermo Fisher Scientific) according to manufacturer's instructions. Cells were washed and incubated with the intracellular marker antibody mix for 20 min at 4 °C in the dark, washed in permeabilization buffer and resuspended in FACS Buffer.

When recombinant GFP was analyzed, after cell surface labelling, cells were fixed by using 2% paraformaldehyde (MPbio Cat: 199983) for 30 minutes (instead of the eBioscience Foxp3/ Transcription Factor Staining Buffer Set) and then washed two times with wash buffer from the eBioscience Foxp3/ Transcription Factor Staining Buffer Set. Then for intracellular labelling, cells were washed and incubated with the intracellular marker antibody mix for 30 min at 4 °C in the dark, washed in permeabilization buffer and resuspended in FACS Buffer.

Occasionally antibodies coupled to biotin were used. In this case, there was an extra step of staining with fluorochrome-coupled streptavidin (in FACS buffer if cell surface labelling or wash buffer if intracellular labelling).

The complete list of antibodies can be found in Supplementary Table 1. Acquisition was performed on a LSR Fortessa (BD Biosciences) or an Aurora spectral cytometer (Cytex). Data were analyzed with FlowJO software V10.7.2 (Tree Star, www.fowjo.com).

Mixed Bone marrow chimera

Bone marrow cells were isolated from tibia and femur of donor mice. Red blood cells were lysed and cells were enumerated. Bone marrow mixes were done with $\frac{1}{3}$ WT CD45.1 Bone marrow and $\frac{2}{3}$ CD45.2 Bone marrow of interest (CD4^{cre}, CD4^{cre} *Rela*^{flox/flox} or CD4^{cre} *Rel*^{flox/flox}). Recipient mice were sublethally irradiated (7 Gy) and transplanted intravenously (retro orbital sinus) with 10×10^6 bone marrow cells. Mice were given Neomycin (200ng/mL) in the water for ten days. Tissues were harvested 8 weeks after reconstitution for subsequent analyses.

T/B-cell reconstitution of *Rag2*^{-/-} mice

Spleen and lymph nodes of donor mice were dissected, soaked in two baths of 70% ethanol and two baths of PBS1X. Tconv were isolated by using the CD4⁺ T Cell Isolation Kit, mouse (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer protocol. Anti CD25-biotin antibody was added to the isolation cocktail in order to remove Treg cells.

Treg cells were isolated by labeling with anti CD25-biotin antibody CD25⁺ cells, containing 80-90% CD4⁺Foxp3⁺ cells, was recovered from the positive fraction of a LS column (Miltenyi). B cells were isolated by labeling with anti CD19-biotin antibody followed by an incubation with anti-biotin microbeads (Miltenyi Biotec), and recovered as above. CD8⁺ T cells were isolated using the MojoSort™ Mouse CD8 T Cell Isolation Kit (Biolegend) according to the manufacturer protocol. 2.5×10^6 Tconv, 0.6×10^6 Treg, 2×10^6 CD8⁺ T cells and 2.5×10^6 B cells were injected intravenously to anesthetized *Rag2*^{-/-} mice. MC-38 cells were transplanted 7 days later.

NF-κB ablation in human T cells

Peripheral blood mononuclear cells were isolated by Ficoll density gradient centrifugation and Red blood cells were lysed with Ammonium-Chloride-Potassium lysis Buffer. Naive CD4⁺ T cells were sorted by using the EasySep Human Naive CD4 T cell Isolation kit II (Stemcell) according to the manufacturer protocol. Cells were enumerated and resuspended at 1×10^6 cells/mL in complete RPMI 1640 W/HEPES W/GLUTAMAX-I (Supplemented with 10% FBS; Penicillin/Streptomycin; Non-Essential Amino Acids; Sodium Pyruvate and β-Mercaptoethanol) with IL-2 (25U/mL) and Dynabeads CD3/CD28 (1 bead:4 T cells). Cells were kept in culture for 3 days.

Ribonucleoproteins (RNP) complex were prepared by mixing crRNA (IDT), tracrRNA (IDT), CAS9 (Truecut v2 cas 9, Invitrogen) and electroporation enhancers (IDT) at equimolar ratio in a final solution at 7,5 nmol/mL. Of note, tracrRNA is fused with ATTO550, a fluorescent protein. First, crRNA and tracrRNA were incubated 5 minutes at 95°C then 15 minutes at 37°C. Then CAS9 was added and solutions were incubated for 15 minutes at 37°C. Finally, Electroporation enhancer was added to the mix. During this time cells were separated from the dynabeads, washed and resuspended at 14×10^6 cells/ml in Buffer T (Neon transfection system, Invitrogen). Then cells and RNP complex were mixed so that 1.3×10^6 cells could be electroporated in a 100μl Neon Tip with 50 pmol of RNP. Electroporation was performed with the Neon transfection system (1600V, 10ms, 3 pulses). Then cells were put in 1.9 mL of complete RPMI with IL-2 (20U/mL) and Dynabeads CD3/CD28 (1 bead : 10 T cells). Cells were kept in culture for 3 days. Next, cells were separated from the dynabeads, washed and stained with DAPI in FACS Buffer. DAPI⁻ ATTO550⁺ cells were sorted on a FACS ARIA II system and cells were used for Western Blot and proliferation/cytokine expression assays.

***In vitro* Thelper polarization assays.**

Naïve CD4⁺ T cells were negatively isolated using the Naïve CD4⁺ T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec). Cells were labeled using the CellTrace Violet Cell Proliferation Kit (CTV; Thermo Fisher Scientific). 3 × 10⁴ cells were stimulated with 6 × 10⁴ T cell-depleted mitomycin C-treated Ly5.1 splenocytes, 2 µg/mL soluble anti-CD3ε (clone 145-2C11, BioXcell), in complete IMDM (10% FBS, 25,000 U Penicillin/Streptomycin, 10 mM sodium pyruvate, non-essential amino acids and 50 µM 2-Mercaptoethanol) (Gibco). The culture medium was supplemented as follows: TH1: 20 ng/mL mIL-12 (Peprotech), 10 ng/mL mIL-2 (Miltenyi), 2 µg/mL anti-mouse IL-4 (clone 11B11 BD Biosciences); TH2: 30 ng/mL mIL-4 (Peprotech), 2 µg/mL anti-mouse IFNγ (clone XMG1.2 BD Biosciences), 2 µg/mL anti-mouse IL-12 (clone C17.8 BD Biosciences); 10 ng/mL mIL-2; TH17: 1 ng/mL hTGF-β, 20 ng/mL mIL-6 (Peprotech), 2 µg/mL anti-mouse IFNγ, 2 µg/mL anti-mouse IL-4, ; pathogenic TH17 : same as TH17 with 5 ng/mL mIL-1β (Peprotech); 5 ng/mL hIL-23 (Peprotech) and 2 µg/mL anti-mouse IL-2 (clone JES6-1A12, Biolegend). After 4 days of culture, Proliferation and subset-specific transcription factors and cytokine expression were assessed by FACS.

Histology

Spinal cords were fixed in 4% formaldehyde solution (Sigma) for 1 day and stored at 4 °C in EtOH 70%. They were then embedded in paraffin, sectioned and stained with hematoxylin/eosin (Sigma-Aldrich).

Bulk RNA-sequencing

RNA from 1-2M T cells was isolated with Nucleospin RNA extraction kits (Macherey Nagel); libraries were prepared using an Illumina TruSeq Library Kit and sequenced by an Illumina NovaSeq instrument. Reads were aligned on reference genomes (mm10 for mouse data, GRCh38 for human data); DEGs were calculated with DESeq2. Heatmaps were created with Morpheus ([Morpheus \(broadinstitute.org\)](http://Morpheus.broadinstitute.org)). GSEA was computed using the GSEA application and HO, KEGG, Hallmarks and c7 packages. Comparison with public ChIP-Seq data was done after peak annotation with the library org.Mm.eg.db and the function `annotatePeak` with a `tssRegion` range defined as (-10000, 5000). Given that one gene can have multiple binding sites, we used the `aggregate` function to count the number of occurrence of a target gene and extract target genes name without duplicate.

Single-cell RNA-sequencing

T cells were be FACS-sorted (BD ARIA 3) from tumors, brains and draining lymph nodes. 3000-4000 cells/experimental group, pooled from independent mice, were encapsulated using the Single Cell Controller (10x Genomics, Pleasanton, CA) and the Chromium Single Cell 3'Library & Gel Bead v3.1 kit. Libraries were sequenced on an Illumina NovaSeq. Reads were aligned with Cell Ranger, (10X Genomics). Quality controls, Seurat clustering, two-dimensional projection of expression profiles (T-SNE), Differentially Expressed Gene (DEG), and pathway analyses were computed using R and the corresponding Bioconductor packages.

Western Blot

Total lysates were extracted using RIPA buffer and protease inhibitors with SDS. 20 µg protein extracts were ran in polyacrylamide gels and transferred onto PVDF membranes. Membranes were first blocked

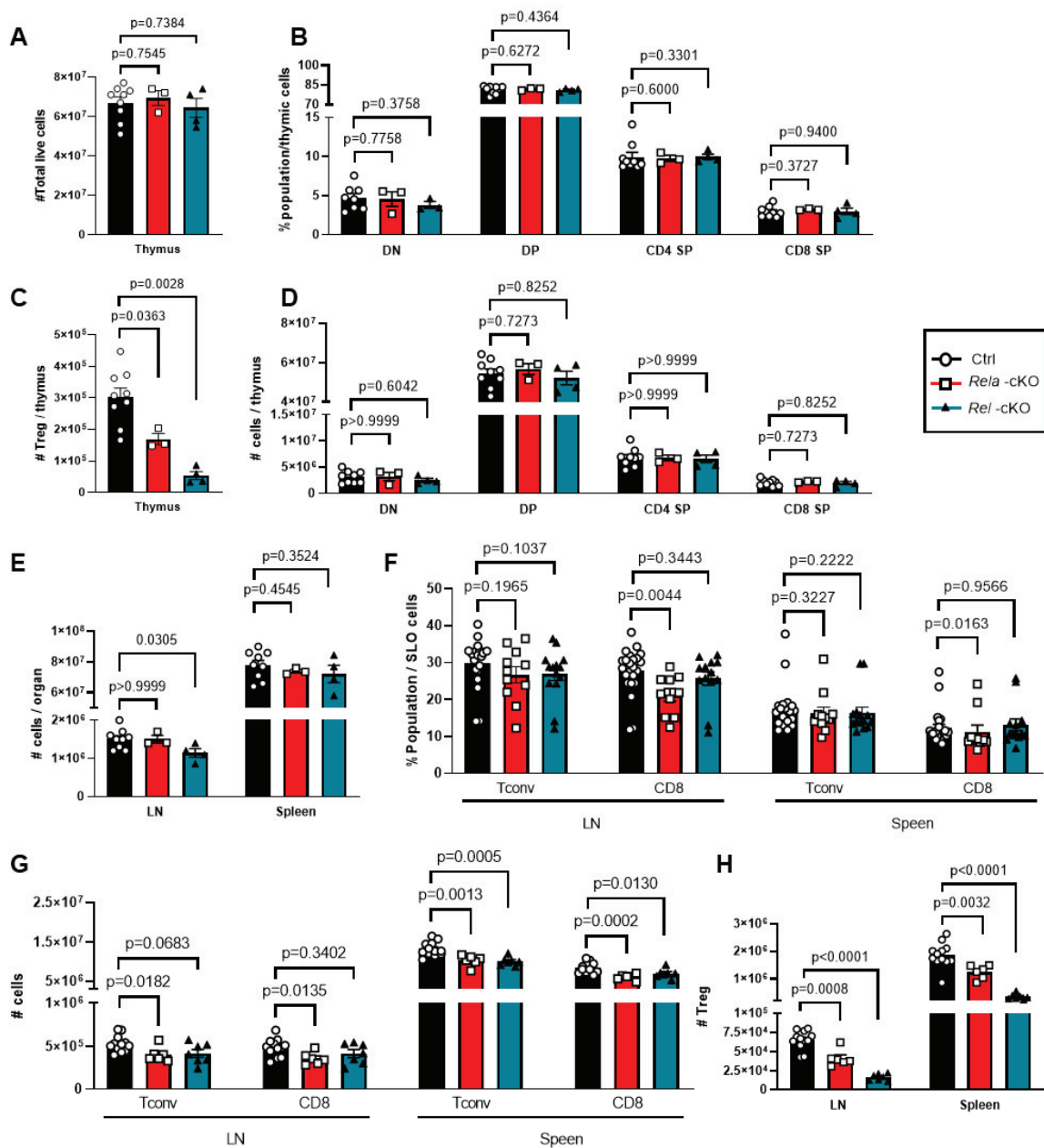
with TBS-T + milk 5% for 45 minutes at room temperature. Then membranes were incubated overnight at 4°C with the antibodies of interest diluted in TBS-T + milk 2.5%. Next morning, membranes were washed 3 times with TBS-T for 10 minutes and incubated with secondary antibodies diluted in TBS-T + milk 2.5% for 1H at room temperature. Finally, Membranes were washed 4 times with TBS-T for 10 minutes, and soaked with “Luminata Forte” or “Luminata Classico” revealing buffer for 1 minute and revealed.

Antibodies used are available in Supplementary Table 1.

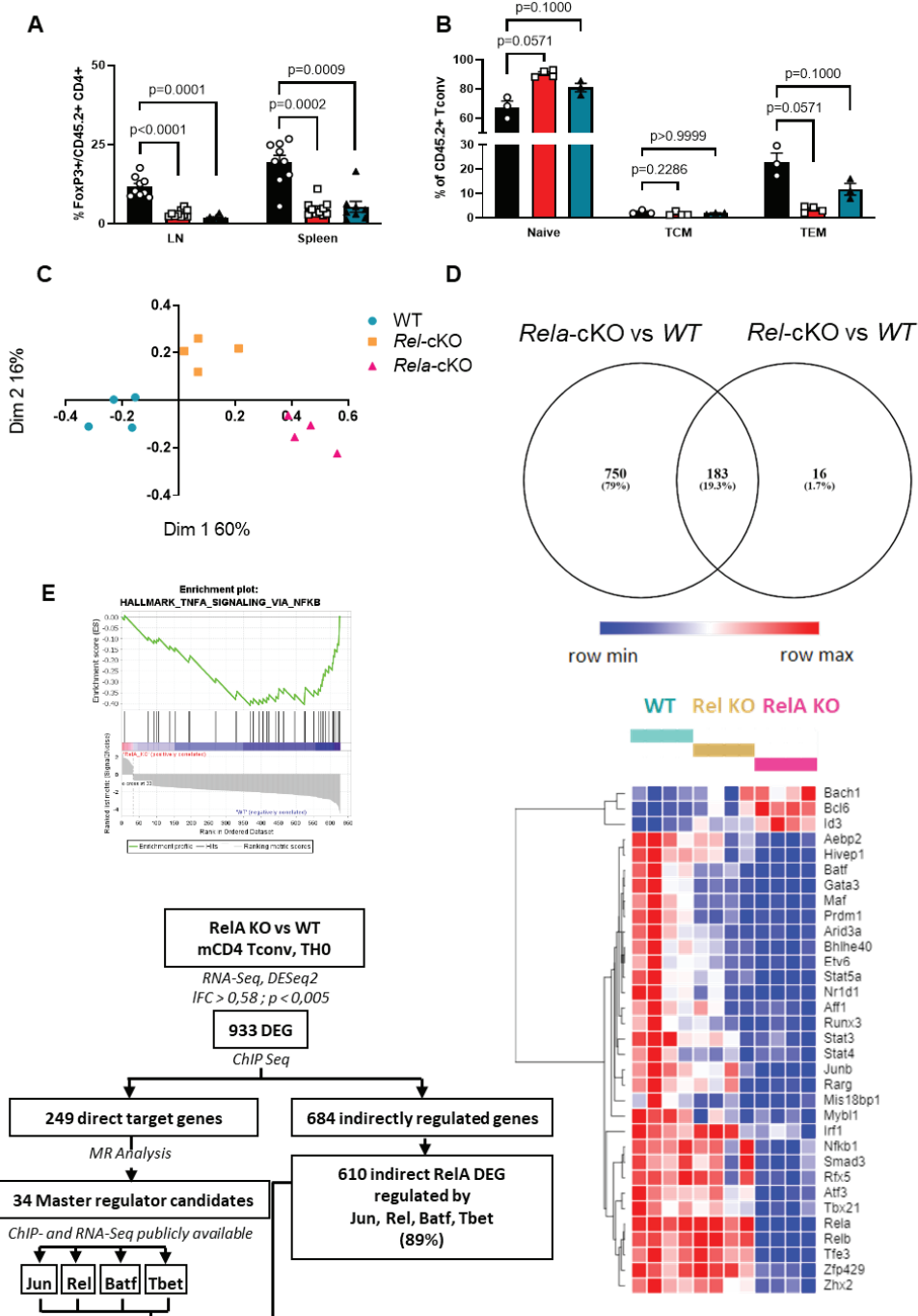
Statistics

Statistics were performed using GraphPad Prism Software v9 (<https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>). Unless mentioned otherwise, two-tailed Mann–Whitney t test was used to calculate statistical significance. P values <0.05 were considered significant.

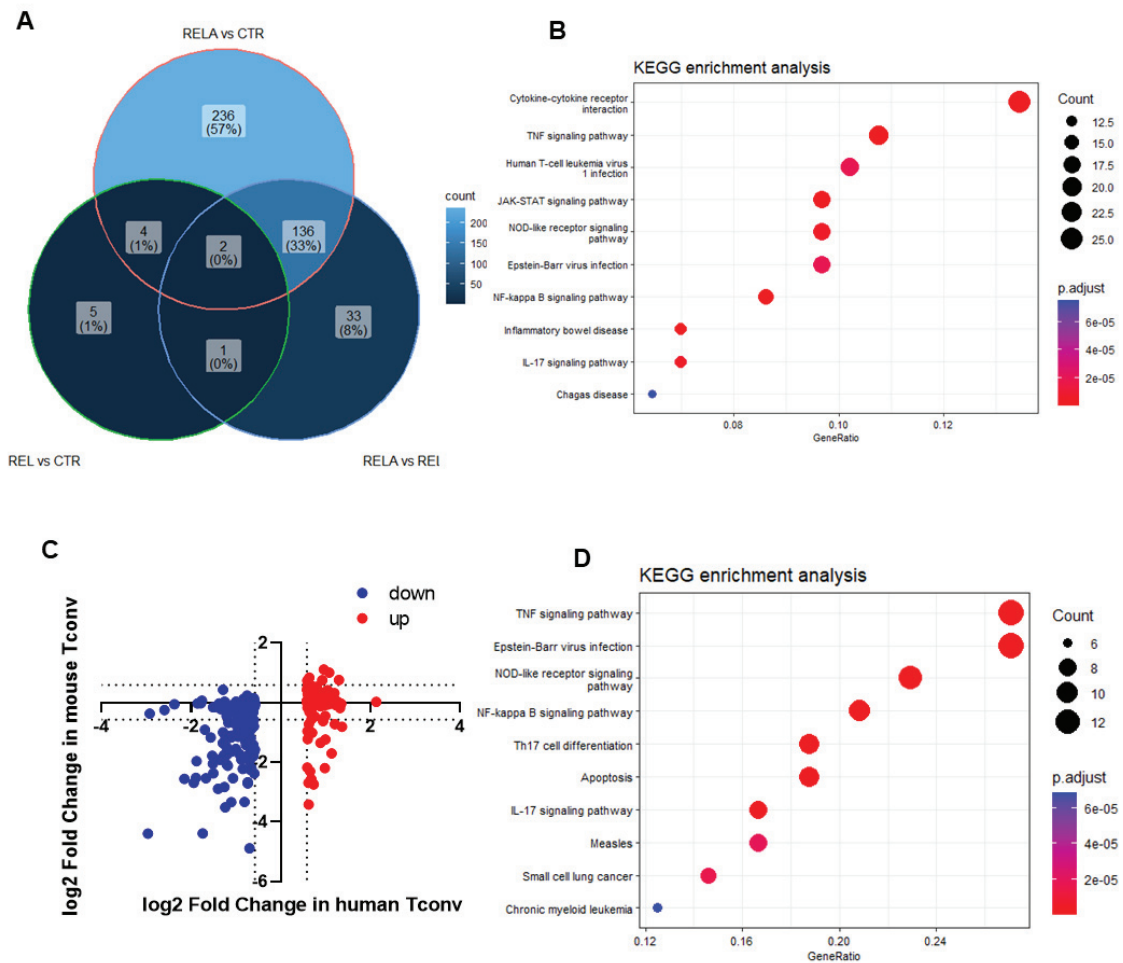
For tumor growth and EAE score analysis, we used 2-way ANOVA followed by Bonferroni post-test (when more than 2 groups), and the non-parametric Mann-Whitney U test (when only 2 groups). Data availability Flow cytometry and other raw data will be made available upon request.



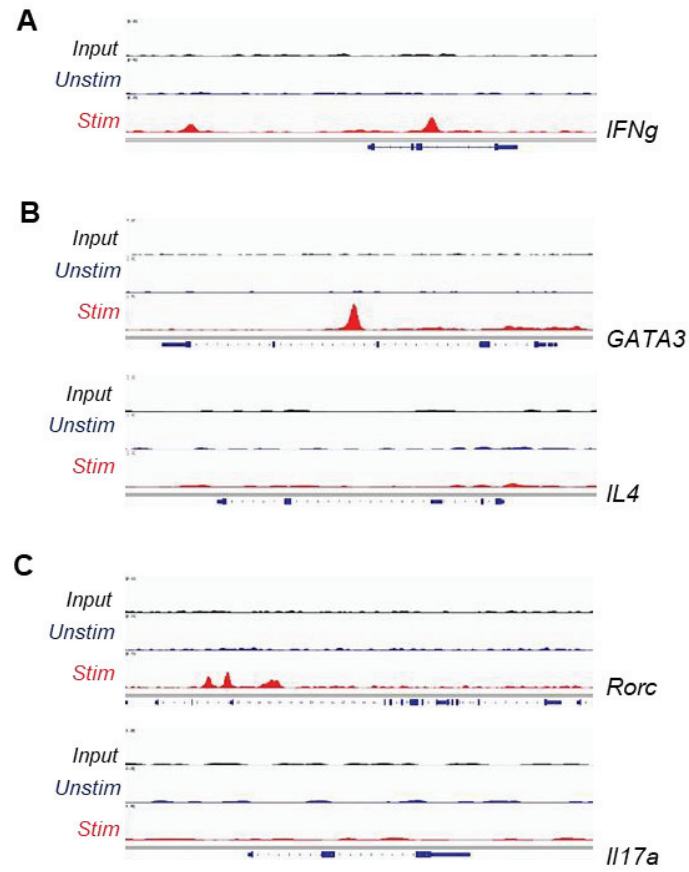
Supplementary Figure 1: Single NF- κ B subunit ablation does not impact Tconv cell development and homeostasis. Thymus, spleen and peripheral lymph nodes (LN) from control, *Rela*-cKO and *Rel*-cKO mice were analyzed by flow cytometry. **(A-D)** Analysis of the thymus **(A)** Number of total live cells. **(B)** Proportion of double negative (DN), double positive (DP) and simple positive (SP) CD4⁺ and CD8⁺ T cells. **(C)** Quantification of live Treg **(D)** Quantification of DN, DP and SP CD4 and CD8 T cells. **(E-H)** Analysis of spleens and peripheral lymph nodes. **(E)** Number of total live cells. **(F-G)** Proportions and numbers of Tconv and CD8⁺ T cells among total live cells. **(G)** **(H)** Numbers of live CD45.2⁺TCR β ⁺CD4⁺CD8⁺Foxp3⁺ Treg cells. FACS data are shown as mean \pm SEM of 2 experiments; each dot represents a mouse; multiple Mann-Whitney tests are used.



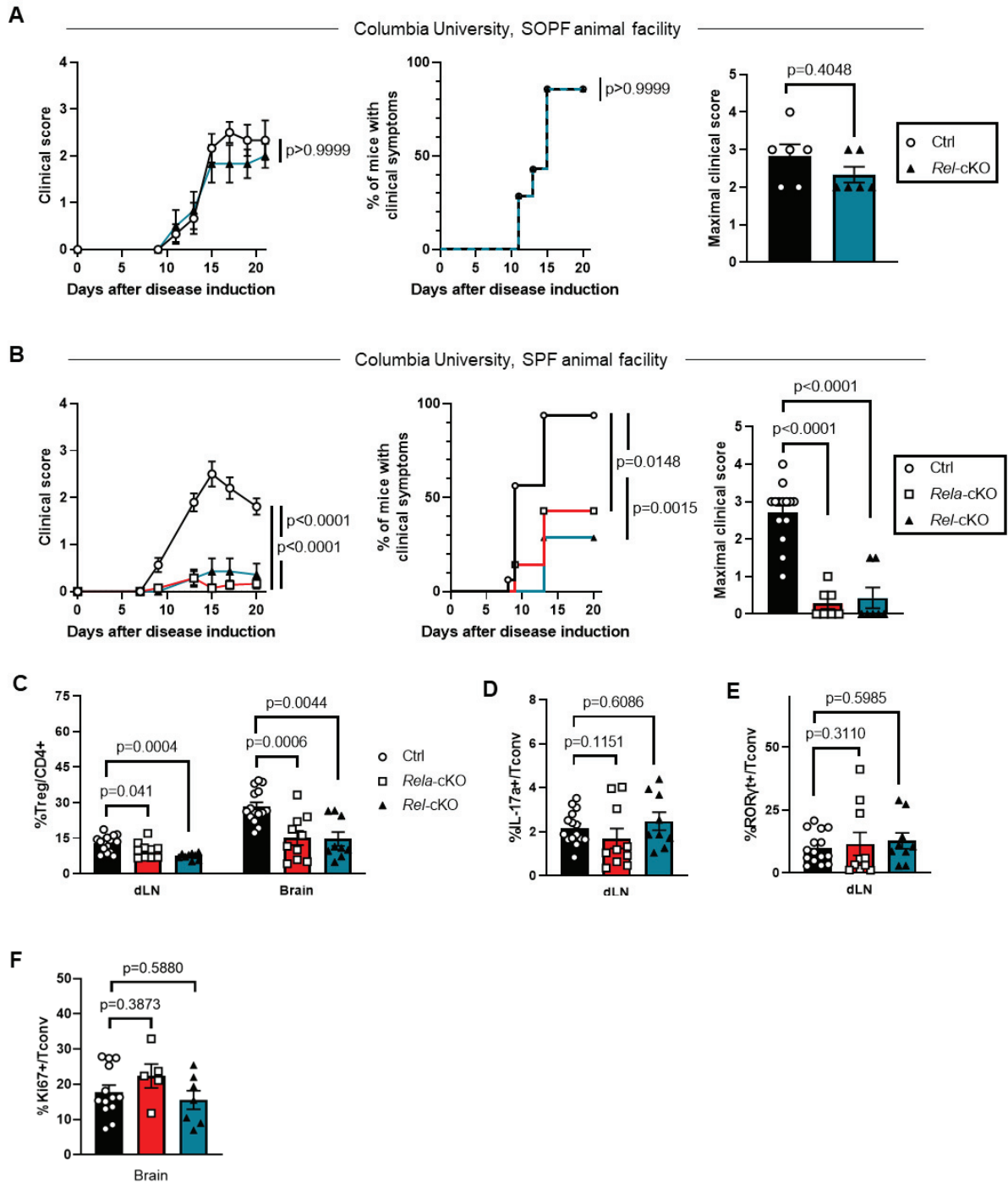
Supplementary Figure 2: Mouse Tconv cell homeostasis and transcriptome are predominantly controlled by NF- κ B RelA. (A-B) FACS analysis of mixed bone-marrow chimera mice from Figure 1. (A) Proportion of FoxP3⁺ Treg among CD45.2⁺ CD4⁺ cells in secondary lymphoid organs. (B) Proportion of naive (CD44⁺CD62L⁺) TCM: T Central Memory (CD44⁺CD62L⁺) and TEM: T Effector Memory (CD44⁺CD62L⁻) among CD45.2⁺ Tconv in spleen. (C-E) Analysis of RNA-seq data from Figure 1. (C) Correspondence analysis of mCD4 Tconv counts of the all genes of WT (blue points), *Rel-cKO* (orange squares) and *RelA-cKO* (pink triangles) murine CD4 Tconv before differential expression analysis. (D) Venn partition of gene expression (log₂ fold change >0.58, $p < 0.005$). (E) Strategy for the identification of indirect transcriptional regulators. (F) Expression of the 34 master regulator candidates. FACS data are shown as mean \pm SEM of 2 experiments; each dot represents a mouse; multiple Mann-Whitney tests were used. RNA-seq data are from 4 independent samples.



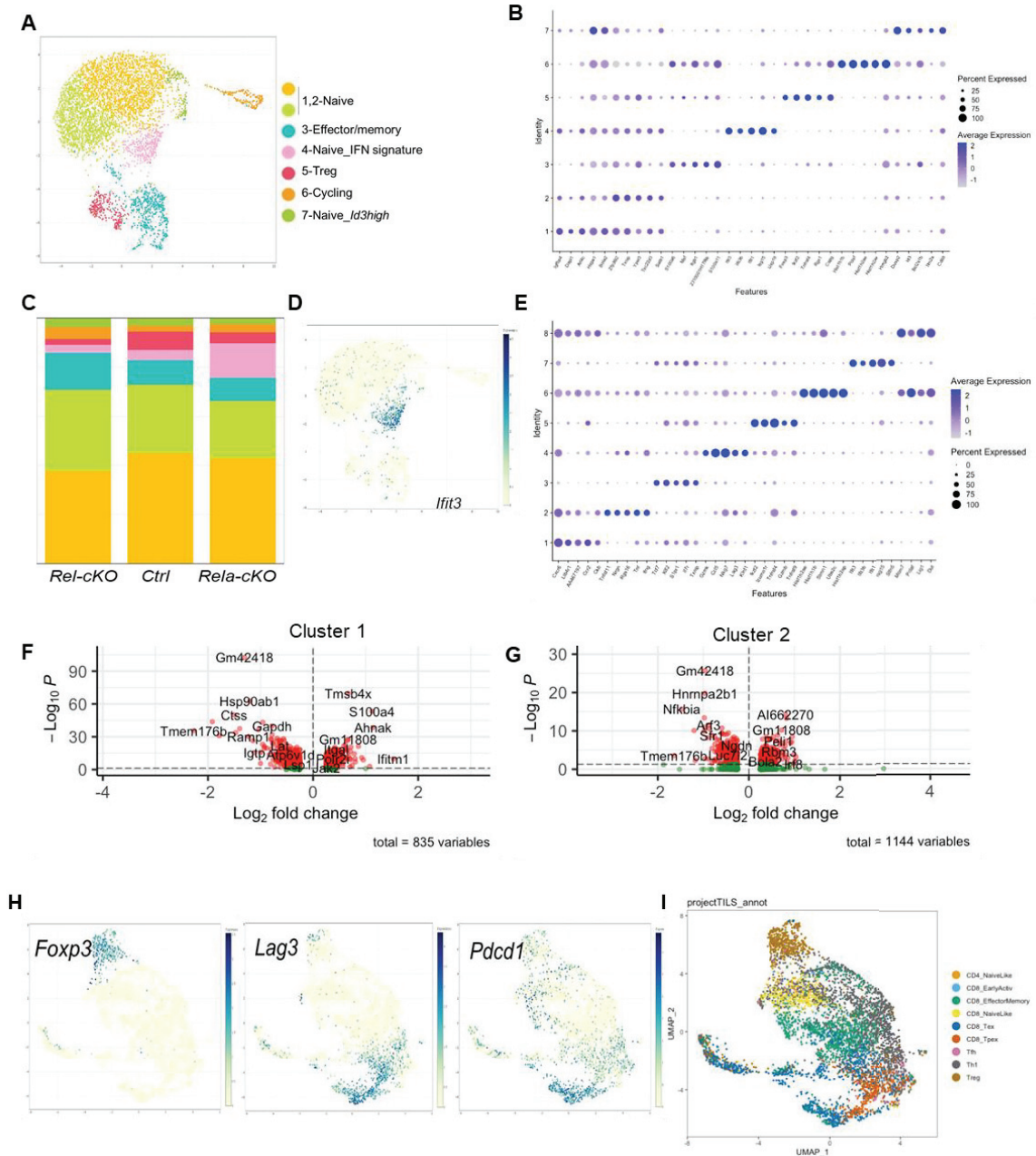
Supplementary Figure 3: RNA-seq analysis of human gene-edited Tconv cells. (A) Venn partition of DEGs (\log_2 fold change >0.58 , $p < 0.005$) **(B)** KEGG enrichment analysis of *RELA*-KO DEGs. **(C)** Mouse gene expression of the 378 *RELA*-KO DEGs. **(D)** KEGG enrichment analysis of the 80 common downregulated genes in mouse and human *RELA*-KO Tconv cells.



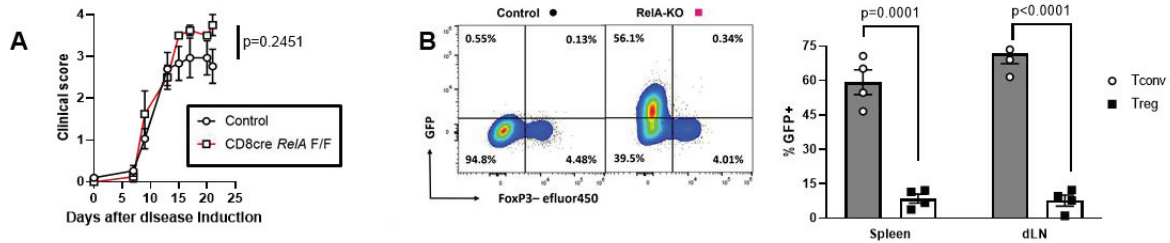
Supplementary Figure 4: RelA binding to Thelper signature loci. RelA ChIP-Seq data from Oh *et al*, 2017 were visualized using Integrative Genome Viewer.



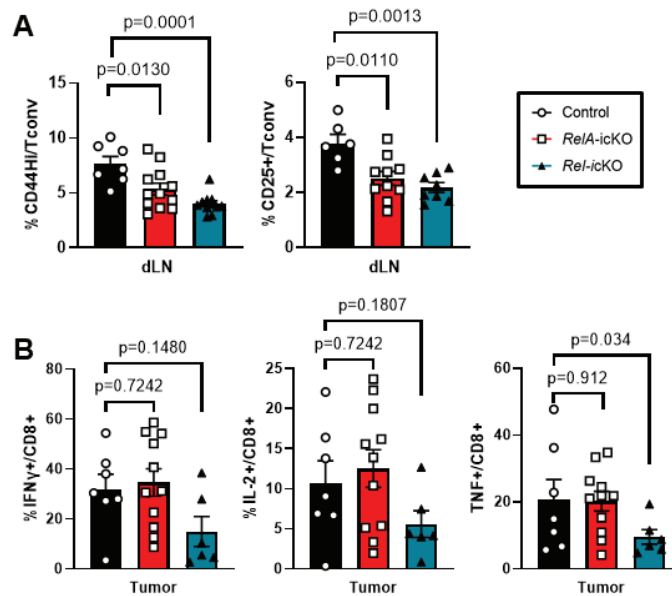
Supplementary Figure 5: Dependency of EAE on c-Rel depends on the sanitary status of the facility. (A-B) EAE was induced in control *Rel-cKO* +/- *Rela-cKO* mice in SOPF (A) and SPF (B) animal facilities in Columbia University, New York, USA. EAE clinical score progression, disease incidence and maximal clinical score are depicted from left to right. Data are shown as mean +/- SEM or 1(A) or 3 (B) experiments; each dot represents a single mouse (C-E) Immunophenotyping of dLNs and brains of mice following EAE induction as in Figure 4. (C) Proportion of Treg in CD4⁺ T cells. Proportion of Tconv expressing IL-17a (D) and RORγt (E) in the dLN. (F) Proportion of Tconv expressing Ki67 in the brain.



Supplementary Figure 6: Molecular control of pathogenic Tconv by Rela in EAE. EAE was induced in control, *Rela*-cKO and *Rel*-cKO mice. At D15, CD4⁺ T cells were sorted from dLN (A-D) and from brains (E-I). (A) Projection (UMAP) plot showing the projection of 7 clusters in dLN. (B) Leading genes defining each cluster in dLN (C) Relative proportions of the 7 clusters in the three genotypes in dLN. (D) Expression of *Ifit3* over the UMAP representation. (E) Leading genes defining each cluster in brains. (F-G) DEG analysis of brain *Rela*-cKO T cells in cluster 1 and 2.



Supplementary Figure 7: The role of RelA in Tconv pathogenicity. (A) EAE was induced in control and CD8^{cre}RelA^{F/F} mice; clinical scores are shown as mean +/- SEM of 1 experiment with >4 mice/group. (B) Tamoxifen was administered to control and RelA-icKO mice as in Figure 4M; GFP expression in Tconv and Treg cells was analyzed by FACS 7 days after tamoxifen termination. Data shown as mean +/- SEM, are from 1 out of 2 experiments. Mann-Whitney tests were used.



Supplementary Figure 8. c-Rel ablation impacts the priming of Tconv cells in dLN and CD8+ T cell activation. Ctrl, RelA-icKO and Rel-icKO mice were treated as in Figure 5A and transplanted with MC-38 cells; dLN and tumor tissues were analyzed by FACS at D19. (A) Expression of the indicated markers by Tconv in dLN. (B) Expression of indicated markers by live CD45⁺TCR β ⁺CD8⁺CD4⁻ cells in tumor. FACS data are shown as mean +/- SEM of ≥ 3 independent experiments. Each dot represents a mouse. Mann-Whitney tests were used.

- 1 Cohen, M. *et al.* The interaction of CD4(+) helper T cells with dendritic cells shapes the tumor microenvironment and immune checkpoint blockade response. *Nat Cancer* **3**, 303-317, doi:10.1038/s43018-022-00338-5 (2022).
- 2 Borst, J., Ahrends, T., Babala, N., Melief, C. J. M. & Kastenmuller, W. CD4(+) T cell help in cancer immunology and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* **18**, 635-647, doi:10.1038/s41577-018-0044-0 (2018).
- 3 Christophersen, A. *et al.* Distinct phenotype of CD4(+) T cells driving celiac disease identified in multiple autoimmune conditions. *Nature medicine* **25**, 734-737, doi:10.1038/s41591-019-0403-9 (2019).

- 4 Zhu, J. & Paul, W. E. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell research* **20**, 4-12, doi:10.1038/cr.2009.138 (2010).
- 5 Codarri, L. *et al.* ROR γ drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol* **12**, 560-567, doi:10.1038/ni.2027 (2011).
- 6 Croxford, A. L. *et al.* The Cytokine GM-CSF Drives the Inflammatory Signature of CCR2⁺ Monocytes and Licenses Autoimmunity. *Immunity* **43**, 502-514, doi:10.1016/j.immuni.2015.08.010 (2015).
- 7 Shah, K., Al-Haidari, A., Sun, J. & Kazi, J. U. T cell receptor (TCR) signaling in health and disease. *Signal Transduct Target Ther* **6**, 412, doi:10.1038/s41392-021-00823-w (2021).
- 8 Oeckinghaus, A., Hayden, M. S. & Ghosh, S. Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways. *Nat Immunol* **12**, 695-708, doi:10.1038/ni.2065 (2011).
- 9 Voisin, A. & Grinberg-Bleyer, Y. The many-sided contributions of NF-kappaB to T-cell biology in health and disease. *Int Rev Cell Mol Biol* **361**, 245-300, doi:10.1016/bs.ircmb.2020.10.006 (2021).
- 10 Gerondakis, S., Fulford, T. S., Messina, N. L. & Grumont, R. J. NF- κ B control of T cell development. *Nature Immunology* **15**, 15-25, doi:10.1038/ni.2785 (2014).
- 11 Mc Guire, C., Prinz, M., Beyaert, R. & van Loo, G. Nuclear factor kappa B (NF-kappaB) in multiple sclerosis pathology. *Trends Mol Med* **19**, 604-613, doi:10.1016/j.molmed.2013.08.001 (2013).
- 12 Yan, J. *et al.* Increased constitutive activation of NF-kappaB p65 (RelA) in peripheral blood cells of patients with progressive multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* **320**, 111-116, doi:10.1016/j.jneuroim.2018.04.002 (2018).
- 13 Satoh, J., Misawa, T., Tabunoki, H. & Yamamura, T. Molecular network analysis of T-cell transcriptome suggests aberrant regulation of gene expression by NF-kappaB as a biomarker for relapse of multiple sclerosis. *Disease markers* **25**, 27-35, doi:10.1155/2008/824640 (2008).
- 14 Greve, B. *et al.* I kappa B kinase 2/beta deficiency controls expansion of autoreactive T cells and suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **179**, 179-185, doi:10.4049/jimmunol.179.1.179 (2007).
- 15 Li, X. *et al.* T cells from renal cell carcinoma patients exhibit an abnormal pattern of kappa B-specific DNA-binding activity: a preliminary report. *Cancer research* **54**, 5424-5429 (1994).
- 16 Clavijo, P. E. & Frauwirth, K. A. Anergic CD8⁺ T Lymphocytes Have Impaired NF- κ B Activation with Defects in p65 Phosphorylation and Acetylation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **188**, 1213-1221, doi:10.4049/jimmunol.1100793 (2012).
- 17 Barnes, S. E. *et al.* T cell-NF-kappaB activation is required for tumor control in vivo. *Journal for immunotherapy of cancer* **3**, 1, doi:10.1186/s40425-014-0045-x (2015).
- 18 Kamphorst, A. O. *et al.* Rescue of exhausted CD8 T cells by PD-1-targeted therapies is CD28-dependent. *Science* **355**, 1423-1427, doi:10.1126/science.aaf0683 (2017).
- 19 Grasso, C. S. *et al.* Conserved Interferon-gamma Signaling Drives Clinical Response to Immune Checkpoint Blockade Therapy in Melanoma. *Cancer cell* **39**, 122, doi:10.1016/j.ccell.2020.11.015 (2021).
- 20 Beg, A. A., Sha, W. C., Bronson, R. T., Ghosh, S. & Baltimore, D. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature* **376**, 167-170, doi:10.1038/376167a0 (1995).
- 21 Weih, F. *et al.* Multiorgan inflammation and hematopoietic abnormalities in mice with a targeted disruption of RelB, a member of the NF-kappa B/Rel family. *Cell* **80**, 331-340 (1995).
- 22 Lalle, G. *et al.* A T cell-intrinsic function for NF-kappaB RelB in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Scientific reports* **11**, 19674, doi:10.1038/s41598-021-99134-x (2021).
- 23 Hilliard, B. A. *et al.* Critical roles of c-Rel in autoimmune inflammation and helper T cell differentiation. *The Journal of clinical investigation* **110**, 843-850, doi:10.1172/JCI15254 (2002).
- 24 Ruan, Q. *et al.* The Th17 immune response is controlled by the Rel-ROR γ -ROR γ T transcriptional axis. *The Journal of experimental medicine* **208**, 2321-2333, doi:10.1084/jem.20110462 (2011).

- 25 Beaussant-Cohen, S. *et al.* Combined immunodeficiency in a patient with c-Rel deficiency. *The Journal of allergy and clinical immunology* **144**, 606-608.e604, doi:10.1016/j.jaci.2019.05.003 (2019).
- 26 Levy, R. *et al.* Inherited human c-Rel deficiency disrupts myeloid and lymphoid immunity to multiple infectious agents. *The Journal of clinical investigation* **131**, doi:10.1172/JCI150143 (2021).
- 27 Chen, G. *et al.* The NF- κ B Transcription Factor c-Rel Is Required for Th17 Effector Cell Development in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Immunology* **187**, 4483-4491, doi:10.4049/jimmunol.1101757 (2011).
- 28 Barnes, S. E. *et al.* T cell-NF- κ B activation is required for tumor control in vivo. *Journal for immunotherapy of cancer* **3**, 1, doi:10.1186/s40425-014-0045-x (2015).
- 29 Grinberg-Bleyer, Y. *et al.* NF- κ B c-Rel Is Crucial for the Regulatory T Cell Immune Checkpoint in Cancer. *Cell* **170**, 1096-1108.e1013, doi:10.1016/j.cell.2017.08.004 (2017).
- 30 Oh, H. *et al.* An NF- κ B Transcription-Factor-Dependent Lineage-Specific Transcriptional Program Promotes Regulatory T Cell Identity and Function. *Immunity* **47**, 450-465.e455, doi:10.1016/j.immuni.2017.08.010 (2017).
- 31 Grinberg-Bleyer, Y. *et al.* The Alternative NF- κ B Pathway in Regulatory T Cell Homeostasis and Suppressive Function. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **200**, 2362-2371, doi:10.4049/jimmunol.1800042 (2018).
- 32 Heise, N. *et al.* Germinal center B cell maintenance and differentiation are controlled by distinct NF- κ B transcription factor subunits. *The Journal of experimental medicine* **211**, 2103-2118, doi:10.1084/jem.20132613 (2014).
- 33 Webb, L. V. *et al.* Survival of Single Positive Thymocytes Depends upon Developmental Control of RIPK1 Kinase Signaling by the IKK Complex Independent of NF- κ B. *Immunity* **50**, 348-361.e344, doi:10.1016/j.immuni.2019.01.004 (2019).
- 34 Betz, B. C. *et al.* Batf coordinates multiple aspects of B and T cell function required for normal antibody responses. *The Journal of experimental medicine* **207**, 933-942, doi:10.1084/jem.20091548 (2010).
- 35 Seo, H. *et al.* BATF and IRF4 cooperate to counter exhaustion in tumor-infiltrating CAR T cells. *Nat Immunol* **22**, 983-995, doi:10.1038/s41590-021-00964-8 (2021).
- 36 Balasubramani, A. *et al.* Modular Utilization of Distal cis-Regulatory Elements Controls Ifng Gene Expression in T Cells Activated by Distinct Stimuli. *Immunity* **33**, 35-47, doi:10.1016/j.immuni.2010.07.004 (2010).
- 37 Henriksson, J. *et al.* Genome-wide CRISPR Screens in T Helper Cells Reveal Pervasive Crosstalk between Activation and Differentiation. *Cell* **176**, 882-896.e818, doi:10.1016/j.cell.2018.11.044 (2019).
- 38 Lee, Y. K., Menezes, J. S., Umesaki, Y. & Mazmanian, S. K. 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, doi:10.1073/pnas.1000082107 (2011).
- 39 Andreatta, M. *et al.* Interpretation of T cell states from single-cell transcriptomics data using reference atlases. *Nature communications* **12**, 2965, doi:10.1038/s41467-021-23324-4 (2021).
- 40 Shifrut, E. *et al.* Genome-wide CRISPR Screens in Primary Human T Cells Reveal Key Regulators of Immune Function. *Cell* **175**, 1958-1971.e1915, doi:10.1016/j.cell.2018.10.024 (2018).
- 41 Schmidt, R. *et al.* CRISPR activation and interference screens decode stimulation responses in primary human T cells. *Science* **375**, eabj4008, doi:10.1126/science.abj4008 (2022).
- 42 Zhang, H. *et al.* Silencing c-Rel in macrophages dampens Th1 and Th17 immune responses and alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Immunology and cell biology* **95**, 593-600, doi:10.1038/icb.2017.11 (2017).
- 43 Zhao, B. *et al.* The NF- κ B genomic landscape in lymphoblastoid B cells. *Cell reports* **8**, 1595-1606, doi:10.1016/j.celrep.2014.07.037 (2014).

- 44 de Oliveira, K. A. *et al.* A roadmap of constitutive NF-kappaB activity in Hodgkin lymphoma: Dominant roles of p50 and p52 revealed by genome-wide analyses. *Genome Med* **8**, 28, doi:10.1186/s13073-016-0280-5 (2016).
- 45 Wong, D. *et al.* Extensive characterization of NF-kappaB binding uncovers non-canonical motifs and advances the interpretation of genetic functional traits. *Genome Biol* **12**, R70, doi:10.1186/gb-2011-12-7-r70 (2011).
- 46 Adelaja, A. *et al.* Six distinct NFkappaB signaling codons convey discrete information to distinguish stimuli and enable appropriate macrophage responses. *Immunity* **54**, 916-930 e917, doi:10.1016/j.immuni.2021.04.011 (2021).
- 47 Cheng, Q. J. *et al.* NF-kappaB dynamics determine the stimulus specificity of epigenomic reprogramming in macrophages. *Science* **372**, 1349-1353, doi:10.1126/science.abc0269 (2021).
- 48 Brignall, R., Moody, A. T., Mathew, S. & Gaudet, S. Considering Abundance, Affinity, and Binding Site Availability in the NF-kappaB Target Selection Puzzle. *Front Immunol* **10**, 609, doi:10.3389/fimmu.2019.00609 (2019).
- 49 Gilmore, T. D. & Herscovitch, M. Inhibitors of NF-kappaB signaling: 785 and counting. *Oncogene* **25**, 6887-6899, doi:10.1038/sj.onc.1209982 (2006).
- 50 Lalle, G., Twardowski, J. & Grinberg-Bleyer, Y. NF-kappaB in Cancer Immunity: Friend or Foe? *Cells* **10**, doi:10.3390/cells10020355 (2021).
- 51 Baud, V. & Karin, M. Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nature reviews. Drug discovery* **8**, 33-40, doi:10.1038/nrd2781 (2009).
- 52 Yan, H. *et al.* Suppression of NF-kappaB activity via nanoparticle-based siRNA delivery alters early cartilage responses to injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**, E6199-E6208, doi:10.1073/pnas.1608245113 (2016).
- 53 Li, T. *et al.* c-Rel is a myeloid checkpoint for cancer immunotherapy. *Nature Cancer* **1**, 507–517, doi:<https://doi.org/10.1038/s43018-020-0061-3> (2020).
- 54 Evaristo, C. *et al.* Cutting Edge: Engineering Active IKK β in T Cells Drives Tumor Rejection. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **196**, 2933-2938, doi:10.4049/jimmunol.1501144 (2016).
- 55 Giordano, M. *et al.* The tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 (TNFAIP3, A20) imposes a brake on antitumor activity of CD8 T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 11115-11120, doi:10.1073/pnas.1406259111 (2014).
- 56 Legut, M. *et al.* A genome-scale screen for synthetic drivers of T cell proliferation. *Nature* **603**, 728-735, doi:10.1038/s41586-022-04494-7 (2022).

Discussion

Les voies de signalisation conduisant à l'activation de NF- κ B sont impliquées dans de très nombreux processus biologiques comme la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire mais aussi bien sûr, dans l'inflammation et l'immunité. Cette signalisation complexe fait intervenir de nombreux acteurs moléculaires différents dont certains sont ubiquitairement exprimés, et la translocation des différents dimères conduit à l'induction ou la répression de milliers de gènes.

Afin d'essayer d'obtenir une vue d'ensemble des multiples fonctions de la voie NF- κ B dans la régulation des LT et dans l'immunité anti-tumorale, j'ai notamment rédigé une revue de synthèse de la littérature. Toutefois, malgré l'existence de milliers d'articles scientifiques, la diversité de ses fonctions et la complexité de sa régulation ne sont toujours pas entièrement comprises. Notamment, le rôle spécifique de chacune des cinq sous-unités qui composent la famille NF- κ B est méconnu dans la fonction des LT car la plupart des études sur les rôles des voies canoniques et alternatives de NF- κ B ont été faites en modulant des protéines activatrices ou inhibitrices en amont. Par conséquent, nous ne savons pas si au sein d'une même voie (canonique ou alternative), les différentes sous-unités ont des rôles redondants, synergiques ou potentiellement divergents.

Mes travaux sur la régulation des Tconv par RelA, c-Rel et RelB, les trois membres de NF- κ B possédant un TAD, apportent des informations nouvelles à cet immense domaine de recherche. Les données obtenues montrent que ces trois membres de la famille NF- κ B ont des fonctions distinctes dans les Tconv en fonction du contexte inflammatoire de la maladie. C'est particulièrement intéressant pour RelA et c-Rel qui appartiennent tous les deux à la voie canonique de NF- κ B et sont structurellement très proches l'un de l'autre. Ceci permet de revisiter le paradigme considérant NF- κ B comme une entité unique avec de nombreux rôles, à une famille de protéines avec chacune, un ensemble restreint de fonctions.

Dans la discussion qui suit, je vais chercher à confronter mes résultats à la littérature existante pour dresser le bilan de ce qui est connu, pointer des pistes de recherche à explorer et envisager des stratégies thérapeutiques dans le cancer et la SEP via la modulation de l'activité de NF- κ B.

1. RelA contrôle l'activation des Tconv en contexte non pathologique

Les souris avec une délétion germinale de *Rela* meurent à l'état embryonnaire tandis que celles qui ont une ablation de *Relb* meurent environ six semaines après la naissance(75,87). Ces données montrent l'importance de ces sous-unités et sont confirmées par la rareté pour *RELB* et l'absence pour *RELA*, de patients présentant des mutations faux sense ou non sense homozygotes. Les patients *RELB* présentent des immunodéficiences combinées sévères et divers syndromes auto immuns(63).

Il a été montré que ces phénotypes sont extrinsèques aux lymphocytes T. En l'absence de RelA, l'axe TNF- α /TNFRI induit l'apoptose des hépatocytes et par conséquent la mort des souris à l'état embryonnaire(75,78). La déficience de RelB dans les mTEC induit quant à elle un défaut d'expression du facteur de transcription AIRE et donc de la sélection négative des lymphocytes T auto réactifs. En conséquence, les souris *Relb*-KO meurent d'auto-immunité(529,530). Les souris *Rel*-KO elles, ne développent pas spontanément de maladie mais présentent de profonds défauts de la fonctionnalité des LT. Cependant, ce modèle ne permet pas d'étudier les fonctions intrinsèques aux LT (et encore moins aux Tconv) de c-Rel. Ainsi, pour interroger les fonctions de RelA, c-Rel et RelB dans les Tconv, nous avons choisi d'utiliser des souris avec des délétions conditionnelles de *Rela*, *Rel* ou *Relb* dans les LT. A l'état basal, ces souris ne présentent pas de phénotype particulier, n'ont pas de défauts de développement des LT dans le thymus et une organisation normale des LT dans les organes lymphoïdes secondaires(10). Nous confirmons néanmoins une baisse des Treg dans le thymus, la rate et les ganglions des souris *Rela*- et *Rel*-cKO, comme il a été observé dans de précédentes études(10,35). En utilisant un modèle de chimère de moelle osseuse mixte, nous avons pu directement interroger le rôle intrinsèque de RelA et c-Rel dans les Tconv. Au niveau du transcriptome, RelA induit la transcription de plus de 800 gènes et en réprime une centaine. Parmi les gènes régulés négativement par la délétion de RelA figurent de nombreux marqueurs d'activation, cytokines et chimiokines. Cela montre l'implication de ce facteur de transcription dans la fonction des Tconv. A l'inverse, la délétion de *Rel* impacte beaucoup moins le transcriptome des cellules avec en tout 199 gènes dont l'expression est statistiquement altérée. Parmi eux, seulement 16 sont spécifiques des cellules *Rel*-cKO ce qui montre une convergence dans la fonction des deux sous-unités. Il est probable que certains gènes soient activés

indifféremment par RelA ou c-Rel en fonction de la disponibilité des sous-unités. Afin d'étudier ce phénomène de redondance, il serait intéressant de créer des souris doublement déficientes pour RelA et c-Rel. Nous avons ensuite montré que RelA contrôle l'expression de ces gènes cibles de deux manières.

(i) Certains promoteurs sont directement liés par le facteur de transcription. C'est le cas par exemple des cytokines inflammatoires IL-2, IFN γ et TNF- α .

(ii) RelA induit aussi directement la transcription d'autres facteurs de transcription comme Batf et Jun qui vont à leur tour moduler l'expression d'autres gènes, ce sont des cibles indirectes de RelA.

Il est connu que parmi les premières cibles de NF- κ B se trouvent des régulateurs négatifs de la voie(37). Nos analyses de ChiPseq montrent en effet un contrôle direct de *Tnfaip3* et *Nfkbia* qui codent pour A20 et I κ B α . Il est à noter que *Nfkb1*, *Nfkb2* et *Relb* sont aussi sous le contrôle de RelA ce qui complique fortement la compréhension de la fonction de RelA. A l'inverse, c-Rel lui ne semble pratiquement pas impliqué dans l'expression des protéines de la voie NF- κ B. Nos analyses fonctionnelles ont mis en évidence un défaut de compétition des LT et des Tconv déficients pour RelA mais pas pour c-Rel. Par contre, l'activation, la prolifération des Tconv et l'expression de cytokines inflammatoires sont sous le contrôle des deux sous-unités, avec toutefois un effet supérieur de RelA. Ces données concordent avec des études faites sur des modèles KO de PKC θ , Bcl10, et MALT1(99,100) (Pour Ki67 et l'IL-2, la tendance à la baisse n'est pas significative dans les KO de *Rel*). Ces résultats sont surprenants car les différences entre les Tconv *Rela*- et *Rel*-KO semblent bien faibles en comparaison de ce que nous avons observé au niveau du transcriptome. Afin d'analyser l'expression des cytokines inflammatoire par cytométrie de flux, nous restimulons les cellules avec de la PMA/ionomycine or ces stimulateurs activent toutes les voies en dessous du TCR de manière aberrante. Par conséquent il est possible que nous outrepassions le besoin de RelA et/ou c-Rel en suractivant d'autres voies de transcription.

Chez l'homme, nous observons aussi un contrôle fort du transcriptome par RelA et une diminution de l'expression du TNF- α et de l'IL-2. A l'inverse, le transcriptome des cellules Rel-KO est à peine modulé. Malgré tout, les cellules présentent un défaut de prolifération et d'expression du TNF- α . Surprenamment il n'y a ni défaut de l'IFN γ ni de l'IL-2 or les LT issus de souris et de patients Rel^{-/-} n'expriment pas du tout ces cytokines(60,62,84) et il a été montré que c-Rel peut se lier au promoteur de l'IL-2 (171,172). Cette discordance peut être expliquée par le fait que dans les souris et les patients Rel^{-/-}, les défauts d'expression d'IL-2 et d'IFN γ sont potentiellement extrinsèque aux

lymphocytes T. Il est aussi possible que le problème vienne de notre protocole expérimental. En effet, il est indispensable de stimuler les Tconv avant d'induire la délétion des gènes par CRISPR. Par conséquent les cellules ne sont pas naïves et il est possible que nous manquions certains effets de la délétion des deux sous-unités. Cette hypothèse méritera d'être explorée plus en détails car elle soulève la question d'un impact différentiel de RelA et c-Rel à l'état naïf versus effecteur. Le défaut de prolifération des Tconv Rel-KO avait déjà été observé mais attribué à un défaut d'IL-2(60). Ce n'est pas le cas dans nos analyses.

Au vu des résultats de RNAseq dans lequel l'expression des cytokines associés à plusieurs profils de Thelper étaient baissés dans les Tconv *Rel-* et *Rela-cKO*, nous avons conduit des expériences de polarisation *in vitro*.

Encore une fois, nos résultats démontrent clairement un rôle différent de RelA et c-Rel. Nous avons observé que RelA mais pas c-Rel contrôle l'expression de l'IFN γ dans les Th1 indépendamment de T-bet. Etant donné que dans nos analyses ChIP-seq RelA peut se lier au promoteur de l'*Ifng*, ce contrôle semble direct, ce qui corrobore certaines données de la littérature(114). Dans la différenciation Th2, RelA et c-Rel sont tous deux nécessaires pour une sécrétion optimale d'IL-4 ; néanmoins, l'expression de GATA-3 était légèrement diminuée - mais pas de manière significative - uniquement dans les cellules *Rela-cKO*. Ce résultat est conforme à un rapport récent(184) et est associé à la liaison directe de RelA à une région intronique du locus *Gata3* dans notre analyse de ChIP-seq.

Enfin, nous avons détecté une contribution sélective de RelA dans la différenciation des cellules Th17. En effet, les proportions de cellules ROR γ ⁺ et IL-17A⁺ ont été diminuées en l'absence de RelA dans des conditions de culture 'classiques' (TGF β +IL-6), alors que les cellules déficientes en Rel ont montré une différenciation inchangée. Ce phénotype intrigant a été confirmé dans des conditions de culture " pathogènes " (TGF β +IL-6+IL1b+IL-23+anti-IL-2). Mécaniquement, RelA pouvait se lier directement au locus *Rorc*, même dans des conditions "Th0", mais pas au locus Il17a.

Ainsi, bien que la majorité de nos résultats confirment les données de la littérature, une conclusion nouvelle et surprenante peut-être tirée : RelA, et non pas c-Rel, est indispensable à la différenciation Th17 *in vitro*. Etant donné que pour le rôle de c-Rel, des résultats à la fois similaires et contradictoires existent dans la littérature(60,167,168,204), nous avons cherché à tester différents protocoles de polarisation Th17 et notamment différentes stimulations. Nous avons pu observer

qu'en conditions Th17 « pathogéniques » lorsque les cellules sont stimulées avec des anticorps agonistes de CD3 et CD28 coâtés au fond de la plaque (plutôt qu'en utilisant des feeders + de l'anti-CD3 soluble) (Figure 7) nous observons une diminution (pas encore statistiques mais l'expérience va être répétée) de l'IL-17a dans les deux génotypes mais une baisse de ROR γ t uniquement dans les *Rel*-cKO. Cette observation contradictoire avec nos résultats dans les Th17 est surprenante. Il est connu que la force du signal TCR peut influencer sur la polarisation des Tconv. Notamment il a été montré qu'en présence d'IL-2 et de TGF- β , une forte stimulation du TCR induit des Th17 tandis qu'une faible stimulation du TCR induit la polarisation en Treg. Les auteurs ont d'ailleurs démontré dans cette étude que l'inhibition des Treg était dépendante de la voie canonique de NF- κ B(535). Par conséquent il est possible que nos résultats reflètent ce phénomène ce qui suggère que c-Rel et RelA servent de senseurs à la force du signal TCR. Il serait intéressant de reconduire ces expériences mais en faisant varier les quantités d'anticorps agonistes et de feeder.

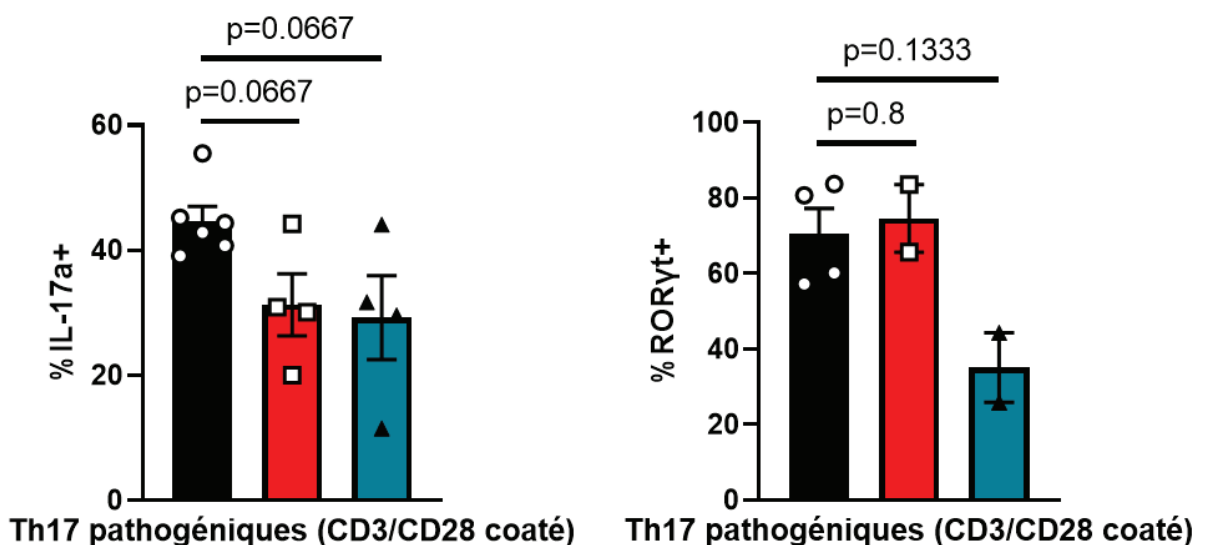


Figure 8 : Polarisation Th17 des Tconv naïfs control vs *RelA*-cKO vs *Rel*-cKO avec une stimulation alternative.

En parallèle, nos résultats montrent certains rôles des sous-unités de NF- κ B (principalement de RelA dans la plupart des conditions testées) dans la polarisation des Tconv, mais nous ne savons pas si ce rôle se joue dans la polarisation ou dans le maintien des différents profils Th. Pour élucider ce mécanisme, nous allons cultiver des CD4 naïfs *RelA*^{fl/fl} en conditions Th1-/2/7 et les traiter avec de la tat-cre quelques jours avant ou après l'ajout du mix cytokinique de polarisation. Nous pouvons

aussi faire cette expérience chez l'homme en faisant un CRISPR-KO de *RELA* dans des Tconv déjà polarisés ou dans des CD4 naïfs que nous polariserons après l'étape de CRISPR.

En opposition à ces rôles majeurs de RelA, RelB n'apparaît pas nécessaire à la polarisation des Tconv en Th1/2/17/iTreg. Ainsi les défauts de polarisation en Th1 observés dans des souris porteuses d'une délétion germinale de Relb(161), semblent extrinsèques aux Tconv. En effet, en polarisant des Tconv issus de souris *Relb*-cKO en Th1, nous ne voyons aucun défaut d'expression de T-bet ni de l'IFN γ . Nous ne voyons pas non plus d'effet de la délétion de RelB sur la polarisation Th2. De fait, RelB n'a pas été identifié comme un régulateur des Th2 murins dans une étude de CRISPR-screen(184). Par contre NF- κ B2 contrôle l'expression de l'IL-4.

Le rôle de la voie alternative de NF- κ B dans le contrôle des Th17 est largement débattu, probablement du fait des différents modèles murins utilisés.

Nos données montrent que la polarisation Th17 est la même en présence ou en l'absence de RelB. Une autre étude avec un modèle de souris Lck-cre *Relb*^{fllox/fllox} confirme nos résultats(205). A l'inverse, il a été montré que l'activation de RelB via une stimulation de OX-40, réduit la différentiation en Th17(208). Par conséquent il est possible que la suractivation de RelB puisse en effet augmenter sa fixation au locus de l'IL-17a et réprimer sa transcription, mais à l'état basal, son absence n'a pas d'impact sur la polarisation Th17 *in vitro*.

Par la suite, nous avons voulu évaluer les fonctions des différentes sous-unités de NF- κ B dans différents contextes pathogéniques, l'auto immunité et la réponse anti tumorale.

2. RelB et RelA sont nécessaires à la fonction pathogénique des Tconv dans l'EAE

Nos données démontrent que RelA et RelB contrôlent la pathogénicité des Tconv dans le SNC d'animaux EAE. En particulier, l'ablation de RelA prévient totalement les symptômes cliniques de l'EAE. Dans les deux cas, une diminution de l'accumulation des Tconv est observée dans le cerveau et la moelle épinière. Cette diminution n'est pas attribuable à la prolifération des cellules car l'expression du marqueur Ki67 est inchangée. Par conséquent ce défaut est soit dû à un

problème de survie soit à un défaut de trafic des Tconv depuis les dLN jusqu'au CNS. Pour répondre formellement à ces questions, nous pourrions analyser l'expression de marqueurs apoptotiques d'une part et l'expression des récepteurs à chimiokines, notamment CCR6 qui est requis pour le trafic initial des Tconv dans le CNS en réponse à son ligand CCL20 produit par les cellules épithéliales des plexus choroïdes(536). Grâce un modèle de délétion inductible de RelA dans les CD4, nous avons montré que cette protéine est requise dans les phases précoces de la maladie. Cette observation soutient aussi l'hypothèse d'un défaut de recrutement des cellules dans le SNC. Nous sommes en train d'analyser plus en détail nos données de sc-RNAseq pour étudier l'expression des récepteurs à chimiokines dans les Tconv.

En plus de ce défaut d'accumulation, les Tconv *Relb*-cKO et *Rela*-cKO du SNC expriment très faiblement le GM-CSF qui est la cytokine pathogénique de l'EAE(499,502). Ce défaut repose probablement sur deux mécanismes moléculaires distincts :

Dans les souris *Rela*-cKO, cette baisse du GM-CSF est accompagnée d'une altération du profil Th17 (ROR γ t, IL-17A). Cette observation est très importante car l'expression du GM-CSF est sous le contrôle de ROR γ t(499). D'autre part, il a déjà été montré que RelA peut se lier au promoteur de *Rorc* (168), observation que nous confirmons dans nos données de ChIP-seq. Par conséquent, le contrôle du GM-CSF par RelA est soit direct, soit indirect via le contrôle de ROR γ t, soit les deux à la fois. Par contre, comme la délétion de RelB ne modifie pas l'expression de ROR γ t, cela laisse supposer un contrôle direct de la transcription de *Csf2*. Cette hypothèse est challengée par une première étude qui a montré que RelB ne peut pas se lier au promoteur de *Csf2* dans des CD4 murins, à l'inverse de p52 et c-Rel. Ce résultat est cependant à prendre avec précaution car dans cette étude, les auteurs concluaient que RelB n'avait de rôle intrinsèque au lymphocytes dans la pathogénicité de l'EAE(207). De plus, une autre étude dans des lignées humaines a montré que RelA et RelB peuvent se lier au promoteur de *Csf2* indépendamment l'un de l'autre et induire son expression de manière complémentaire(537). Pour réellement conclure quant au mécanisme de régulation du GM-CSF par RelA et RelB, il faudrait isoler des Tconv du CNS de souris EAE pour faire des ChIP des deux protéines sur les promoteurs de *Csf2* et de *Rorc*. Il serait aussi intéressant de faire une expérience de "sauvetage" en surexprimant ROR γ t dans des Tconv *RelA*-cKO pour voir si cela restaure la pathogénicité des cellules. En plus du GM-CSF, il a été observé que les Tconv infiltrant le CNS expriment les Gzm-A, -B, -K, ce qui peut suggérer que ces cellules, en plus d'activer les cellules myéloïdes et d'induire une neuroinflammation, pourraient

directement tuer les neurones(538). Il pourrait être intéressant d'étudier l'expression de ces protéases dans les souris *Rela-* et *Relb*-cKO.

A l'inverse de RelA et RelB, c-Rel n'est absolument pas requis pour la pathogénicité des Tconv dans l'EAE. Cette donnée est surprenante car il a été montré que c-Rel peut induire directement la transcription de *Rorc* et de *Csf2*(168,207).

Nos résultats démontrent que les mécanismes permettant de protéger les souris *Rel^{-/-}* de l'EAE(84) sont indépendants des LT. Néanmoins, ces données ont été obtenues dans des conditions SOPF or nous avons préalablement observé que les souris logées dans une installation SPF étaient largement résistantes à la maladie. Ces résultats suggèrent que c-Rel joue un rôle dépendant du microbiote dans la différenciation pathogène des Th17, ce qui est conforme au rôle critique des bactéries intestinales dans la pathogenèse de l'EAE(539).

Nous souhaitons maintenant valider ces données chez l'homme, et sommes en train de monter une collaboration pour obtenir des prélèvements de LCR de patients atteints de SEP. L'idée du projet sera d'analyser l'activation de RelA et RelB dans les Tconv. Nous souhaitons aussi analyser l'activation de c-Rel pour le valider comme un contrôle.

En plus de l'EAE, nous avons étudié le rôle de RelB dans un modèle inflammatoire de colite. Dans ce contexte, RelB n'avait pas d'effet sur la pathogénicité des Tconv, ni sur l'expression du GM-CSF ce qui suggère qu'en fonction du contexte pathologique (inflammatoire/auto immun) et/ou de l'organe, l'activation de RelB est requise ou non. Nous souhaitons, pour compléter ces données, explorer le rôle de RelA et c-Rel dans cette maladie.

3. Les propriétés anti tumorale des Tconv sont contrôlées par c-Rel

Nous avons par la suite exploré les fonctions des sous-unités de NF-κB dans la régulation des Tconv intra tumoraux. Avec différents modèles de tumeurs (adénocarcinome du colon et mélanome) ainsi que différents modèles de délétion, nous avons montré que RelA est dispensable, tandis que la délétion de c-Rel dans les Tconv conduit à une forte augmentation de la pousse

tumorale. Cette observation critique permet non seulement de renforcer le rôle des cellules Tconv dans l'immunité contre le cancer, mais aussi d'explorer un mécanisme moléculaire sélectif qui orchestre leur accumulation et leur fonction dans la tumeur. Toutefois, il est à noter que certaines de nos observations divergent en fonction des modèles de tumeurs, ce qui reflète la complexité de l'étude de cette maladie. Par exemple, il y a une baisse des Tconv infiltrant les tumeurs MC38 mais pas dans les tumeurs B16-OVA (Figure 10).

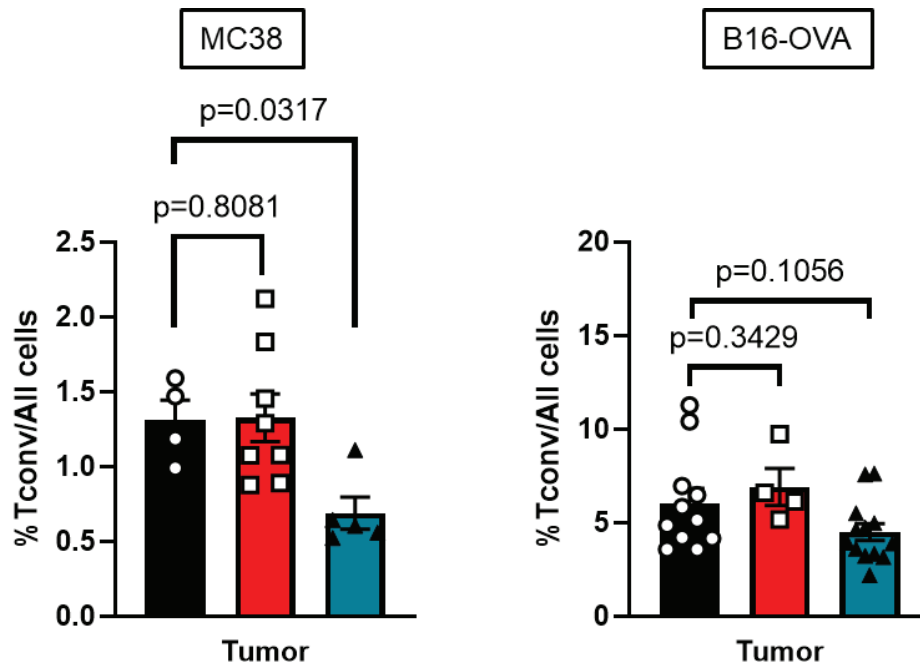


Figure 9 : Proportion de Tconv dans le microenvironnement tumoral. MC38 vs B16-OVA

Cependant, nous observons systématiquement une baisse de l'expression de l'IFN γ par les Tconv. Dans le modèle B16-OVA nous avons aussi observée une baisse des Tconv T-bet⁺ et IFN γ ⁺ T-bet⁺ or il est connu que les cellules avec un profil Th1 sont des acteurs majeurs de l'immunité anti tumorale(323,347,350). De plus, nous avons observé une légère baisse de l'activation des LT CD8⁺ qui sont eux aussi de puissants acteurs anti tumoraux(323), ce qui suggère que c-Rel contrôle aussi des mécanismes du "help".

Afin de mieux comprendre comment c-Rel contrôle l'activation des Tconv dans les ganglions drainants et leur fonctionnalité dans la tumeur, nous avons effectué un sc-RNAseq dans le modèle *Rel-icKO* vs control injecté en sous cutanée avec des tumeurs B16-OVA. Une première analyse sommaire vient juste d'être effectuée. Elle suggère un défaut d'activation des Tconv délétés pour

c-Rel. Nous sommes en train de poursuivre les analyses et j'espère les présenter lors de la soutenance. Afin de compléter ces données, nous souhaitons aussi effectuer un ChIP-seq de c-Rel dans les Tconv. Dans l'idéal il faudrait réaliser cette expérience sur des Tconv infiltrant la tumeur. Cependant, un nombre trop élevé de cellules est requis pour faire un ChIP-seq pour pouvoir étudier des Tconv intra tumoraux. De plus les anticorps actuellement disponibles sur le marché, ne sont pas efficaces pour le ChIP-Seq dans nos mains. Différentes alternatives peuvent être proposées :

-la création d'une souris knock-in exprimant une protéine de fusion Rel-FLAG, permettant l'immunoprécipitation du FLAG avec une excellente efficacité et spécificité. Une preuve de concept a déjà été faite dans un modèle de surexpression de c-Rel(540).

-l'utilisation de protocoles dits de CUT and RUN ou de CUT and TAG, qui n'impliquent pas directement d'immunoprécipitation et donc requièrent beaucoup moins de cellules de départ.

4. La fonction des Tfh est-elle gouvernée par des membres de la famille NF- κ B ?

Les Tfh et TLS sont présents dans plusieurs types de cancers solides humains et sont généralement corrélées à une augmentation des LT infiltrant la tumeur, une meilleure survie des patients et des réponses cliniques à la chimiothérapie et aux immunothérapies(313,385–388).

Chez la souris, un nombre de rapports croissant avance que les TLS intra tumoraux agissent comme des centres locaux où la réponse immunitaire peut être générée. Notamment, les Tconv peut recruter les LB dans la tumeur via CXCL13 et induire la maturation des LB mais aussi la cytotoxicité des LT CD8 via la production d'IL-21(313,390,541). De plus, le développement et l'organisation des TLS intra tumoraux sont renforcés par les anti PD-1/PD-L1 et sont associés à une réduction de la taille des tumeurs(542).

Lors de ma thèse, j'ai cherché à savoir si la différence de pousse tumorale entre les souris contrôles et les souris *Rel-ickO* pouvait être due à une différence de maturation/fonctionnalité des Tfh comme le suggère plusieurs études. En effet, il a été montré chez la souris que c-Rel contrôle l'expression de l'IL-21 en se liant directement à son promoteur(231). Par conséquent, les souris *Rel^{-/-}* ont des défauts de production d'IL-21, de génération de Tfh et des GC qui semblent être en partie

intrinsèques aux Tconv(232). Chez l'homme, les patients avec une mutation de *REL* présentent aussi des défauts d'expression de l'IL-21 et de CD40L(60,62). Ces données semblent indiquer un rôle direct de c-Rel dans la polarisation Tfh et la formation de TLS intra tumoraux qu'il serait intéressant d'étudier. Malheureusement, il n'y a pas de formation de TLS dans les modèles B16-F10 et MC38 transplantés que j'utilise(542). De plus, bien que certaines études rapportent l'observation de Tfh infiltrant des tumeurs MC38(390), dans mes mains, je n'en ai pas observé. Il faudrait donc utiliser un modèle de tumeur *in vivo* dont la réponse est gouvernée par les Tfh et TLS comme un modèle de MC38 orthotopique(543) ou un modèle de cancer du poumon modifié pour exprimer des épitopes B et T(390).

5. c-Rel, un facteur de transcription qui réprime l'épuisement des LT intra tumoraux ?

Comme décrit en introduction, les LT intra tumoraux présentent souvent un profil "épuisé" caractérisé par une perte globale de fonction avec notamment une baisse de la prolifération et de la polyfonctionnalité. Ces cellules épuisées expriment aussi beaucoup de récepteurs immunosuppresseurs à leur surface ainsi qu'une empreinte épigénétique caractéristique. Il a été montré que les LT épuisés sont en réalité un lignage à part avec des progéniteurs, des intermédiaires et des cellules ayant un profil finalement épuisé(544).

L'engagement persistant de l'interaction TCR Ag est un « driver » de l'épuisement. Les membres de la famille NFAT (qui rappelons-le se lient à des séquences similaires aux séquences κB de NF- κB) sont impliqués dans l'épuisement des LT ce qui laisse suggérer une possible implication de NF- κB dans ce lignage. De plus, il a été montré que la surexpression de LT βR dans des LT CD8 boost la sécrétion d'IL-2 et réduit l'épuisement via la voie canonique de NF- κB (121). A l'inverse, une récente analyse dans le cancer du rein, a montré par sc-ATACseq un enrichissement de motifs κB dans les LT épuisés infiltrant la tumeur, suggérant un rôle de NF- κB dans le développement et/ou le maintien de ces cellules(545). Mes résultats montrent que les souris *Rel-icKO* ont une perte des fonctions LT anti tumorales et une baisse de la polyfonctionnalité des LT. Une fois obtenus les résultats du sc-RNA-seq sur des Tconv infiltrant la tumeur, nous analyserons l'expression des

marqueurs d'épuisement pour savoir si c-Rel est impliqué dans le développement ou le maintien de ce lignage.

6. L'activation de c-Rel dans les Tconv intra tumoraux, peut-elle avoir une valeur pronostique dans le cancer ?

Des analyses transcriptomiques sur des échantillons de tumeurs obtenus de patients avant et après l'administration d'anti-CTLA4 et/ou d'anti-PD1 ont clairement démontré que l'augmentation des gènes dépendant de NF- κ B dans les cellules tumorales et immunitaires sous-tend la réponse clinique aux thérapies ICB(439,440). Dans les LT CD8⁺, l'expression de c-Rel par un cluster spécifique de LT cytotoxiques augmenté par ICB, est associée à la réponse à l'anti-PD1(546). En accord avec ces résultats, nos analyses des données transcriptomiques publiques, suggèrent que l'activité de c-Rel est de bon pronostic pour la survie globale des patients atteints de mélanome, et leurs réponses au traitement anti-PD-1. Une des pistes envisagées au sein de l'équipe pour valider ces données serait de récupérer des échantillons tumoraux de patients pour essayer de corrélérer l'activation de c-Rel dans les Tconv à un pronostic de survie ou une réponse aux immunothérapies. La technologie privilégiée serait une quantification de la translocation de c-Rel dans les LT par immunofluorescence multiparamétrique sur des échantillons fixés ; toutefois à ce jour nous n'avons pas identifié d'anticorps suffisamment spécifique pour cette méthode d'analyse.

Afin de savoir si l'activation de NF- κ B en réponse aux thérapies ICB est simplement un signe de l'activation des cellules T ou si elle est réellement nécessaire pour améliorer les réponses anti-tumorales, nous souhaitons désormais tester la réponse des souris *Rel-icKO* porteuses de tumeurs MC38 à l'anti PD-1.

Nous souhaitons aussi tester la réponse de ces souris aux thérapies agonistes de TNFRSF. Ces thérapies, très prometteuses chez la souris(448,449) sont pour l'instant inefficaces chez l'homme(450–453). Il est donc important de comprendre les mécanismes moléculaires induits par l'engagement de ces récepteurs dans les LT intra tumoraux. Etant donné que ces récepteurs

signalent via les deux voies de NF- κ B, il serait intéressant d'étudier le rôle de c-Rel dans la réponse à ces thérapies.

7. Quid du rôle des sous-unités de NF- κ B dans les Tconv lors de la réponse aux infections ?

Lors de cette thèse je n'ai pas étudié l'implication des sous-unités de NF- κ B dans la réponse aux agents infectieux pathogènes par les Tconv. Cet axe de recherche pourrait être intéressant à suivre.

Une caractéristique commune à tous les patients présentant des mutations dysfonctionnelles dans la voie NF- κ B est une forte susceptibilité aux infections. Bien que cette susceptibilité soit potentiellement extrinsèque aux lymphocytes T, certaines de nos données supportent l'hypothèse que l'activation de NF- κ B dans les Tconv soit nécessaire pour lutter contre les diverses infections. Tout d'abord, dans nos analyses "KEGG pathway" de nos RNAseq sur les Tconv *Rela*-KO chez la souris et l'homme, nous avons observé une perturbation des voies moléculaires associées à la réponse à la rougeole, à la grippe et au virus EBV.

Nous avons aussi montré que RelA contrôle la production d'IFN γ par les Th1 ainsi que l'expression de ROR γ t et de l'IL-17a par les Th17. Les Th1 et Th17 sont des populations immunitaires absolument critiques pour lutter contre les infections intracellulaires et extracellulaires respectivement. c-Rel quant à lui apparaît comme nécessaire à la polarisation Th2, population importante dans la lutte contre les parasites extracellulaires comme les helminthes. Bien qu'une étude ait montré que les Tconv de souris *lck-cre Rela^{fl/fl}* infectées par LCMV n'ait pas de défaut de production d'IFN γ (166). A l'inverse, dans le contexte du COVID-19, l'activation chronique de NF- κ B a été associée aux formes sévères de la maladie. Il semble donc judicieux d'explorer plus en détails les fonctions des sous-unités de NF- κ B.

8. La spécificité de fonction entre les différentes sous-unités de NF- κ B apporte une dimension thérapeutique à la modulation de la voie.

Les résultats obtenus pendant ma thèse permettent de mieux comprendre la biologie des LT dans différents contextes pathologiques. Ces découvertes ont de fortes implications thérapeutiques. Etant donné la forte activation de la voie NF- κ B dans de nombreux cancers et différents types de maladies inflammatoires et auto-immunes, de nombreux inhibiteurs de NF- κ B ont été développés, en particulier les inhibiteurs du complexe IKK(534,547). Malheureusement, ces molécules présentent souvent une forte toxicité et la plupart des études cliniques ont été arrêtées(548). Etant donné les rôles divers et variés de la voie NF- κ B dans presque toutes les populations cellulaires, à commencer par ses fonctions de survie et de prolifération, cette toxicité n'est pas surprenante. Par conséquent, la modulation thérapeutique de NF- κ B se doit d'être spécifique d'un type cellulaire donné, mais aussi comme je l'ai montré au cours de cette thèse, spécifique d'une sous-unité.

Si le pouvoir pathogénique de RelA et RelB que nous avons démontré dans l'EAE se confirme dans notre étude sur le LCR de patients, il faudra alors envisager des stratégies pour réduire l'activation de ces deux facteurs de transcription spécifiquement dans les Tconv.

Peu d'inhibiteurs chimiques de RelB et RelA ont été décrits et de surcroît la spécificité de ces molécules est souvent peu fiable. Cependant, il est possible d'envisager des thérapies par siARN pour empêcher la production de ces deux protéines(549). Afin de viser spécifiquement un type cellulaire, les molécules thérapeutiques sont souvent conjuguées à des Ac servant de "missiles téléguidés"(550). Pour les Tconv, cette approche est compliquée par le fait que l'anticorps le plus spécifique serait un anti-CD4 mais qui par conséquent viserait aussi les Treg. RelA étant un régulateur majeur de la fonction des Treg(35), utiliser des siRNA visant RelA et conjugués à des anti-CD4 n'est clairement pas une bonne idée. A l'inverse, RelB n'est pas requis pour la fonction suppressive des Treg(134) et semble donc une cible moins risquée.

Dans le cancer, il a été montré que l'inhibition systémique de c-Rel en utilisant des inhibiteurs chimiques tels que la pentoxifylline ou R96A permettait de limiter la croissance tumorale dans des

modèles murins en ciblant l'activité des cellules Treg et/ou des cellules suppressives dérivées myéloïdes(144,145). Nos résultats actuels suggèrent qu'à l'inverse, activer c-Rel dans les Tconv spécifiquement, permettrait d'augmenter l'immunité anti tumorale. Il a été montré dans des LB de GC que le niveau d'expression de c-Rel corrèle avec son niveau de translocation nucléaire et donc d'activation(540). On pourrait par conséquent imaginer des stratégies thérapeutiques consistant à augmenter l'expression de c-Rel par "gene-editing" lors de transfert adoptif de Tconv anti tumoraux. Comme décrit en introduction, des études chez la souris ont montré qu'activer la canonique de NF- κ B dans des LT CD8⁺ permet d'augmenter leurs fonctions anti tumorale(321,322). De même dans des LT CAR humains modifiés pour surexprimer LT β R, la voie canonique de NF- κ B contrôle la fonctionnalité et les capacités antis tumorales des cellules(121). Toutefois, il a été montré que l'activation constitutive de IKK β dans les LT peut induire leur épuisement voire même leur mort par apoptose(122). Si l'on ajoute le fait que nos analyses sc-RNA-seq semblent indiquer que c-Rel empêche l'épuisement, il peut être plus judicieux de viser spécifiquement c-Rel pour éviter ces effets délétères.

Afin de tester ces hypothèses, nous avons prévu de collaborer avec l'équipe de Marc Schmidt-Supprian et utiliser leur modèle murin de surexpression de c-Rel(540). Ce modèle transgénique floxé permet la surexpression conditionnelle de c-Rel sous le contrôle de la CRE recombinase. Les niveaux d'expression de la protéine sont deux à trois fois plus élevés que ceux à l'état basal. Nous prévoyons de croiser les souris *Rel*^{tg} avec des souris CD4cre puis de trier des Tconv pour des expériences de transfert adoptifs de Tconv antitumoraux (contrôle vs *Rel*^{tg}). Si les résultats sont concluants, on pourrait par exemple imaginer une thérapie par CAR-T cells génétiquement modifiés pour surexprimer c-Rel (Figure 11).

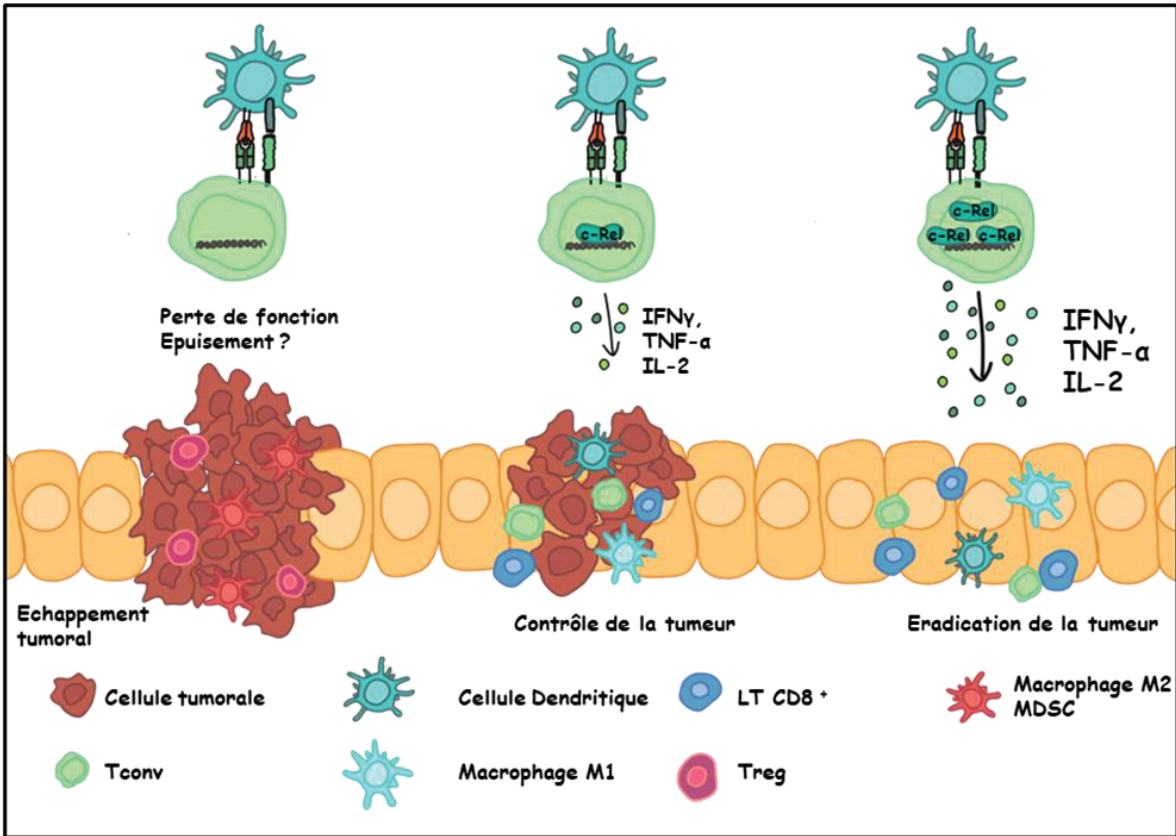


Figure 10: Surexpression de c-Rel dans les Tconv pour lutter contre le cancer.

Nous avons vu que la délétion de c-Rel dans les Tconv induit une augmentation de la pousse tumorale. Par conséquent nous émettons l'hypothèse que la surexpression de c-Rel dans les Tconv permettrait l'éradication des tumeurs en créant un environnement immunitaire hautement anti tumoral.

9. Comment expliquer cette divergence d'activation et de fonction entre RelA et c-Rel ?

En démontrant que RelA contrôle l'activation des Tconv à l'état basal et leur pathogénicité dans un modèle auto-immun tandis que c-Rel lui est requis pour la réponse des Tconv anti tumoraux, nous avons montré une séparation du travail entre ces deux sous-unités de la voie canonique de NF- κ B (Figure 12). Cela confirme notre hypothèse initiale que les voies canoniques et alternatives de NF- κ B ne doivent pas être considérées comme des entités uniques qui contrôlent tout un répertoire de processus biologiques au sein d'une même population mais plutôt comme des familles de facteurs de transcription qui ont chacun des fonctions définies.

Il se pose alors des questions fondamentales pour comprendre le fonctionnement de NF- κ B. Comment deux protéines sœurs comme RelA et c-Rel, partageant une voie d'activation commune et des structures quasiment similaires, peuvent-elles avoir des fonctions si différentes au sein d'un même type cellulaire ? Et comment est médiée cette sélectivité ?

Pour commencer à répondre à cette question, il est important de rappeler que bien que certaines fonctions soient spécifiques à chacune des sous-unités, beaucoup d'autres sont communes. Cette observation a été démontrée par l'analyse de RNA-seq dans lesquels une proportion non négligeable des gènes modulés étaient communs aux Tconv *Rel-* et *Rela-cKO*. De même, à l'état basal chez l'homme et la souris nous avons vu que certaines fonctions étaient régulées par les deux sous-unités. En plus de cela, des études sur des souris double KO ont montré des effets majeurs de la délétion des deux sous-unités à la fois qui ne peuvent être simplement expliqués par le cumul des effets des simples KO. Par exemple, l'utilisation de souris *CD4cre Rel^{flox/flox}Rel^{flox/flox}* et *FoxP3cre Rel^{flox/flox}Rel^{flox/flox}*, a permis de démontrer une certaine redondance des deux sous-unités dans l'homéostasie et la fonctionnalité des Treg(35).

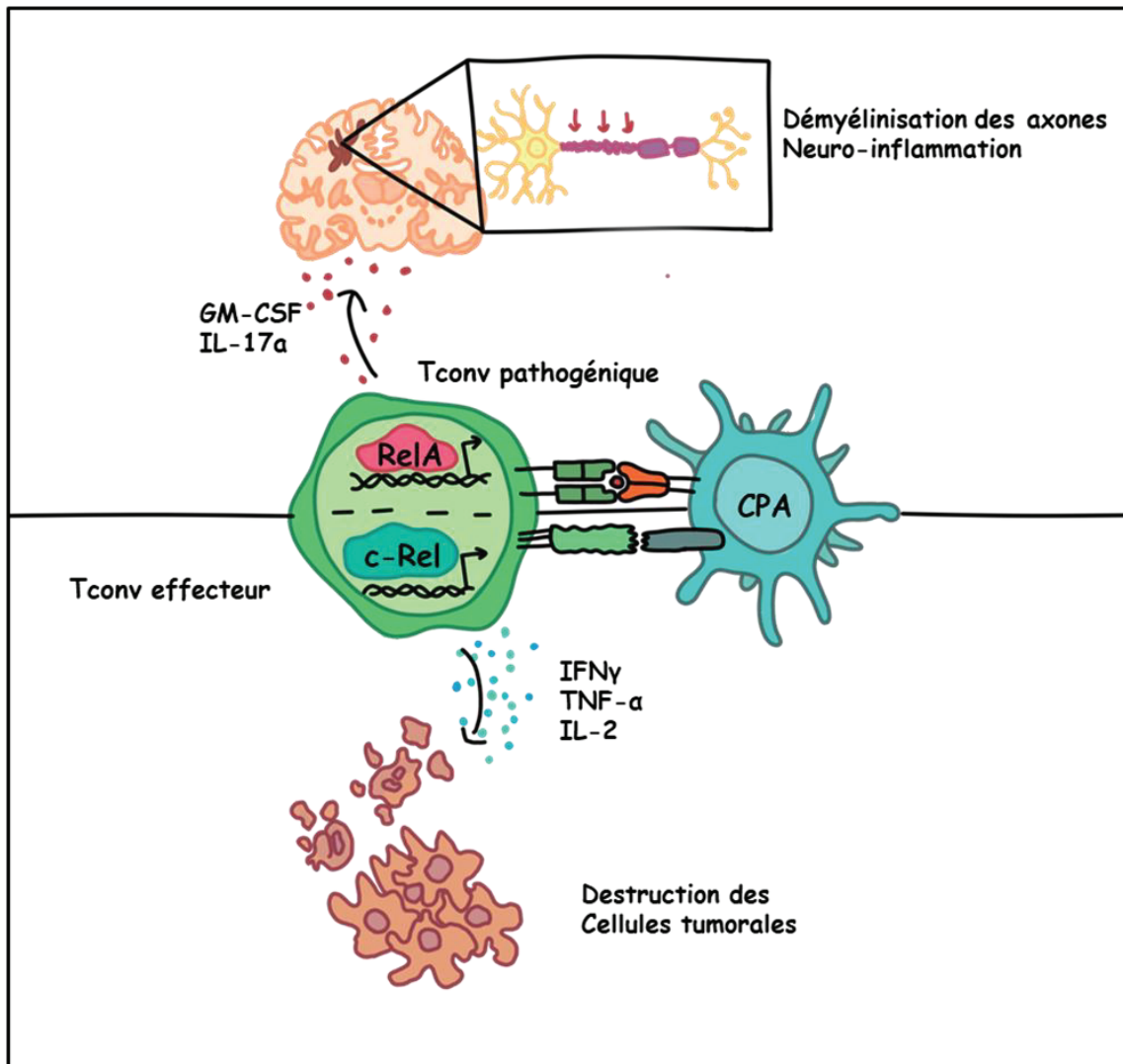


Figure 11: Séparation des tâches entre les sous-unités de NF- κ B.

Nos résultats montrent une séparation des tâches entre RelA et c-Rel en fonction du contexte.

RelA contrôle la pathogénicité des Tconv dans l'EAE. Elle induit un profil Th17 et l'expression du GM-CSF. c-Rel permet le programme anti tumoral des Tconv et notamment l'expression d'IFN γ , de TNF- α et d'IL-2.

En accord avec cette idée de redondance, nous avons observé dans nos cellules Tconv humaines CRISPR *Rela*-KO une augmentation de la protéine c-Rel et inversement une augmentation de RelA dans les Tconv CRISPR *Rel*-KO (Figure 13) ce qui laisse supposer un mécanisme de sauvegarde, possible grâce à la partielle redondance des deux sous-unités. Par contre, chez la souris ce n'est pas le cas : voir(35) Fig Sup 1.

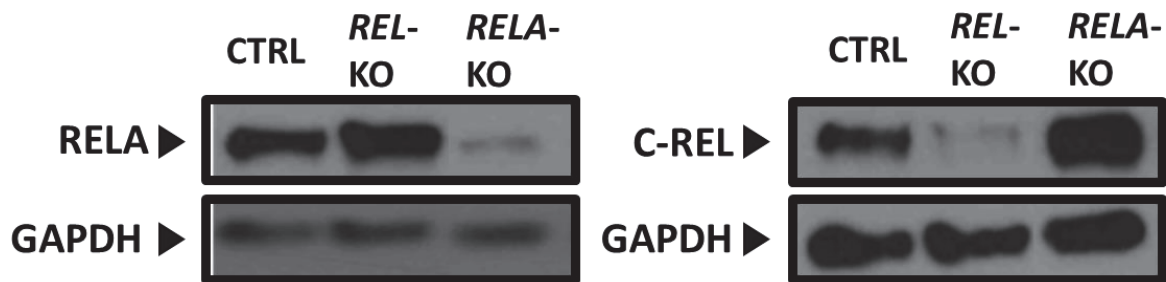


Figure 13 : KO des gènes *REL* ou *RELA* par CRISPR dans des Lymphocytes CD4+ Tconv humains. Vérification de l'efficacité du KO par WB

Maintenant, afin de comprendre comment c-Rel et RelA peuvent avoir des fonctions différentes, il est important de savoir ce qui distingue ces deux protéines. RelA et c-Rel ont des structures biochimiques très similaires, avec chacune un TAD et un RHD contenant une séquence NLS. Cependant, les deux protéines n'ont pas la même taille (RelA contient 551 acides aminés chez l'homme et 549 chez la souris tandis que c-Rel contient 619 acides aminés chez l'homme et 587 chez la souris).

Comme nous l'avons vu en introduction, les séquences ADN κ B présentent un motif très variable (5' GGGRNWYYCC 3' (N—n'importe qu'elle base; R—purine; W—adénine ou thymine; et Y—pyrimidine). Bien que cette séquence soit liée par le RHD et donc commune aux cinq membres de NF- κ B, les motifs consensus de chaque sous-unité présentent quelques variations et spécificités. En lien avec cela, il a été montré dans des lignées que la composition des dimères impact les motifs préférentiels de liaison à l'ADN(551).

Cette spécificité pourrait être probablement expliquée par les différences structurelles entre les différentes sous-unités.

En plus des sites de liaison à l'ADN, la différence de structure entre RelA et c-Rel peut potentiellement entraîner des différences de modifications post-traductionnelles (MPT) entre les deux protéines. Les MPT sont très importantes dans la régulation de la transcription par les dimères NF- κ B. Les phosphorylations des sous-unités de NF- κ B affectent leur liaison aux séquences κ B,

l'abondance des dimères, la stabilité des monomères et des dimères, la translocation nucléaire, l'affinité aux I κ Bs et le recrutement de cofacteurs et de la machinerie transcriptionnelle (Ces éléments sont résumés dans la revue(33). Par exemple, La phosphorylation de RelA en Ser276 lui permet d'interagir avec le complexe CBP/p300 ce qui permet de promouvoir l'accessibilité de la chromatine et donc permet donc l'activité transcriptionnelle de RelA(552–554). Les dimères NF- κ B permettent aussi le recrutement de la machinerie transcriptionnelle. Il a été montré au niveau du promoteur de l'IL-12 que les dimères contenant la sous-unité RelA permettent un meilleur recrutement de la polymérase ARN II que les dimères contenant la sous-unité RelB alors que ces deux sous-unités ont un RHD et un TAD identiques(555).

Au niveau de certains promoteurs se trouvent des ensembles de facteurs et cofacteurs de transcription qui modifient l'architecture locale de la chromatine, recrutent les éléments de la machine transcriptionnelle au promoteur et induisent l'expression des gènes. Ces ensembles sont qualifiés "d'enhanceosomes". L'un des enhanceosomes les mieux décrits est celui de l'IFN- β . Au niveau de son promoteur, les éléments suivants interagissent : AF-2/c-Jun, IRF3, IRF-7, C-REB, HMGA1 et le dimère p50/RelA et conduisent à l'expression du gène(556). De même, un enhanceosome contenant c-Rel et RelA ainsi que des membres de NFAT, SMAD et CREB permet l'expression de FoxP3(131). Plus récemment, la même équipe a proposé que les MDSC sont contrôlés par un enhanceosome dans lequel c-Rel se lie à C/EBP β , RelA, pSTAT3 et p50 qui agirait comme un "détecteur de coïncidence" et permettrait l'expression des gènes cibles de c-Rel uniquement quand tous les facteurs de l'enhanceosome sont liés ensembles(145).

Dans l'ensemble, il est clair que les dimères de NF- κ B ont des capacités différentes à recruter d'autres régulateurs de la transcription et créer différents Hub de transcription/enhanceosomes. Ce recrutement se fait par le biais d'interactions protéine-protéine et protéine-ADN qui sont souvent régulées par des PMT. Les différences structurelles entre c-Rel et RelA peuvent par conséquent produire une grande diversité de modèles d'expression génique dépendant de NF- κ B, spécifiques du contexte et distincts dans le temps.

Afin de tester ce modèle, il faudrait réaliser des expériences de Co-IP associé à de la spectrométrie de masse dans des Tconv. Afin d'obtenir une vision d'ensemble, il faudrait combiner ces données à des analyses ChIP-seq. Il serait intéressant de réaliser ces études dans différents contextes *in vivo* et *in vitro* (Cancer/EAE/polarisation).

Il existe une autre différence majeure entre les deux sous-unités. RelA est exprimé de manière constitutive et ubiquitaire. A l'inverse, c-Rel est exprimé uniquement dans les cellules immunitaires, les tissus cardiaques, les hépatocytes, les kératinocytes et les neurones et son expression n'est pas constitutive. En fait il est connu que l'expression de c-Rel est sous le contrôle de RelA. En plus de c-Rel, RelA est aussi capable de contrôler l'expression des autres sous-unités de NF- κ B, sa propre expression et l'expression de régulateurs négatifs comme *Nfkbia* ou *Tnfaip3*. Nos données de RNA-seq confirment cela chez l'homme et la souris. L'activation de RelA est très rapide probablement du fait de son expression constitutive, et la transcription de régulateurs négatifs permet régulation fine de son activation. A l'inverse, on peut supposer que l'activation de c-Rel suite à l'engagement de la voie canonique de NF- κ B est plus lente mais potentiellement plus durable. A cela on peut ajouter l'hypothèse qu'en fonction du contexte dans lequel se trouve la cellule et donc du type de signaux reçus, se produit une activation/expression différentielle des dimères de NF- κ B. Ainsi le type, la durée et la force de stimulation des récepteurs de surface (TCR, CD28, TNFRSF et autres récepteurs de cytokines) conduirait à la translocation préférentielle et à la liaison à l'ADN de dimères contenant RelA ou c-Rel (ou les deux).

Ce concept de "modules d'activation" est étudié par Alexander Hoffmann et son équipe. Ils ont montré dans des macrophages primaires, que l'activation de RelA et l'expression de gènes cibles dépendent de telles caractéristiques dynamiques(39,557). Dans cette étude, abordée en introduction, la stimulation des macrophages par différents signaux (TNF α , LPS, CpG...) à différentes doses a été corrélée à six "codons de signalisation" : la vitesse d'activation, la durée, l'activité totale, le caractère précoce vs tardif, l'amplitude du pic du signal et enfin le caractère oscillatoire du signal(39). Ces codons permettent de "traduire" l'information de stimulation en réaction cellulaire. Dans cet article, seul RelA était étudié or étant donné la différence de fonction des sous-unités de NF- κ B, la composition des dimères activés peut être vu comme un septième codon. Ainsi il serait intéressant de reproduire cette étude dans les Tconv mais en suivant l'activation des cinq sous-unités de NF- κ B, voir même en cherchant à déterminer la composition des dimères.

En conclusion, lors de ces travaux de thèses, nous avons démontré que c-Rel, RelA et RelB ont des fonctions différentielles dans les Tconv qui dépendent du contexte inflammatoire et ou tissulaire. Ces études démontrent clairement que les voies canoniques et alternatives de NF- κ B ne sont pas des entités uniques avec une grande diversité de fonctions mais plutôt des ensembles de facteurs de transcription avec chacun des rôles spécifiques. Ces travaux ont apporté des résultats

prometteurs d'un point de vue thérapeutique qui, espérons-le, seront un jour utilisés en clinique pour lutter contre la SEP et le cancer.

Annexe

Review

NF- κ B in Cancer Immunity: Friend or Foe?

Guilhem Lalle, Julie Twardowski and Yenkel Grinberg-Bleyer *

Cancer Research Center of Lyon, UMR INSERM 1052, CNRS 5286, Université Claude Bernard Lyon 1, Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France; guilhem.lalle@lyon.unicancer.fr (G.L.); julie.twardowski@lyon.unicancer.fr (J.T.)

* Correspondence: Yenkel.grinberg-bleyer@inserm.fr; Tel.: +33-(0)4-6985-6248

Abstract: The emergence of immunotherapies has definitely proven the tight relationship between malignant and immune cells, its impact on cancer outcome and its therapeutic potential. In this context, it is undoubtedly critical to decipher the transcriptional regulation of these complex interactions. Following early observations demonstrating the roles of NF- κ B in cancer initiation and progression, a series of studies converge to establish NF- κ B as a master regulator of immune responses to cancer. Importantly, NF- κ B is a family of transcriptional activators and repressors that can act at different stages of cancer immunity. In this review, we provide an overview of the selective cell-intrinsic contributions of NF- κ B to the distinct cell types that compose the tumor immune environment. We also propose a new view of NF- κ B targeting drugs as a new class of immunotherapies for cancer.

Keywords: onco-immunology; immunotherapy; NF-kappaB



Citation: Lalle, G.; Twardowski, J.; Grinberg-Bleyer, Y. NF- κ B in Cancer Immunity: Friend or Foe? *Cells* **2021**, *10*, 355. <https://doi.org/10.3390/cells10020355>

Academic Editor: Matthew S. Hayden
Received: 12 January 2021
Accepted: 5 February 2021
Published: 9 February 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction: The Growing Role of Immunity in Cancer

The past decades have been marked by a remarkable interest in research on onco-immunology, i.e., the interactions between cancer and the immune system. This has culminated with the approval of anti-Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4 (CTLA-4) and Programmed Death (PD)-1/PD-Ligand 1 monoclonal antibodies (mAbs) and CD19-targeted Chimeric Antigen Receptor (CAR)-T-cell infusions as frontline therapies for a variety of cancers. Despite the fact that these treatments are not effective in all patients and all types of diseases, they established the revolutionary concept that the immune system can be manipulated to treat cancer. Many different immune cell types, surface receptors and secreted factors are involved in the different steps of cancer progression. In order to highlight novel efficient and safe immunotherapies, it is necessary to apprehend this complexity of immune responses to cancer. Recent technological developments such as single-cell sequencing, high-dimensional flow and mass cytometry, and multiparameter immunofluorescence techniques, have enabled the fine dissection of immune cell subsets, their phenotype and function, revealing a landscape even more complicated than originally thought. However, little is known about the intracellular pathways that dictate the development and fate of different cell subsets in the tumor environment. It is becoming evident that understanding these intracellular cascades and transcription factors may highlight potential therapeutic targets. Among those, the Nuclear Factor kappa light chain enhancer of activated B cells (NF- κ B) transcription factors exhibit various and sometimes confusing effects on most immune subsets involved in immune responses to cancer.

2. A Simplified View of the Signaling to NF- κ B

NF- κ B is a family of 5 transcription factors that all share a Rel Homology Domain (RHD): NF- κ B1 (p105/p50, encoded by *Nfkb1*), NF- κ B2 (p100/p52, *Nfkb2*), RelA (*Rela*), RelB (*Relb*) and c-Rel (*Rel*) (reviewed in [1]). In the resting state, NF- κ B subunits are retained in the cytosol by I κ B proteins and by unprocessed p105 and p100 that act as inhibitors through the ankyrin repeats in their C-terminal portion. The engagement of diverse receptors leads

to the nuclear translocation of homo- or heterodimers of NF- κ B subunits, which can then activate or repress gene transcription.

The signaling cascade leading to NF- κ B activation was historically split in two pathways. In innate immune cells, activation of the canonical pathway is classically driven by the engagement of Pattern Recognition Receptors (PRRs) such as Toll-Like Receptors (TLRs). This leads to the recruitment of adaptors such as MyD88 or Toll/IL-1R domain-containing adaptor-inducing IFN- β (TRIF) and the activation of Tumor necrosis factor Receptor-associated Factor (TRAF)6. Similarly, cytokine receptors or members of the Tumor Necrosis Factor Receptor superfamily (TNFRSFs) can engage TRAF2/5. Additionally, in adaptive immune cells, engagement of the antigen receptor (BCR and TCR for B and T cells, respectively) recruits Protein Kinase C (PKC) β /PKC θ to enable the formation of the Caspase Recruitment domain-containing Membrane-Associated guanylate kinase protein-1 (Carma1)/ B-cell lymphoma/leukemia 10 (Bcl10) and Mucosa-Associated Lymphoid Tissue lymphoma translocation protein 1 (Malt1), or CBM complex [2]. All these signals lead to the activation of the I κ B kinase (IKK) complex (composed of the α and β catalytic subunits and γ scaffolding protein), which by phosphorylating Inhibitor of NF- κ B (I κ B α) and p105 triggers their proteasomal degradation and processing to the active p50 protein, respectively. This culminates in the rapid and transient translocation of NF- κ B subunits to the nucleus. The alternative NF- κ B pathway is activated in response to the engagement of a number of TNFRSFs, such as CD40 on dendritic cells (DCs) and B cells, B cell-Activating Factor Receptor (BAFF-R) on B cells or TNFR2 on T cells. Through the recruitment of TRAF2/3, this allows the stabilization of NF- κ B-inducing kinase (NIK) and the activation of IKK α /IKK β homodimers that phosphorylate p100 and lead to its processing into active p52. p52/RelB dimers are then translocated to the nucleus. Importantly, converging evidence now indicates that the canonical and alternative pathways, as well as subunits, are highly intricate. Hence, it may be more relevant to report the composition and roles of NF- κ B subunits and dimers, rather than oversimplifying NF- κ B to two distinct pathways.

As one of the most studied family of transcription factors, NF- κ B has been highlighted for its diverse roles in most biological processes, with a particular focus on inflammation, adaptive immunity and oncogenesis. Indeed, extensive research has identified both cell-autonomous and cell-extrinsic roles for NF- κ B in cancer. For instance, canonical NF- κ B controls tumor cell proliferation, tumor-mediated angiogenesis as well as metastasis. This is nicely demonstrated by the reduced tumor burden detected in mouse models of K-Ras induced lung cancer carrying conditional ablation of *Ikkb* or *Rela*, or transgenic expression of an I κ B α -superrepressor; similar observations were made in melanoma among other cancers [3–6]. However, opposite results were described in murine liver cancer or squamous cell carcinoma, where canonical NF- κ B inhibition increased tumor growth, thus highlighting the cell type-specific functions of this pathway and a possible role for NF- κ B as a tumor suppressor in certain settings [7,8]. In addition to these cell-intrinsic functions, NF- κ B activation in tumors appears to impact their immune environment. It is well established that tumor cells produce a number of NF- κ B-dependent cytokines and chemokines that affect the recruitment and phenotype of immune cells in the tumor bed, and the outcome of cancer [9–12]. Moreover, NF- κ B controls the mRNA expression and protein stability of PD-L1 in tumor cells, thereby promoting the inhibition of cytotoxic CD8⁺ T cells [13,14]. Finally, NF- κ B plays many cell-autonomous roles in the function of immune cells in the tumor environment, clearly impacting cancer outcome. This will be the focus of the present review.

3. NF- κ B in Innate Immunity and Inflammation

The development and progression of some tumors, such as colon or liver cancers, have been tightly associated with inflammatory cells and mediators. Because NF- κ B, through its function in innate immune cells, is a critical orchestrator of the inflammatory process, it is often viewed as the main molecular link between inflammation and carcinogenesis.

However, its roles may be multifaceted depending on the cell subset, the type of cancer and the signaling pathways that are engaged (Figure 1).

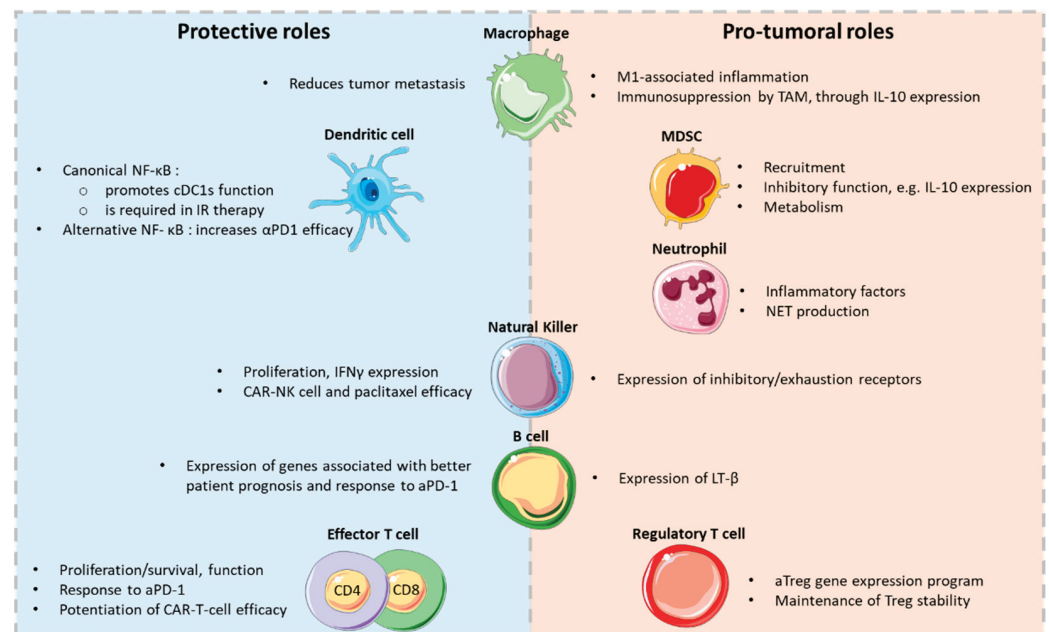


Figure 1. Dual roles of NF- κ B in tumor immunity. The figure depicts some of the known functions of NF- κ B in immune cell subsets in the tumor environment. Some figure elements were obtained from Servier Medical Art (<https://smart.servier.com/>).

3.1. Pro-Tumoral Roles of NF- κ B in Innate Immune Cells: Macrophages and MDSCs

3.1.1. Macrophages

Tumor-Associated Macrophages (TAMs) are a major component of the immune infiltrate of solid tumors [15]. Different flavors of macrophages can be found and often co-exist in the tumor microenvironment (TME): ‘M1’ macrophages are potent producers of pro-inflammatory factors, whereas ‘M2’ macrophages display anti-inflammatory, immunosuppressive and pro-angiogenic properties [16]. Ordinarily, high TAM infiltration is correlated with bad prognosis in many cancers irrespective of their polarization status [17].

In vitro assays have unequivocally demonstrated the role of canonical NF- κ B in the expression of inflammatory cytokines by macrophages- in other words, polarization towards an M1 phenotype [16,18]. Engagement of the TLR-Myd88 axis, as well as TNFR1, enables transcription of *Tnf*, *Il6* or *Il12b* among others, through canonical NF- κ B. In contrast, p50 homodimers have regulatory activity, which is essential for an M2 “tolerant” phenotype in vitro and in vivo [19,20]. Alternative NF- κ B subunits seem to be expendable for the expression of inflammatory cytokines [21]; instead overexpression of RelB inhibits *Tnf* expression in M1-polarizing conditions [22].

Seminal studies from Michael Karin’s group have established the pro-tumoral function of the canonical NF- κ B pathway in macrophages, in the context of inflammation-driven cancer. Ablation of *Ikkkb* or *Rela* in macrophages using the Lysozyme (LysM)-CRE strain, leads to decreased tumor growth in mouse models of cigarette-smoke induced lung cancer and colitis-associated colon cancer [23–25]. Conversely, in models of breast, ovarian cancer and glioblastoma, canonical NF- κ B activation in macrophages has an anti-inflammatory effect, preventing antitumor immunity and allowing tumor escape, in particular through the secretion of interleukin (IL)-10 [26–29]. Thus, depending on the tumoral setting, NF- κ B exerts its deleterious functions by promoting either inflammation or immunosuppression; these separate functions have been discussed in the past [30]. Of note, this pathogenic role of canonical NF- κ B was confirmed in patients with lung cancer, in which RelA activation in lung myeloid cells is associated with poor survival [25]. At odds with these reports, it

was proposed that IKK β may exert a protective function against tumor cell dissemination. Indeed, metastasis of breast cancer and melanoma cells was drastically increased in mice with myeloid-restricted deletion of *Ikkbb*, due to impaired innate and adaptive immunity to tumors [31–33]. Nevertheless, opposite results were found using a similar model of breast cancer metastasis [29]. These discrepancies may be attributable to the generalized use of the LysM-CRE strain in macrophage biology, which drives expression of the recombinase not only in macrophages but also in highly immunosuppressive MDSCs that are described below [34]. These complex functions of NF- κ B could also be harnessed in a therapeutic perspective. Cell therapy using *Ikkbb* or *Nfkb1*-deficient macrophages favors strong anti-tumor immunity and tumor rejection [27,35]. Conversely, as discussed in later sections, in vivo stimulation of TLRs using agonistic molecules, has a strong therapeutic potential in cancer, perhaps through its effect on macrophages [36]. Finally, the natural flavonoid baicalin, promotes the repolarization of TAM to M1 macrophages by increasing Relb and p52 expression, leading to decreased growth of hepatocellular carcinoma in mice [37].

Taken together, further exploration is needed to fully establish the role of NF- κ B in the different tumor types and steps of cancer development. Deciphering these precise molecular mechanisms, in particular the selective roles of NF- κ B subunits, will help provide a rationale for the targeting of this pathway in cancer. In the future, the development of more specific tools (conditional gene ablation, cell depletion, etc.) will undoubtedly clarify these dual functions.

3.1.2. MDSCs

Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSCs) have emerged in the past years as an important player in cancer immunity. They compose a heterogeneous subset of innate immune cells defined by their immunosuppressive properties, in particular their expression of IL-10, Transforming Growth Factor (TGF)- β , or Indolamine 2,3 DiOxygenase (IDO) among other factors, rather than by their phenotype that can overlap with other myeloid subsets [38]. Consequently, high MDSC infiltration is usually correlated with a poor prognostic value in cancer [39]. In mice, depletion of MDSCs (using poorly specific anti-Gr1 or anti-Ly6C mAbs) leads to enhanced antitumor immunity and reduced tumor burden [40,41]. The biology of MDSCs and the therapeutic potential of their targeting is currently under scrutiny, NF- κ B appearing to largely support their deleterious function.

It was proposed that NF- κ B could support the activation and expansion of MDSCs [42,43]. In pre-clinical models of cancer, both the canonical and the alternative pathway were reported to be implicated. It was first shown that TLR2/TLR4- MyD88-mediated signaling was required for the optimal function of MDSCs and suppression of anti-tumor immunity in models of colon cancer and fibrosarcoma, suggesting an involvement of canonical NF- κ B activation [44,45]. Similarly, TNFR/TNFR2 signaling promotes MDSC function, especially IL-10 production, in an NF- κ B-dependent manner [46]. More directly, the inhibitory function of MDSCs was strongly reduced in *Nfkb1*^{-/-} animals- though their number was increased in the tumor bed- resulting in the reduced growth of transplanted murine fibrosarcoma [47]. In addition, LysM-CRExRela-Flox mice transplanted with glioblastoma cells showed reduced levels of MDSCs and pro-tumoral TAMs, suggesting a role for RelA in MDSC recruitment [28]. Finally, a recent study elegantly described the role of c-Rel in regulating the development, function and metabolism of MDSCs during tumorigenesis [48]. Indeed, LysM-CRExRel-Flox mice display reduced growth of melanoma and thymoma cells, and the administration of the specific c-Rel inhibitor R96A delayed tumor growth and potentiated anti-PD1 therapy. This fully established the critical function of all three canonical NF- κ B subunits in the deleterious functions of MDSCs. Moreover, activation of the NIK/RelB-p52 axis induces *IDO* expression in human MDSC-like cells cultured with breast cancer cells, suggesting that alternative NF- κ B subunits may also promote immunosuppression in tumors through its role in MDSCs [49].

Of note, some literature also supports a pro-tumoral role for NF- κ B in neutrophils during cancer. The high activation of the canonical pathway in Tumor-Associated Neutrophils

(TAN) suggests its pro-tumoral role by inhibiting apoptosis of TANs, promoting autophagy and inducing a pro-inflammatory state [50–53]. Finally, indirect evidence highlights a role for NF- κ B in Neutrophil extracellular traps (NET) production [51], a known propagator of metastasis [54]. Altogether, this large body of evidence demonstrates the deleterious facet of NF- κ B activation in innate immune cells through its effects on macrophages and MDSCs. However, the picture is way more complex than it seems and NF- κ B can also suppress tumor growth through its pivotal functions in other innate immune subsets: DCs and NK cells.

3.2. NF- κ B in the Promotion of Anti-Tumor Immunity: DCs and NK Cells

3.2.1. DCs

DCs are the main bridge between innate and adaptive immune responses. Through their critical function as Antigen Presenting Cells (APCs) and their cytokine and chemokine expression, they can shift the balance between tumor immunity and tolerance [55]. DCs can come in different flavors defined by their phenotype and function in the TME. Type 1 Conventional DCs (cDC1s) have an optimal ability to cross-present tumor antigens to CD8⁺ T cells and produce high amounts of IL-12, making them potent anti-tumor cells [56], and the accumulation of cDC1s in the TME is of good prognosis in many cancers [57]. Furthermore, cDC1s are required for the response to anti PD-1 therapies in mice [58]. Type 2 cDCs (cDC2s) are classically associated with the priming of CD4⁺ T cells. Interestingly, intratumoral cDC2 density was also shown to be correlated with abundant CD4⁺ T cells and anti-PD-1 therapy response in melanoma patients [59]. Finally, plasmacytoid DCs (pDCs), characterized by their high expression of type I interferons, have complex roles in tumor immunity that largely rely on the type of stimulation and their activation status [60,61].

Extensive research has highlighted the various roles of NF- κ B in the biology of DCs. This stems from the fact that most of the stimuli that induce DC maturation (PRR, cytokines, etc.) are known activators of the NF- κ B pathways (reviewed in [62]). Briefly, canonical NF- κ B subunits were historically described as important regulators of DC maturation and survival following TLR and CD40 stimulation [63–65], though this is still controversial and may in fact depend on the type of stimuli and DC subset [66]. In contrast, it is established that c-Rel is absolutely critical for the expression of *I112p35* (which, together with *I112p40*, encodes IL-12), which emphasizes its role in the function of cDC1s [63,66,67]. The NIK/RelB-NF- κ B2 axis is also involved in DC biology, particularly for the stability of the cDC2 lineage, and is required for optimal antigen cross-presentation [68–71]. To add another layer of complexity, it was shown that canonical NF- κ B signaling induced by TLR engagement, drives the translocation of p50/RelB dimers, which enables optimal DC maturation [72]. Collectively, this highlights the overlaps between canonical and alternative subunits [73]. In contrast with these immune-stimulatory properties, NF- κ B activation in DCs is also critical to maintain immune tolerance. This is clearly illustrated by the spontaneous autoimmune syndrome observed in mice with conditional ablation of *Ikk β* in CD11c⁺ DCs, which is due to impaired homeostasis of migratory DCs and a subsequent defect of Foxp3⁺ regulatory T cells (Treg cells) in lymph nodes [74]. Moreover, the alternative pathway, through IKK α activation following CD40 stimulation, was proposed to promote the expression of the immunosuppressive molecule IDO- in particular in pDC-, thereby contributing to immune tolerance, for instance through the induction of Treg cells [75,76].

These diverse functions have obvious implications in cancer immunity. Indeed, NF- κ B activation is often actively dampened in DCs of the TME, which leads to reduced DC maturation and function, through mechanisms that may involve soluble factors such as Fibrinogen-like protein 2 (FGL2) and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) or immune checkpoints such as PD-1 [77]. The cell-autonomous functions of NF- κ B in DCs are illustrated in different settings of cancer therapy. For instance, DC-restricted ablation of *Rela* abolishes the therapeutic effect of ionizing radiation (IR) in several models of transplanted tumors, while ablation of RelB improves this therapeutic efficacy, highlighting opposing functions of canonical and alternative NF- κ B subunits in this IR-induced signaling

cascade [78]. In line with this, adenovirus-mediated overexpression of the RelA RHD in bone-marrow-derived DCs (BMDCs) increases their APC function and cytokine expression. Indeed, transfer of such transgenic cells to tumor-bearing mice leads to reduced tumor growth and enhanced survival [79]. In vivo administration of CD40 agonists as well as Second Mitochondria-derived Activator of Caspases (SMAC) mimetics, drives the activation of the alternative NF- κ B pathway and increases the secretion of IL-12 [80]. When combined to anti-PD-1 therapy, this regimen leads to tumor rejection in a NIK-dependent fashion [81]. Finally, it is likely that many TLR agonists with therapeutic activity in cancer, act in part by enhancing NF- κ B activation in DCs, though this has so far not been directly demonstrated [82,83]. Thus, NF- κ B in DCs appears as an interesting target in cancer therapy. However, the roles of each subunit may vary depending on the context and deciphering their DC-intrinsic selective contributions to different cancer types and therapies may provide valuable insight and rationale into the use of DC-based immunotherapies.

3.2.2. NK Cells

Through their potent cytokine production and cytotoxic functions, Natural Killers (NK) cells are powerful antitumor agents. Their enrichment in the tumor bed is associated with good prognosis in many cancers. In mouse models, NK cells are able to delay tumor growth or prevent metastasis, depending on the model (reviewed in [84]). NK cell activation and cytotoxicity largely relies on the engagement of several activating receptors. Interestingly, many of these, such as CD244, NKG2D, CD226, NK1.1, Ly49D, or Nkp30, trigger the activation of canonical NF- κ B subunits in a CBM complex-dependent manner [85–88]. Similarly, IL-18, one of the master cytokines enabling NK cells function in cancer, activates NF- κ B through MyD88 [89–91].

Consequently, NF- κ B was shown to play a role in different aspects of NK cell biology. Inhibition of NF- κ B with a non-degradable I κ B α in NK cells reduced their proliferation [92]. Conversely, constitutive IKK β activation leads to hyper-activated NK cells [93]. Interestingly, *Nfkb1*^{-/-} NK cells display a strong increase in proliferation, while *Rel* ablation has no effect, highlighting NF- κ B1 as a negative regulator of NK proliferation [94]. In patients with *IKBKB* or *IKBKG* mutations, impaired IFN γ expression by NK cells was detected [95,96]. Similar observations were made upon chemical or genetic inhibition of canonical NF- κ B in murine NK cells [86,87,92]. However, the exact contribution of each subunit remains unknown to date, as NF- κ B1 and c-Rel appear to be expendable for NK cell function in vivo [94]. Finally, several reports using mouse NK cells suggested a role for canonical NF- κ B subunits in the expression of *Prf1* (encoding perforin) and *Gzmb* (granzyme B) [97,98].

Despite this body of evidence, only few studies have directly investigated the function of NF- κ B in NK cells in the context of cancer. It was proposed that HIF-1 α expression, induced by hypoxia in the TME, inhibited IL-18-mediated NF- κ B activation in tumor-infiltrating NK cells, contributing to their defective function and uncontrolled tumor progression in the RMA/S lymphoma model that exhibit impaired expression of Major Histocompatibility Complex (MHC)-I [99]. In a model of pancreatic cancer, stimulation of NK cells with the polysaccharide SEP enhanced their cytotoxicity through a TLR4/ Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK)/MAPKs/NF- κ B pathway, which was associated with delayed tumor growth [100]. Moreover, it was proposed that the therapeutic effect of paclitaxel in breast cancer, may rely on enhanced NK cell function in an NF- κ B-dependent manner [101]. Finally, CAR-NK cells engineered to express an artificial Myd88/CD40 signaling node display enhanced anti-tumor activity, likely through increased NF- κ B activation [102]. Importantly, NF- κ B can also exhibit a deleterious facet, as it was suggested to promote the expression of Tim-3 and NK cell dysfunction in human esophageal cancer [103]. Hence, although NF- κ B mainly displays anti-tumor properties through its function in NK cells, further studies are warranted to fully apprehend their therapeutic potential and discriminate the dual roles of NF- κ B in NK cell function and exhaustion.

4. NF- κ B in Adaptive Immunity to Cancer

4.1. B Cells

B cells are often found in large quantities in the TME [104] but seem to have divergent functions in cancer immunity depending on the tumor context. B cells were originally shown to promote cancer growth in mouse models, for instance through their expression of soluble factors such as IL-8 or lymphotoxin (LT)- β [105–107], or more directly through antibody secretion [108]. In addition, a subset of “regulatory” B cells (Breg cells) can express inhibitory cytokines such as IL-10, TGF- β or IL-35 and favor tumor progression [104,109–111]. In line with these pre-clinical observations, the depletion of B cells using anti-CD20 mAbs, had beneficial effects in patients with colon cancer, though results were disparate in melanoma patients [112,113]. Conversely, B cells were also shown to exert anti-tumor functions through their Ab secretion (driving ADCC, complement-dependent lysis or opsonization of tumor antigens by APCs) as well as their APC capacity [114–116]. B-cell infiltration is associated with good prognosis in the vast majority of cancers [117]. The organization of B cells and T cells in Tertiary Lymphoid Structures (TLS) is a powerful predictor of the efficacy of PD-1-blockade therapy in human melanoma, renal cell carcinoma and sarcoma [118–120].

NF- κ B plays important functions in the maturation and thus the function of B cells. NF- κ B activation can be driven by the engagement of the antigen receptor (BCR) as well as many members of the TNFRSF family (in particular BAFF-R and CD40 for B cells). Conditional ablation of both *Rel* and *Rela* in mature B cells decreases their numbers in the spleen [121]. Similar observations were made with conditional *Ikkkb* KO animals [122]. Upon immunization with T cell-dependent antigen sheep red blood cells, c-Rel is essential for germinal center B cell maintenance, whereas RelA is required for plasma cell development [123]. Interestingly, the alternative pathway is also involved in germinal center B cell development, as shown in mice harboring conditional ablation of *Relb* and *Nfkb2* in mature B cells [124]. Interestingly, c-Rel and RelB may have complementary functions in B-cell homeostasis [125].

Despite this large body of evidence characterizing NF- κ B in non-pathological states, only few studies have directly assessed the functions of NF- κ B in B cells in cancer. In a mouse model of prostate cancer, it was demonstrated that IKK β drives the expression of LT- β by B cells, which in turn augments tumor growth [107], highlighting the deleterious function of B cells in this setting. Conversely, it was recently shown that human melanoma secretomes drive the expression of many NF- κ B-dependent genes in B cells, including activation markers and co-stimulation molecules such as CD69, CD30 or CD137, as well as chemokines such as CCL3 or CCL4 [112]. This enrichment was correlated with improved survival of patients and better response to anti-PD-1 checkpoint blockade therapy. However, it remains unclear whether NF- κ B actually plays an active role in the orchestration of anti-tumor immune responses. More mechanistic studies, in particular in conditional KO mouse models, are therefore required to elucidate the implication of NF- κ B subunits in B cells during cancer.

4.2. T Cells

T cells are probably the most scrutinized cells in cancer immunity. Whereas CD8⁺ T cells and IFN γ -producing Thelper (Th) 1 cells exhibit potent anti-tumor functions and are generally of good prognosis in solid tumors [126,127], their Foxp3⁺ regulatory T cell (Treg cells) counterparts are master inhibitors of cancer immunity (reviewed in [128]). Their enrichment in the TME is associated with poor prognosis in a large number of cancers [129]. Strikingly, NF- κ B plays many roles in these distinct T-cell subsets.

4.2.1. Effector CD4⁺ and CD8⁺ T-Cell Subsets

NF- κ B was originally described as an important regulator of T-cell homeostasis, i.e., proliferation, survival and expression of specific cytokines [130]. T cells isolated from *Nfkb1*^{-/-} or *Rel*^{-/-} animals, exhibit a reduced proliferative capacity in vitro when

compared to control cells [131,132]. Similarly, Shifrut et al. identified RelA as a critical regulator of human CD8⁺ T-cell proliferation using a Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)-Cas9 screening approach [133]. This observation was further validated in mice [134]. This phenotype seems to rely on both cell-intrinsic defects (e.g., impaired expression of the cell cycle factor c-Myc and the anti-apoptotic protein Bcl-xL [135,136]) and extrinsic factors, in particular the reduced production of IL-2, which when added to cultures rescues the proliferative defects of *Rel*-deficient T cells [135]. In addition, NF- κ B has cell-autonomous roles in the polarization towards different flavors of Th cells. RelA and c-Rel are crucial for the expression of RAR-related orphan receptor (ROR) γ t in differentiating Th17 cells and have been involved in the expression of IFN γ by Th1 cells [137–140]. A recent study pinpointed possible functions of RelA and NF- κ B2 in the expression of *Gata3* and *Il4*, respectively, by murine Th2 cells [141]. Finally, Th9 cells, which can exhibit potent anti-tumor properties, may rely on either canonical or alternative NF- κ B activation, depending on the stimulus [142,143]. NF- κ B is also involved in the maturation and function of CD8⁺ T cells. For instance, RelA activation downstream of TCR engagement, is required for optimal expression of *Eomes* [144]. The expression of IFN γ by CD8⁺ T cells is also NF- κ B dependent, as shown in mice with conditional ablation of *Rela* in T cells [139], and in patients carrying loss-of-function mutations in *IKBKB* and *REL* [96,145]. Finally, PKC- θ and Bcl10 are required for the cytotoxic function of CD8⁺ T cells in vitro, implying of the need for canonical NF- κ B activation in this mechanism [146].

Altogether, this suggests that NF- κ B likely plays a role in controlling T-cell activation, survival and/or function in the context of cancer. In line with this, NF- κ B activation is dysregulated in T cells from patients and mice with renal cancer [147,148]. Moreover, peripheral anergic T cells, which resemble tumor-infiltrating exhausted T cells, exhibit reduced RelA nuclear translocation [149]. More directly, the function of NF- κ B in T-cell immunity to cancer was explored in a seminal study by Barnes and al, where the authors used mice carrying conditional ablation of *Ikkbb* in total T cells. Inhibition of canonical NF- κ B activation leads to increased tumor growth in an immunogenic model of fibrosarcoma [150]. This was associated with reduced effector function and cytotoxic activity of CD8⁺ T cells. This phenotype was also observed in *Carma1*-deficient mice. In a reverse set of experiments, the same group found that constitutive activation of IKK β (Ikk β -CA) in T cells, strongly decreases tumor growth in a CD8⁺ T cell-dependent manner [151]. Engineering WT or TCR-transgenic CD8⁺ T cells with an active form of IKK β (Ikk β -CA), enables potent tumor rejection. Similarly, ablation of *Tnfrsf25* in TCR-Tg T cells, which increases canonical NF- κ B activation, augments their therapeutic potential in transplanted mouse melanoma [152]. Overall, this highlights an interest for genetically-augmented NF- κ B activation in T-cell-based cancer therapies. It would now be interesting to decipher which cell types and which NF- κ B subunit(s) are required for this control of tumor growth. A recent report suggests that p50/p50 homodimers are able to directly repress *Gzmb* expression in CD8⁺ T cells, consequently, *Nfkb1*^{-/-} mice exhibit a partial resistance to colon tumorigenesis [153]. In addition, as described above, NF- κ B subunits orient the polarization toward Th cell subsets. Importantly, both protective and deleterious functions were attributed to discrete Th cell subsets in cancer immunity [154]. It is thus likely that this function will impact tumor growth, though the link has not yet been determined. Finally, NF- κ B seems to be important for the reinvigoration of T cells following checkpoint-blockade therapies, and this point will be largely discussed below in Section 5.1.

4.2.2. Foxp3⁺ Treg Cells

Unlike its function in promoting immunity by controlling effector T cell function, NF- κ B is also a master regulator of Treg cell biology and thus regulates immune tolerance. Activation of RelA and c-Rel, through a PKC θ /CBM/IKK axis, is critical for the initiation of Foxp3 expression in immature Treg cells in the thymus [155–158]. Consequently, germline or conditional ablation of one of the aforementioned molecules leads to a significant decrease in the number of Foxp3⁺ Treg cells in the thymus and secondary lymphoid tissues.

In addition, NF- κ B activation is required to maintain the homeostasis and identity of mature peripheral Treg cells. Treg-restricted ablation of *Carma1*, *Bcl10*, *Malt1*, *Ikkbb* or *Rela* using the Foxp3-CRE strain, leads to a multifocal and lethal autoimmune syndrome, characterized by the loss of Treg signature genes and the expression of effector genes such as inflammatory cytokines [158–162]. On the other hand, activation of the alternative pathway seems to have a rather deleterious effect, as transgenic expression of *Nik* [163], as well as ablation of *Nfkb2* [164,165], also drive autoimmune symptoms. The latter can be rescued by additional ablation of *Relb*, which by itself is expendable for Treg cell homeostasis [166].

This master function of NF- κ B in Treg cells has strong implications in cancer immunity. Indeed, the growth of transplanted tumors is strongly reduced in mice with Treg-specific deletion of either *Carma1*, *Bcl10* or *Malt1* [159–161]. This is consistent with our original observation that melanoma burden is significantly impaired in mice with conditional *Rel* ablation in Treg cells [167]. Interestingly, germline ablation of *Rel* gives rise to the same phenotype [48]. Mechanistically, ablation of the CBM/c-Rel axis leads to the generation of ‘unstable’ Treg cells that produce important amounts of IFN γ and TNF. Thus, Treg cells become potent anti-tumor cells, as the transfer of *Carma1*^{-/-} Treg cells is sufficient to reduce cancer growth in an IFN γ -dependent fashion [159]. In line with all these observations, administration of Malt1 inhibitors (mepazine, MI-2), IKK β inhibitor (KINK-1) or c-Rel inhibitors (pentoxifylline, IT-603 or R96A) reduces Treg cell ‘fitness’ in the tumor, i.e., their accumulation and/or their function [48,159,162,167,168]. Consequently, these drugs have a significant therapeutic effect in different pre-clinical models of cancer, when administered alone or combined with anti-PD-1/PD-L1 mAbs, tumor vaccines or chemotherapy.

Collectively, this demonstrates that NF- κ B is at the interface between T-cell immunity and tolerance to tumors. This highlights a strong rationale for targeting this pathway in cancer immunotherapy.

5. NF- κ B Modulation at the Era of Immunotherapy: Activation or Inhibition?

5.1. NF- κ B Activation to Enhance Effector T-Cell Function in Cancer

5.1.1. Putative Functions of NF- κ B in T-Cell-Targeting Immunotherapies

Cancer immunotherapies developed in the past decades have revolutionized patient care. In particular, immune checkpoint-blockade therapies such as anti-CTLA-4 and anti-PD-1/PD-L1 antibodies, and CAR-T-cells, appear as game changers for the treatment of numerous solid cancers and hematological malignancies, respectively. However, these agents are not effective in all patients, and it is therefore critical to understand the molecular mechanisms underlying the response and resistance to such therapies. Interestingly, a number of studies converge to consider the NF- κ B pathway as a possible mediator of the anti-tumor properties of current immunotherapies.

Bulk and single-cell transcriptomic analyses of tumor specimens obtained from patients before and after anti-CTLA4 and/or anti-PD1 administration, have unequivocally demonstrated that the up-regulation of NF- κ B-dependent genes in both tumor and immune cells, underlies the clinical response to checkpoint-blockade therapies [169,170]. In particular, a number of supposedly NF- κ B-regulated cytokines and chemokines are up- and down-regulated in patients who respond to immunotherapy [171]. However, it remains unclear whether NF- κ B activation is a proxy of T-cell activation or is actually required for improving anti-tumor responses. Mechanistically, it was proposed that the engagement of either CTLA-4 or PD-1 on T cells, may reduce NF- κ B activation through the recruitment of Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2 (SHP-2) and Protein Phosphatase (PP)2A, leading to reduced signaling downstream of TCR and CD28 [172–175]. Subsequently, CTLA-4 or PD-1-blockade would lead to increased NF- κ B activity in T cells. In line with this hypothesis, it was shown that CD28 engagement, which drives NF- κ B activation among other pathways, is critical for the efficacy of anti-PD-1 therapy in mice [176]. Moreover, the expression of IFN γ and CD127, two canonical NF- κ B-dependent genes, are required for tumor clearance upon CTLA-4/PD-1 dual blockade [177].

Improvement of NF- κ B activity in cellular therapies to cancer is also a promising approach. As stated above, ablation of *Tnfrsf25* (encoding the NF- κ B inhibitor A20) or expression of I κ k β -CA augments the anti-tumor activity of transferred T cells [151,152]. Recently, a genome-wide CRISPR approach revealed that ablation of the RNA helicase Ddx37 in murine T cells improved tumor clearance by increasing RelA activity [178]. In addition, possible implication of NF- κ B was reported in the expansion of CD19- CAR-T-cell carrying a 4-1BB signaling domain. Indeed, engagement of the CAR in these cells drives sustained NF- κ B activation in a TRAF1-dependent mechanism [179]. Both the canonical and alternative NF- κ B pathway are activated following CD19 recognition, and expression of a dominant-negative NIK peptide reduces CAR-T cell expansion and survival *ex vivo* [180]. Further studies are now required to elucidate the direct function of discrete NF- κ B subunits in the therapeutic effect of CAR-T cell administration *in vivo*.

These findings strongly advocate for a beneficial role of NF- κ B activation in the response to checkpoint-blockade and CAR-T-cell-based therapies, though direct evidence of its requirement is lacking.

5.1.2. Stimulation of NF- κ B by TLRs and TNFRSFs Agonistic Reagents as Novel Immunotherapies

The therapeutic potential of TLR agonists in mouse models of cancer has been largely documented (reviewed in [83]). This has led to numerous clinical trials in which patients are treated with synthetic TLR3, 4, 7 and 9 agonists in combination with other immunotherapies or conventional treatments [181]. Because TLR signaling through NF- κ B is a master inducer of innate immune cell activation, maturation and inflammatory cytokine expression, it is likely that the anti-tumor effect of these drugs relies on NF- κ B activation. Similar hypotheses can be made for Stimulator of Interferon Genes (STING) and CD40 agonists, which drive NF- κ B activation in DCs (and B cells for CD40) [78,182,183]. In addition, a number of initiatives currently aim at exploring the therapeutic potential of antibodies triggering activation of “stimulatory” checkpoints on T cells, i.e., co-stimulation receptors of the TNFRSF family such as 4-1BB or Glucocorticoid-Induced TNFR (GITR). Engagement of these receptors has been proposed to induce or sustain NF- κ B activation in combination with TCR stimulation [184]. Engagement of all these receptors improves immunity to cancer and reduces tumor growth in pre-clinical models [185]. These observations are contributing to pushing these agents toward clinical applications [185]. However mechanistically, it is still unclear whether the therapeutic efficacy of these molecules relies on NF- κ B activation. Furthermore, the specific delineation of NF- κ B subunits in this process is unknown. Novel tools, such as mice carrying lineage-specific NF- κ B ablation, will help unravel these issues and may provide a mechanistic rationale for the use of these new therapies.

5.2. NF- κ B Inhibitors as Immunotherapeutic Agents?

5.2.1. Modulation of Tumor Immunity by NF- κ B Inhibitors

At odds with this possible protective function in T cells, it is clear that NF- κ B can have pathogenic functions in cancer, in particular through its well-established roles in malignant cells. Consequently, a myriad of inhibitors of the NF- κ B pathway have been tested for their anti-cancer properties, with encouraging results in pre-clinical models. These compounds were shown to directly impact tumor cell survival, proliferation, or invasiveness in *in vitro* assays and *in vivo*. In addition, it is becoming evident that NF- κ B inhibitors largely modulate the tumor immune response. Indeed, therapeutic intervention at each step of the NF- κ B pathway (i.e., Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein (cIAPs), CBM and IKK complexes, I κ Bs, and c-Rel) was shown to enhance cancer immunity to some extent. A large panel of modifications in the immune composition of the tumor infiltrate and the function of immune cells was described, and some relevant examples are highlighted in Table 1. The precise reasons for this immune stimulation are not clearly defined, though the following mechanisms can be proposed (Figure 2):

Table 1. Effect of NF-κB inhibitors on cancer immunity. This table highlights some of the studies aiming at evaluating monotherapy-induced immune responses in the context of cancer in vivo. In vitro assays and other diseases are not discussed.

Agent/Mechanism	Tumor Model	Impact on Immune Cells	References
Mepazine/MI-2, MALT-1 inhibitor	Mouse melanoma	↑ CD8 ⁺ T cells, ↑ IFN γ by Treg cells in TILs; efficacy lost in RAG ^{-/-} mice	[159]
	Mouse breast, colon, lung cancer	↑ T cells and IFN γ expression, ↓ Treg cell proportion in TILs	[186–188]
Curcumin, prevents IκB α degradation, NF-κB translocation	Mouse breast, bladder lung cancer	↓ MDSCs in TILs, ↑ M1 macrophages	[189–191]
	Mouse glioblastoma	↑ NK cells; NK-cell-dependent therapeutic effect	[192]
	Patients with lung cancer	↑ IFN γ expression by CD4 ⁺ T cells, ↓ Treg cell proportions in PBMCs	[193]
KINK-1, IKK β inhibitor	Mouse melanoma	↑ CD8 ⁺ T-cell infiltration and function in tumors	[162]
SMAC mimetics (CIAP antagonists), inhibit canonical NF-κB, enhance alternative NF-κB	Mouse Multiple myeloma	↑ macrophage phagocytosis; macrophage-dependent therapeutic effect	[194]
	Mouse glioblastoma, breast cancer	↑ T-cell in TILs; CD8 ⁺ T-cell-dependent therapeutic effect	[195]
IT-603, c-Rel inhibitor	Mouse thymoma, melanoma	↓ circulating T cells; ↑ IFN γ expression by Teff/Treg cells in TILs	[167,196]
PTXF, c-Rel inhibitor	Mouse breast cancer, melanoma	↑ CD8 ⁺ T cells, ↓ Treg cells in TILs; efficacy lost in RAG ^{-/-} mice	[167,168]
R96A, c-Rel inhibitor	Mouse melanoma	↓ inhibitory function of MDSCs	[48]

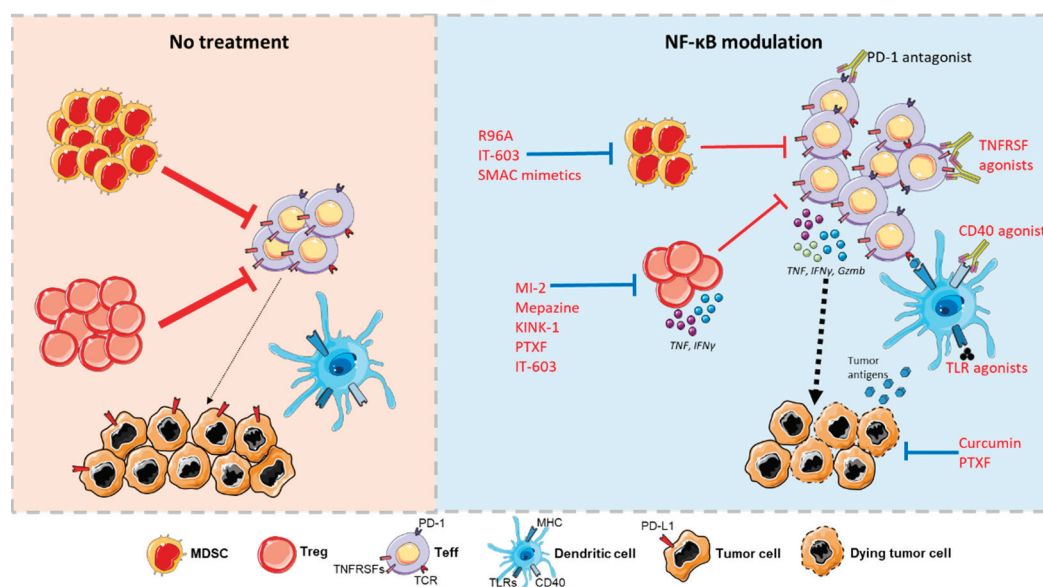


Figure 2. Proposed mechanism for the immunotherapeutic effects of NF-κB modulating agents. In the absence of treatment, MDSCs and Treg cells actively inhibit CD4⁺ and CD8⁺ Teff cells; tumor-derived Ag presentation by DCs is low. NF-κB inhibitors increase the numbers and activity of Teff cells by decreasing the recruitment and fitness of MDSCs and impairing Treg cell identity, relieving the suppression of Teff cells. Moreover, these treatments reduce PD-L1 expression and induce tumor cell death, leading to enhanced Ag-presentation by DCs. Conversely, stimulation of TNFRSFs and TLRs on DCs and Teff cells activates NF-κB to increase their maturation numbers and function. All these agents potentiate the therapeutic effect of anti-PD-1 mAbs. Some figure elements were obtained from Servier Medical Art (<https://smart.servier.com/>).

(i) One possible mechanism relies on tumor cell-targeting effects of NF- κ B inhibitors, which would in turn enhance immune responses. Tumor cell death induced by Bortezomib was proposed to enhance DC maturation and stimulation of potent anti-tumor effector T cells and NK cells [197]. Moreover, the chemokine expression profile of tumor cells may be affected by NF- κ B inhibition, leading to enhanced tumor infiltration, as shown with the IKK inhibitor BMS-345541 [198] or curcumin [199]. NF- κ B is also well-known to favor the expression and stability of PD-L1 at the surface of tumor cells, with the administration of curcumin to breast-tumor bearing mice decreasing PD-L1 expression and subsequently enhancing CD8⁺ T-cell infiltration [14].

(ii) Aside from these tumor-targeting effects, NF- κ B inhibitors likely function by relieving the suppression exerted by MDSCs and Treg cells. The latter, in particular, are impaired in the tumor tissue following administration of mepazine, KINK-1 and pentoxifylline (PTXF) (reviewed in [200]). Similarly to what was highlighted in Section 4.2.2 using genetically-engineered mice, agents targeting the NF- κ B pathway are able to specifically decrease Treg cell numbers and impair their stability, leading to the expression of effector cytokines such as IFN γ or TNF, in the TME but not in lymphoid tissue. This suggests that these therapies should cause limited adverse effects in normal tissues. Thus, the effects of NF- κ B inhibitors on cancer immunity vary depending on the drug and cancer model. Generally, all of these reagents lead to an increase in the number and/or the function of cytotoxic CD8⁺ T cells in the tumor microenvironment. Importantly, these changes in immune cells do not seem to be solely a side effect of tumor cell targeting, but rather play an active role in cancer elimination. For instance, administration of mepazine or PTXF fails to reduce tumor burden in *RAG1*^{-/-} animals that are devoid of B and T cells [159,167]; In addition, the therapeutic effect is lost when CD8⁺ T cells are depleted by a monoclonal antibody, highlighting the importance of T cells in the therapeutic potential of NF- κ B inhibitors.

5.2.2. Combination of NF- κ B Inhibitors and Other Immunotherapies

The main challenge in cancer immunotherapy is now to identify drugs that are able to overcome innate or acquired resistance to anti-PD-1 or anti-CTLA-4 checkpoint-blockade therapies. Combination treatments associating NF- κ B inhibitors to other immunotherapies are emerging as a promising step forward in cancer care (Table 2). In the context of anti-PD-1-therapy-resistant tumors, the co-administration of either curcumin, bortezomib, SMAC mimetics, mepazine, PTXF or R96A enhances anti-tumor immunity and delays cancer growth. The combination of anti-PD-1 and bortezomib is currently investigated in clinical trials in multiple myeloma patients. NF- κ B inhibitors can also be associated with cytokines (IL-12, IL-18, IFN α), oncolytic viruses or other antibody-based therapies (anti-CTLA4, anti-CD38). The relative lack of efficacy of NF- κ B inhibitors observed in clinical trials of the past decades may therefore be overcome by their association with immunotherapies.

Table 2. Examples of combination of NF- κ B inhibitors with other immunotherapies.

Organism.	Combination Therapy	Cancer Type(s)	References
Mouse Studies	RELA shRNA + α PD-1	Hepatocellular carcinoma	[201]
	curcumin + α CTLA-4	Breast cancer	[14]
	curcumin + α PD-1/PDL-1	Diverse	[189,199,202]
	Bortezomib + IL12	Multiple myeloma	[203]
	Bortezomib + reovirus	Multiple myeloma	[204]
	Mepazine + α PD-1/PD-L1	Melanoma	[159,160]
	BAY11-7082 + rmIL-18	PDAC	[205]
	SMAC mimetics + oncolytic VSV	Breast cancer	[206]
	SMAC mimetics + α PD-1	Diverse	[81,207]
	PTXF/IT-603/R96A + α PD-1/PD-L1	Diverse	[48,167]
	PTXF + α PD-1 + chemotherapy	Breast cancer	[168]
Human Studies	Bortezomib + α CD38 + dexamethasone	Multiple myeloma	[208]
	Bortezomib + α PD-1	Multiple myeloma	[209]
	Bortezomib + α SLAMF7	Multiple myeloma	[210]
	Bortezomib + Interferon α 2B	Melanoma	[211]
	SMAC mimetics + α PD-1	Diverse	[212]

5.3. Limitations of NF- κ B-Targeting Therapies and Future Directions

Despite great expectations following the early development of NF- κ B inhibitors for the treatment of inflammatory diseases and cancer, very few of these molecules have reached advanced phases of clinical trials. This is due to either modest efficacy or severe adverse effects. In light of recent progress in understanding NF- κ B mediated regulation of immune responses, one could now envision a revival of this class of drugs. However, several aspects of the immense power of NF- κ B must be taken into account before we can safely move towards large-scale clinical applications:

The type of cancer: It is very likely that the putative efficacy of NF- κ B inhibitors will depend on the type of malignant tissue and its immune environment. It was proposed that NF- κ B inhibition would be especially relevant for the treatment of inflammation-driven cancers and NF- κ B-“addicted” tumors [213]. Hypothetically, NF- κ B activation may in some settings have deleterious roles in tumor-cell autonomous biology, e.g., apoptosis or chemokine/cytokine expression, though there is to our knowledge, no direct evidence of this. Moreover, the composition and quality of the immune response must be carefully evaluated when it comes to NF- κ B inhibition. In the case of cold tumors, or conversely in cancers undergoing a partial anti-tumor response, it is possible that NF- κ B inhibition may have no effect or even reduce the activity of effector cells.

The cell-specific targeting: In pre-clinical models of cancer, it is likely that NF- κ B inhibitors are partially efficient because they primarily target suppressive cells that are largely enriched in the tumor environment. However, it is important to note that NF- κ B is also a master regulator of potent anti-tumor effector cells as described above. Therefore, the duration, dosage and specificity of these treatments must be tightly controlled to avoid deleterious effects. For instance, Heuser et al. showed that administration of high doses of KINK-1 impaired CD8 T-cell function, whereas lower doses displayed therapeutic effects in melanoma [162]. Recent advances in drug engineering may also help in the development of more specific, thus more potent and safer, drugs. Antibody-drug conjugates, allowing the delivery of the payload to defined cell types, are currently under development [214]. This system could be used to deliver NF- κ B inhibitors to either tumors cells or immunosuppressive cells. Consistently, curcumin conjugated to anticancer Abs, displays promising tumoricidal activity in pre-clinical models of melanoma and glioblastoma [215,216].

The precise delineation of the roles of NF- κ B subunits: It is increasingly evident that NF- κ B subunits exhibit distinct functions in immune cell subsets and cancer cells. These selective contributions may underlie the lack of efficacy of certain NF- κ B-targeting agents and explain their toxicity. The use of conditional knock-out and knock-in animal models, as well as large-scale CRISPR screens and modern sequencing techniques, should provide, both at the whole-organism and single cell levels, the gene expression patterns controlled by each member of the NF- κ B family. In addition, the modeling of interactions between tumor cells and their microenvironment using organoid systems, will allow the development of screening approaches and the identification of selective modulators of the NF- κ B pathway. This will undoubtedly help the discovery of unique therapeutic targets for the treatment of cancer.

6. Conclusions

Immune responses to cancer are complex and vary depending on the type of malignancy. However, the growing knowledge on the dozens of innate and adaptive immune cell subsets has enabled the identification of novel therapeutic targets. In this review we have highlighted the multifaceted roles of 5 members of the NF- κ B family of transcription factors, in orchestrating tumor immunity. Targeting NF- κ B in cancer may not be a revolutionary concept as it finds its roots in the early 90s, but there is now a strong rationale for the revival of NF- κ B-targeting therapies. Indeed, in addition to their direct effect on tumor cell survival, proliferation or metastatic potential, modulators of the NF- κ B pathways are also likely to act as immune-stimulatory agents. New efforts must now be directed at

identifying agents able to selectively activate or repress specific NF- κ B subunits, and to ensure their efficacy, delivery mode and safety.

Author Contributions: Conceptualization, Y.G.-B.; writing, G.L., J.T. and Y.G.-B.; funding acquisition, Y.G.-B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by grants from INSERM/CNRS ATIP-Avenir, the Labex DEVwe-CAN (ANR-10-LABX-0061), the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) Foundation, and the Bristol-Meyer Squibbs (BMS) Foundation.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: No new data were created or analyzed in this study. Data sharing is not applicable to this article.

Acknowledgments: We are grateful to Brigitte Manship for her critical reading of the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Hayden, M.S.; Ghosh, S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* **2008**, *132*, 344–362. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gerondakis, S.; Siebenlist, U. Roles of the NF-kappaB pathway in lymphocyte development and function. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2010**, *2*, a000182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Basseres, D.S.; Ebbs, A.; Levantini, E.; Baldwin, A.S. Requirement of the NF-kappaB subunit p65/RelA for K-Ras-induced lung tumorigenesis. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 3537–3546. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Carneiro-Lobo, T.C.; Scalabrini, L.C.; Magalhaes, L.D.S.; Cardeal, L.B.; Rodrigues, F.S.; Dos Santos, E.O.; Baldwin, A.S.; Levantini, E.; Giordano, R.J.; Basseres, D.S. IKKbeta targeting reduces KRAS-induced lung cancer angiogenesis in vitro and in vivo: A potential anti-angiogenic therapeutic target. *Lung Cancer* **2019**, *130*, 169–178. [[CrossRef](#)]
- Meylan, E.; Dooley, A.L.; Feldser, D.M.; Shen, L.; Turk, E.; Ouyang, C.; Jacks, T. Requirement for NF-kappaB signalling in a mouse model of lung adenocarcinoma. *Nature* **2009**, *462*, 104–107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Yang, J.; Splittgerber, R.; Yull, F.E.; Kantrow, S.; Ayers, G.D.; Karin, M.; Richmond, A. Conditional ablation of Ikkb inhibits melanoma tumor development in mice. *J. Clin. Investig.* **2010**, *120*, 2563–2574. [[CrossRef](#)]
- He, G.; Yu, G.Y.; Temkin, V.; Ogata, H.; Kuntzen, C.; Sakurai, T.; Sieghart, W.; Peck-Radosavljevic, M.; Leffert, H.L.; Karin, M. Hepatocyte IKKbeta/NF-kappaB inhibits tumor promotion and progression by preventing oxidative stress-driven STAT3 activation. *Cancer Cell* **2010**, *17*, 286–297. [[CrossRef](#)]
- van Hogerlinden, M.; Rozell, B.L.; Toftgard, R.; Sundberg, J.P. Characterization of the progressive skin disease and inflammatory cell infiltrate in mice with inhibited NF-kappaB signaling. *J. Investig. Dermatol.* **2004**, *123*, 101–108. [[CrossRef](#)]
- Capece, D.; Verzella, D.; Tessitore, A.; Alesse, E.; Capalbo, C.; Zazzeroni, F. Cancer secretome and inflammation: The bright and the dark sides of NF-kappaB. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2018**, *78*, 51–61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wang, D.J.; Ratnam, N.M.; Byrd, J.C.; Guttridge, D.C. NF-kappaB functions in tumor initiation by suppressing the surveillance of both innate and adaptive immune cells. *Cell Rep.* **2014**, *9*, 90–103. [[CrossRef](#)]
- Hopewell, E.L.; Zhao, W.; Fulp, W.J.; Bronk, C.C.; Lopez, A.S.; Massengill, M.; Antonia, S.; Celis, E.; Haura, E.B.; Enkemann, S.A.; et al. Lung tumor NF-kappaB signaling promotes T cell-mediated immune surveillance. *J. Clin. Investig.* **2013**, *123*, 2509–2522. [[CrossRef](#)]
- Ji, Z.; He, L.; Regev, A.; Struhl, K. Inflammatory regulatory network mediated by the joint action of NF-kB, STAT3, and AP-1 factors is involved in many human cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 9453–9462. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gowrishankar, K.; Gunatilake, D.; Gallagher, S.J.; Tiffen, J.; Rizos, H.; Hersey, P. Inducible but not constitutive expression of PD-L1 in human melanoma cells is dependent on activation of NF-kappaB. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0123410. [[CrossRef](#)]
- Lim, S.O.; Li, C.W.; Xia, W.; Cha, J.H.; Chan, L.C.; Wu, Y.; Chang, S.S.; Lin, W.C.; Hsu, J.M.; Hsu, Y.H.; et al. Deubiquitination and Stabilization of PD-L1 by CSN5. *Cancer Cell* **2016**, *30*, 925–939. [[CrossRef](#)]
- Larionova, I.; Tuguzbaeva, G.; Ponomaryova, A.; Stakheyeva, M.; Cherdyntseva, N.; Pavlov, V.; Choinzonov, E.; Kzhyshkowska, J. Tumor-Associated Macrophages in Human Breast, Colorectal, Lung, Ovarian and Prostate Cancers. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 566511. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wang, N.; Liang, H.; Zen, K. Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 614. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Mantovani, A.; Marchesi, F.; Malesci, A.; Laghi, L.; Allavena, P. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2017**, *14*, 399–416. [[CrossRef](#)]
- Biswas, S.K.; Lewis, C.E. NF-kappaB as a central regulator of macrophage function in tumors. *J. Leukoc. Biol.* **2010**, *88*, 877–884. [[CrossRef](#)]

19. Porta, C.; Rimoldi, M.; Raes, G.; Brys, L.; Ghezzi, P.; Di Liberto, D.; Dieli, F.; Ghisletti, S.; Natoli, G.; De Baetselier, P.; et al. Tolerance and M2 (alternative) macrophage polarization are related processes orchestrated by p50 nuclear factor kappaB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 14978–14983. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Saccani, A.; Schioppa, T.; Porta, C.; Biswas, S.K.; Nebuloni, M.; Vago, L.; Bottazzi, B.; Colombo, M.P.; Mantovani, A.; Sica, A. p50 nuclear factor-kappaB overexpression in tumor-associated macrophages inhibits M1 inflammatory responses and antitumor resistance. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 11432–11440. [[CrossRef](#)]
21. Caamaño, J.; Alexander, J.; Craig, L.; Bravo, R.; Hunter, C.A. The NF-kappa B family member RelB is required for innate and adaptive immunity to *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* **1999**, *163*, 4453–4461.
22. Gasparini, C.; Foxwell, B.M.; Feldmann, M. RelB/p50 regulates TNF production in LPS-stimulated dendritic cells and macrophages. *Cytokine* **2013**, *61*, 736–740. [[CrossRef](#)]
23. Li, D.; Beisswenger, C.; Herr, C.; Hellberg, J.; Han, G.; Zakharkina, T.; Voss, M.; Wiewrodt, R.; Bohle, R.M.; Menger, M.D.; et al. Myeloid cell RelA/p65 promotes lung cancer proliferation through Wnt/beta-catenin signaling in murine and human tumor cells. *Oncogene* **2014**, *33*, 1239–1248. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Greten, F.R.; Eckmann, L.; Greten, T.F.; Park, J.M.; Li, Z.W.; Egan, L.J.; Kagnoff, M.F.; Karin, M. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* **2004**, *118*, 285–296. [[CrossRef](#)]
25. Li, L.; Han, L.; Sun, F.; Zhou, J.; Ohaegbulam, K.C.; Tang, X.; Zang, X.; Steinbrecher, K.A.; Qu, Z.; Xiao, G. NF-kappaB RelA renders tumor-associated macrophages resistant to and capable of directly suppressing CD8(+) T cells for tumor promotion. *Oncoimmunology* **2018**, *7*, e1435250. [[CrossRef](#)]
26. Hagemann, T.; Wilson, J.; Kulbe, H.; Li, N.F.; Leinster, D.A.; Charles, K.; Klemm, F.; Pukrop, T.; Binder, C.; Balkwill, F.R. Macrophages Induce Invasiveness of Epithelial Cancer Cells Via NF-κB and JNK. *J. Immunol.* **2005**, *175*, 1197–1205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Hagemann, T.; Lawrence, T.; McNeish, I.; Charles, K.A.; Kulbe, H.; Thompson, R.G.; Robinson, S.C.; Balkwill, F.R. “Re-educating” tumor-associated macrophages by targeting NF-kappaB. *J. Exp. Med.* **2008**, *205*, 1261–1268. [[CrossRef](#)]
28. Achyut, B.R.; Angara, K.; Jain, M.; Borin, T.F.; Rashid, M.H.; Iskander, A.S.M.; Ara, R.; Kolhe, R.; Howard, S.; Venugopal, N.; et al. Canonical NFκB signaling in myeloid cells is required for the glioblastoma growth. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 13754. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Neumann, T.; Canli, Ö.; Greten, F.R. Canonical NF-κB signaling in myeloid cells promotes lung metastasis in a mouse breast cancer model. *Oncotarget* **2018**, *9*, 16775–16791. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Mancino, A.; Lawrence, T. NF-κB and tumor-associated macrophages. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2010**, *16*, 784–789. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Connelly, L.; Barham, W.; Onishko, H.M.; Chen, L.; Sherrill, T.P.; Zabuawala, T.; Ostrowski, M.C.; Blackwell, T.S.; Yull, F.E. NF-kappaB activation within macrophages leads to an anti-tumor phenotype in a mammary tumor lung metastasis model. *Breast Cancer Res.* **2011**, *13*, R83. [[CrossRef](#)]
32. Yang, J.; Hawkins, O.E.; Barham, W.; Gilchuk, P.; Boothby, M.; Ayers, G.D.; Joyce, S.; Karin, M.; Yull, F.E.; Richmond, A. Myeloid IKKbeta promotes antitumor immunity by modulating CCL11 and the innate immune response. *Cancer Res.* **2014**, *74*, 7274–7284. [[CrossRef](#)]
33. Yang, J.; Kantrow, S.; Sai, J.; Hawkins, O.; Boothby, M.; Ayers, G.D.; Young, E.; Demicco, E.; Lazar, A.; Lev, D.; et al. INK4a/ARF inactivation with activation of the NF-κB/IL-6 pathway is sufficient to drive the development and growth of angiosarcoma. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 4682–4695. [[CrossRef](#)]
34. Abram, C.L.; Roberge, G.L.; Hu, Y.; Lowell, C.A. Comparative analysis of the efficiency and specificity of myeloid-Cre deleting strains using ROSA-EYFP reporter mice. *J. Immunol. Methods* **2014**, *408*, 89–100. [[CrossRef](#)]
35. Suresh, R.; Barakat, D.J.; Barberi, T.; Zheng, L.; Jaffee, E.; Pienta, K.J.; Friedman, A.D. NF-kappaB p50-deficient immature myeloid cell (p50-IMC) adoptive transfer slows the growth of murine prostate and pancreatic ductal carcinoma. *J. Immunother. Cancer* **2020**, *8*. [[CrossRef](#)]
36. Wang, C.; Hu, Z.; Zhu, Z.; Zhang, X.; Wei, Z.; Zhang, Y.; Hu, D.; Cai, Q. The MSHA strain of *Pseudomonas aeruginosa* (PA-MSHA) inhibits gastric carcinoma progression by inducing M1 macrophage polarization. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelop. Biol. Med.* **2016**, *37*, 6913–6921. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Tan, H.Y.; Wang, N.; Man, K.; Tsao, S.W.; Che, C.M.; Feng, Y. Autophagy-induced RelB/p52 activation mediates tumour-associated macrophage repolarisation and suppression of hepatocellular carcinoma by natural compound baicalin. *Cell Death Dis.* **2015**, *6*, e1942. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Veglia, F.; Perego, M.; Gabrilovich, D. Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nat. Immunol.* **2018**, *19*, 108–119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Law, A.M.K.; Valdes-Mora, F.; Gallego-Ortega, D. Myeloid-Derived Suppressor Cells as a Therapeutic Target for Cancer. *Cells* **2020**, *9*, 561. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Srivastava, M.K.; Zhu, L.; Harris-White, M.; Kar, U.K.; Huang, M.; Johnson, M.F.; Lee, J.M.; Elashoff, D.; Strieter, R.; Dubinett, S.; et al. Myeloid suppressor cell depletion augments antitumor activity in lung cancer. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e40677. [[CrossRef](#)]
41. Stromnes, I.M.; Brockenbrough, J.S.; Izeradjene, K.; Carlson, M.A.; Cuevas, C.; Simmons, R.M.; Greenberg, P.D.; Hingorani, S.R. Targeted depletion of an MDSC subset unmasks pancreatic ductal adenocarcinoma to adaptive immunity. *Gut* **2014**, *63*, 1769–1781. [[CrossRef](#)]

42. Condamine, T.; Gabrilovich, D.I. Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function. *Trends Immunol.* **2011**, *32*, 19–25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Flores, R.R.; Clauson, C.L.; Cho, J.; Lee, B.C.; McGowan, S.J.; Baker, D.J.; Niedernhofer, L.J.; Robbins, P.D. Expansion of myeloid-derived suppressor cells with aging in the bone marrow of mice through a NF-kappaB-dependent mechanism. *Aging Cell* **2017**, *16*, 480–487. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Hong, E.H.; Chang, S.Y.; Lee, B.R.; Kim, Y.S.; Lee, J.M.; Kang, C.Y.; Kweon, M.N.; Ko, H.J. Blockade of Myd88 signaling induces antitumor effects by skewing the immunosuppressive function of myeloid-derived suppressor cells. *Int. J. Cancer J. Int. Du Cancer* **2013**, *132*, 2839–2848. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Litijos, J.F.; Auffray, C.; Alby-Laurent, F.; Rousseau, C.; Merdji, H.; Bonilla, N.; Toubiana, J.; Belaidouni, N.; Mira, J.P.; Lucas, B.; et al. Sepsis-induced expansion of granulocytic myeloid-derived suppressor cells promotes tumour growth through Toll-like receptor 4. *J. Pathol.* **2016**, *239*, 473–483. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Hu, X.; Li, B.; Li, X.; Zhao, X.; Wan, L.; Lin, G.; Yu, M.; Wang, J.; Jiang, X.; Feng, W.; et al. Transmembrane TNF-alpha promotes suppressive activities of myeloid-derived suppressor cells via TNFR2. *J. Immunol.* **2014**, *192*, 1320–1331. [[CrossRef](#)]
47. Porta, C.; Consonni, F.M.; Morlacchi, S.; Sangaletti, S.; Bleve, A.; Totaro, M.G.; Larghi, P.; Rimoldi, M.; Tripodo, C.; Strauss, L.; et al. Tumor-Derived Prostaglandin E2 Promotes p50 NF-kappaB-Dependent Differentiation of Monocytic MDSCs. *Cancer Res.* **2020**, *80*, 2874–2888. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Li, T.; Li, X.; Zamani, A.; Wang, W.; Lee, C.N.; Li, M.; Luo, G.; Eller, E.; Sun, H.; Ghosh, S.; et al. c-Rel is a myeloid checkpoint for cancer immunotherapy. *Nat. Cancer* **2020**, *1*, 507–517. [[CrossRef](#)]
49. Yu, J.; Wang, Y.; Yan, F.; Zhang, P.; Li, H.; Zhao, H.; Yan, C.; Yan, F.; Ren, X. Noncanonical NF-kB Activation Mediates STAT3-stimulated IDO Upregulation in Myeloid-Derived Suppressor Cells in Breast Cancer. *J. Immunol.* **2014**, *193*, 2574–2586. [[CrossRef](#)]
50. Ibrahim, S.A.; Kulshrestha, A.; Katara, G.K.; Riehl, V.; Sahoo, M.; Beaman, K.D. Cancer-associated V-ATPase induces delayed apoptosis of protumorigenic neutrophils. *Mol. Oncol.* **2020**, *14*, 590–610. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Zhang, X.; Shi, H.; Yuan, X.; Jiang, P.; Qian, H.; Xu, W. Tumor-derived exosomes induce N2 polarization of neutrophils to promote gastric cancer cell migration. *Mol. Cancer* **2018**, *17*, 146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. He, M.; Peng, A.; Huang, X.Z.; Shi, D.C.; Wang, J.C.; Zhao, Q.; Lin, H.; Kuang, D.M.; Ke, P.F.; Lao, X.M. Peritumoral stromal neutrophils are essential for c-Met-elicited metastasis in human hepatocellular carcinoma. *Oncoimmunology* **2016**, *5*, e1219828. [[CrossRef](#)]
53. Li, X.F.; Chen, D.P.; Ouyang, F.Z.; Chen, M.M.; Wu, Y.; Kuang, D.M.; Zheng, L. Increased autophagy sustains the survival and pro-tumorigenic effects of neutrophils in human hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* **2015**, *62*, 131–139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Lecot, P.; Sarabi, M.; Pereira Abrantes, M.; Mussard, J.; Koenderman, L.; Caux, C.; Bendriss-Vermare, N.; Michallet, M.-C. Neutrophil Heterogeneity in Cancer: From Biology to Therapies. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 2155. [[CrossRef](#)]
55. Wculek, S.K.; Cueto, F.J.; Mujal, A.M.; Melero, I.; Krummel, M.F.; Sancho, D. Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **2020**, *20*, 7–24. [[CrossRef](#)]
56. Bottcher, J.P.; Reis e Sousa, C. The Role of Type 1 Conventional Dendritic Cells in Cancer Immunity. *Trends Cancer* **2018**, *4*, 784–792. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Hubert, M.; Gobbi, E.; Couillault, C.; Manh, T.V.; Doffin, A.C.; Berthet, J.; Rodriguez, C.; Ollion, V.; Kielbassa, J.; Sajous, C.; et al. IFN-III is selectively produced by cDC1 and predicts good clinical outcome in breast cancer. *Sci. Immunol.* **2020**, *5*. [[CrossRef](#)]
58. Salmon, H.; Idoyaga, J.; Rahman, A.; Leboeuf, M.; Remark, R.; Jordan, S.; Casanova-Acebes, M.; Khudoynazarova, M.; Agudo, J.; Tung, N.; et al. Expansion and Activation of CD103(+) Dendritic Cell Progenitors at the Tumor Site Enhances Tumor Responses to Therapeutic PD-L1 and BRAF Inhibition. *Immunity* **2016**, *44*, 924–938. [[CrossRef](#)]
59. Binnewies, M.; Mujal, A.M.; Pollack, J.L.; Combes, A.J.; Hardison, E.A.; Barry, K.C.; Tsui, J.; Ruhland, M.K.; Kersten, K.; Abushawish, M.A.; et al. Unleashing Type-2 Dendritic Cells to Drive Protective Antitumor CD4(+) T Cell Immunity. *Cell* **2019**, *177*, 556–571.e516. [[CrossRef](#)]
60. Mitchell, D.; Chintala, S.; Dey, M. Plasmacytoid dendritic cell in immunity and cancer. *J. Neuroimmunol.* **2018**, *322*, 63–73. [[CrossRef](#)]
61. Sisirak, V.; Faget, J.; Gobert, M.; Goutagny, N.; Vey, N.; Treilleux, I.; Renaudineau, S.; Poyet, G.; Labidi-Galy, S.I.; Goddard-Leon, S.; et al. Impaired IFN-alpha production by plasmacytoid dendritic cells favors regulatory T-cell expansion that may contribute to breast cancer progression. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 5188–5197. [[CrossRef](#)]
62. Yu, H.; Lin, L.; Zhang, Z.; Zhang, H.; Hu, H. Targeting NF-kappaB pathway for the therapy of diseases: Mechanism and clinical study. *Signal. Transduct. Target.* **2020**, *5*, 209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Ouaz, F.; Arron, J.; Zheng, Y.; Choi, Y.; Beg, A.A. Dendritic cell development and survival require distinct NF-kappaB subunits. *Immunity* **2002**, *16*, 257–270. [[CrossRef](#)]
64. Hofer, S.; Rescigno, M.; Granucci, F.; Citterio, S.; Francolini, M.; Ricciardi-Castagnoli, P. Differential activation of NF-kappa B subunits in dendritic cells in response to Gram-negative bacteria and to lipopolysaccharide. *Microbes Infect.* **2001**, *3*, 259–265. [[CrossRef](#)]
65. Rescigno, M.; Martino, M.; Sutherland, C.L.; Gold, M.R.; Ricciardi-Castagnoli, P. Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. *J. Exp. Med.* **1998**, *188*, 2175–2180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

66. O’Keeffe, M.; Grumont, R.J.; Hochrein, H.; Fuchsberger, M.; Gugasyan, R.; Vremec, D.; Shortman, K.; Gerondakis, S. Distinct roles for the NF-kappaB1 and c-Rel transcription factors in the differentiation and survival of plasmacytoid and conventional dendritic cells activated by TLR-9 signals. *Blood* **2005**, *106*, 3457–3464. [[CrossRef](#)]
67. Grumont, R.; Hochrein, H.; O’Keeffe, M.; Gugasyan, R.; White, C.; Caminschi, I.; Cook, W.; Gerondakis, S. c-Rel regulates interleukin 12 p70 expression in CD8(+) dendritic cells by specifically inducing p35 gene transcription. *J. Exp. Med.* **2001**, *194*, 1021–1032. [[CrossRef](#)]
68. Wu, L.; D’Amico, A.; Winkel, K.D.; Suter, M.; Lo, D.; Shortman, K. RelB Is Essential for the Development of Myeloid-Related CD8 α [−] Dendritic Cells but Not of Lymphoid-Related CD8 α ⁺ Dendritic Cells. *Immunity* **1998**, *9*, 839–847. [[CrossRef](#)]
69. Castiglioni, P.; Janssen, E.M.; Prilliman, K.R.; Gerloni, M.; Schoenberger, S.; Zanetti, M. Cross-priming is under control of the relB gene. *Scand J. Immunol.* **2002**, *56*, 219–223. [[CrossRef](#)]
70. Katakam, A.K.; Brightbill, H.; Franci, C.; Kung, C.; Nunez, V.; Jones, C.; Peng, I.; Jeet, S.; Wu, L.C.; Mellman, I.; et al. Dendritic cells require NIK for CD40-dependent cross-priming of CD8⁺ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 14664–14669. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Speirs, K.; Lieberman, L.; Caamano, J.; Hunter, C.A.; Scott, P. Cutting edge: NF-kappa B2 is a negative regulator of dendritic cell function. *J. Immunol.* **2004**, *172*, 752–756. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Shih, V.F.; Davis-Turak, J.; Macal, M.; Huang, J.Q.; Ponomarenko, J.; Kearns, J.D.; Yu, T.; Fagerlund, R.; Asagiri, M.; Zuniga, E.I.; et al. Control of RelB during dendritic cell activation integrates canonical and noncanonical NF-kappaB pathways. *Nat. Immunol.* **2012**, *13*, 1162–1170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Hayden, M.S. A less-canonical, canonical NF-kappaB pathway in DCs. *Nat. Immunol.* **2012**, *13*, 1139–1141. [[CrossRef](#)]
74. Baratin, M.; Foray, C.; Demaria, O.; Habbedine, M.; Pollet, E.; Maurizio, J.; Verthuy, C.; Davanture, S.; Azukizawa, H.; Flores-Langarica, A.; et al. Homeostatic NF-kappaB Signaling in Steady-State Migratory Dendritic Cells Regulates Immune Homeostasis and Tolerance. *Immunity* **2015**, *42*, 627–639. [[CrossRef](#)]
75. Tas, S.W.; Vervoordeltonk, M.J.; Hajji, N.; Schuitemaker, J.H.; van der Sluijs, K.F.; May, M.J.; Ghosh, S.; Kapsenberg, M.L.; Tak, P.P.; de Jong, E.C. Noncanonical NF-kappaB signaling in dendritic cells is required for indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) induction and immune regulation. *Blood* **2007**, *110*, 1540–1549. [[CrossRef](#)]
76. Sharma, M.D.; Baban, B.; Chandler, P.; Hou, D.Y.; Singh, N.; Yagita, H.; Azuma, M.; Blazar, B.R.; Mellor, A.L.; Munn, D.H. Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Clin. Investig.* **2007**, *117*, 2570–2582. [[CrossRef](#)]
77. Karyampudi, L.; Lamichhane, P.; Krempski, J.; Kalli, K.R.; Behrens, M.D.; Vargas, D.M.; Hartmann, L.C.; Janco, J.M.T.; Dong, H.; Hedin, K.E.; et al. PD-1 Blunts the Function of Ovarian Tumor-Infiltrating Dendritic Cells by Inactivating NF- κ B. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 239–250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Hou, Y.; Liang, H.; Rao, E.; Zheng, W.; Huang, X.; Deng, L.; Zhang, Y.; Yu, X.; Xu, M.; Mauceri, H.; et al. Non-canonical NF-kappaB Antagonizes STING Sensor-Mediated DNA Sensing in Radiotherapy. *Immunity* **2018**, *49*, 490–503.e494. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Lee, J.M.; Mahtabifard, A.; Yamada, R.; Crystal, R.G.; Korst, R.J. Adenovirus vector-mediated overexpression of a truncated form of the p65 nuclear factor kappa B cDNA in dendritic cells enhances their function resulting in immune-mediated suppression of preexisting murine tumors. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2002**, *8*, 3561–3569.
80. Dougan, S.K.; Dougan, M. Regulation of innate and adaptive antitumor immunity by IAP antagonists. *Immunotherapy* **2018**, *10*, 787–796. [[CrossRef](#)]
81. Garris, C.S.; Arlauckas, S.P.; Kohler, R.H.; Trefny, M.P.; Garren, S.; Piot, C.; Engblom, C.; Pfirschke, C.; Siwicki, M.; Gungabeesoon, J.; et al. Successful Anti-PD-1 Cancer Immunotherapy Requires T Cell-Dendritic Cell Crosstalk Involving the Cytokines IFN- γ and IL-12. *Immunity* **2018**, *49*, 1148–1161.e1147. [[CrossRef](#)]
82. Javaid, N.; Choi, S. Toll-like Receptors from the Perspective of Cancer Treatment. *Cancers* **2020**, *12*, 297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Urban-Wojciuk, Z.; Khan, M.M.; Oyler, B.L.; Fahraeus, R.; Marek-Trzonkowska, N.; Nita-Lazar, A.; Hupp, T.R.; Goodlett, D.R. The Role of TLRs in Anti-cancer Immunity and Tumor Rejection. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 2388. [[CrossRef](#)]
84. Chiossone, L.; Dumas, P.-Y.; Vienne, M.; Vivier, E. Natural killer cells and other innate lymphoid cells in cancer. *Nat. Rev. Immunol.* **2018**, *18*, 671–688. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Pandey, R.; DeStephan, C.M.; Madge, L.A.; May, M.J.; Orange, J.S. NKp30 ligation induces rapid activation of the canonical NF-kappaB pathway in NK cells. *J. Immunol.* **2007**, *179*, 7385–7396. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Kwon, H.-J.; Choi, G.-E.; Ryu, S.; Kwon, S.J.; Kim, S.C.; Booth, C.; Nichols, K.E.; Kim, H.S. Stepwise phosphorylation of p65 promotes NF- κ B activation and NK cell responses during target cell recognition. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 11686. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Gross, O.; Grupp, C.; Steinberg, C.; Zimmermann, S.; Strasser, D.; Hanneschläger, N.; Reindl, W.; Jonsson, H.; Huo, H.; Littman, D.R.; et al. Multiple ITAM-coupled NK-cell receptors engage the Bcl10/Malt1 complex via Carma1 for NF- κ B and MAPK activation to selectively control cytokine production. *Blood* **2008**, *112*, 2421–2428. [[CrossRef](#)]
88. Jyothi, M.D.; Khar, A. Regulation of CD40L expression on natural killer cells by interleukin-12 and interferon γ : Its role in the elicitation of an effective antitumor immune response. *Cancer Immunol. Immunother.* **2000**, *49*, 563–572. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Chaix, J.; Tessmer, M.S.; Hoebe, K.; Fuseri, N.; Ryffel, B.; Dalod, M.; Alexopoulou, L.; Beutler, B.; Brossay, L.; Vivier, E.; et al. Cutting edge: Priming of NK cells by IL-18. *J. Immunol.* **2008**, *181*, 1627–1631. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

90. Ardolino, M.; Azimi, C.S.; Iannello, A.; Trevino, T.N.; Horan, L.; Zhang, L.; Deng, W.; Ring, A.M.; Fischer, S.; Garcia, K.C.; et al. Cytokine therapy reverses NK cell anergy in MHC-deficient tumors. *J. Clin. Investig.* **2014**, *124*, 4781–4794. [[CrossRef](#)]
91. Adachi, O.; Kawai, T.; Takeda, K.; Matsumoto, M.; Tsutsui, H.; Sakagami, M.; Nakanishi, K.; Akira, S. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* **1998**, *9*, 143–150. [[CrossRef](#)]
92. Tato, C.M.; Villarino, A.; Caamaño, J.H.; Boothby, M.; Hunter, C.A. Inhibition of NF- κ B Activity in T and NK Cells Results in Defective Effector Cell Expansion and Production of IFN- γ Required for Resistance to *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* **2003**, *170*, 3139–3146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Xu, Y.; Evaristo, C.; Alegre, M.-L.; Gurbuxani, S.; Kee, B.L. Analysis of GzmbCre as a Model System for Gene Deletion in the Natural Killer Cell Lineage. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0125211. [[CrossRef](#)]
94. Tato, C.M.; Mason, N.; Artis, D.; Shapira, S.; Caamano, J.C.; Bream, J.H.; Liou, H.C.; Hunter, C.A. Opposing roles of NF-kappaB family members in the regulation of NK cell proliferation and production of IFN-gamma. *Int. Immunol.* **2006**, *18*, 505–513. [[CrossRef](#)]
95. Orange, J.S.; Brodeur, S.R.; Jain, A.; Bonilla, F.A.; Schneider, L.C.; Kretschmer, R.; Nurko, S.; Rasmussen, W.L.; Köhler, J.R.; Gellis, S.E.; et al. Deficient natural killer cell cytotoxicity in patients with IKK-gamma/NEMO mutations. *J. Clin. Investig.* **2002**, *109*, 1501–1509. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Pannick, U.; Baumann, B.; Fuchs, S.; Henneke, P.; Rensing-Ehl, A.; Rizzi, M.; Janda, A.; Hese, K.; Schlesier, M.; Holzmann, K.; et al. Deficiency of innate and acquired immunity caused by an IKBKB mutation. *N. Engl. J. Med.* **2013**, *369*, 2504–2514. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Zhou, J.; Zhang, J.; Lichtenheld, M.G.; Meadows, G.G. A role for NF-kappa B activation in perforin expression of NK cells upon IL-2 receptor signaling. *J. Immunol.* **2002**, *169*, 1319–1325. [[CrossRef](#)]
98. Huang, C.; Bi, E.; Hu, Y.; Deng, W.; Tian, Z.; Dong, C.; Hu, Y.; Sun, B. A novel NF-kappaB binding site controls human granzyme B gene transcription. *J. Immunol.* **2006**, *176*, 4173–4181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Ni, J.; Wang, X.; Stojanovic, A.; Zhang, Q.; Wincher, M.; Buhler, L.; Arnold, A.; Correia, M.P.; Winkler, M.; Koch, P.S.; et al. Single-Cell RNA Sequencing of Tumor-Infiltrating NK Cells Reveals that Inhibition of Transcription Factor HIF-1alpha Unleashes NK Cell Activity. *Immunity* **2020**, *52*, 1075–1087. [[CrossRef](#)]
100. Xie, X.; Ma, L.; Zhou, Y.; Shen, W.; Xu, D.; Dou, J.; Shen, B.; Zhou, C. Polysaccharide enhanced NK cell cytotoxicity against pancreatic cancer via TLR4/MAPKs/NF-kappaB pathway in vitro/vivo. *Carbohydr. Polym.* **2019**, *225*, 115223. [[CrossRef](#)]
101. Kubo, M.; Morisaki, T.; Matsumoto, K.; Tasaki, A.; Yamanaka, N.; Nakashima, H.; Kuroki, H.; Nakamura, K.; Nakamura, M.; Katano, M. Paclitaxel probably enhances cytotoxicity of natural killer cells against breast carcinoma cells by increasing perforin production. *Cancer Immunol. Immunother.* **2005**, *54*, 468–476. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Wang, X.; Jasinski, D.L.; Medina, J.L.; Spencer, D.M.; Foster, A.E.; Bayle, J.H. Inducible MyD88/CD40 synergizes with IL-15 to enhance antitumor efficacy of CAR-NK cells. *Blood Adv.* **2020**, *4*, 1950–1964. [[CrossRef](#)]
103. Zheng, Y.; Li, Y.; Lian, J.; Yang, H.; Li, F.; Zhao, S.; Qi, Y.; Zhang, Y.; Huang, L. TNF-alpha-induced Tim-3 expression marks the dysfunction of infiltrating natural killer cells in human esophageal cancer. *J. Transl. Med.* **2019**, *17*, 165. [[CrossRef](#)]
104. Yuen, G.J.; Demissie, E.; Pillai, S. B lymphocytes and cancer: A love-hate relationship. *Trends Cancer* **2016**, *2*, 747–757. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Brodt, P.; Gordon, J. Anti-tumor immunity in B lymphocyte-deprived mice. I. Immunity to a chemically induced tumor. *J. Immunol.* **1978**, *121*, 359–362.
106. Ou, Z.; Wang, Y.; Liu, L.; Li, L.; Yeh, S.; Qi, L.; Chang, C. Tumor microenvironment B cells increase bladder cancer metastasis via modulation of the IL-8/androgen receptor (AR)/MMPs signals. *Oncotarget* **2015**, *6*, 26065–26078. [[CrossRef](#)]
107. Ammirante, M.; Luo, J.L.; Grivennikov, S.; Nedospasov, S.; Karin, M. B-cell-derived lymphotoxin promotes castration-resistant prostate cancer. *Nature* **2010**, *464*, 302–305. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. de Visser, K.E.; Korets, L.V.; Coussens, L.M. De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. *Cancer Cell* **2005**, *7*, 411–423. [[CrossRef](#)]
109. Inoue, S.; Leitner, W.W.; Golding, B.; Scott, D. Inhibitory effects of B cells on antitumor immunity. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 7741–7747. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Tadmor, T.; Zhang, Y.; Cho, H.M.; Podack, E.R.; Rosenblatt, J.D. The absence of B lymphocytes reduces the number and function of T-regulatory cells and enhances the anti-tumor response in a murine tumor model. *Cancer Immunol. Immunother.* **2011**, *60*, 609–619. [[CrossRef](#)]
111. Largeot, A.; Pagano, G.; Gonder, S.; Moussay, E.; Paggetti, J. The B-side of Cancer Immunity: The Underrated Tune. *Cells* **2019**, *8*, 449. [[CrossRef](#)]
112. Griss, J.; Bauer, W.; Wagner, C.; Simon, M.; Chen, M.; Grabmeier-Pfistershammer, K.; Maurer-Granofszky, M.; Roka, F.; Penz, T.; Bock, C.; et al. B cells sustain inflammation and predict response to immune checkpoint blockade in human melanoma. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 4186. [[CrossRef](#)]
113. Pinc, A.; Somasundaram, R.; Wagner, C.; Hormann, M.; Karanikas, G.; Jalili, A.; Bauer, W.; Brunner, P.; Grabmeier-Pfistershammer, K.; Gschaider, M.; et al. Targeting CD20 in melanoma patients at high risk of disease recurrence. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **2012**, *20*, 1056–1062. [[CrossRef](#)]
114. Hua, Z.; Hou, B. The role of B cell antigen presentation in the initiation of CD4+ T cell response. *Immunol. Rev.* **2020**, *296*, 24–35. [[CrossRef](#)]

115. Schultz, K.R.; Klarnet, J.P.; Gieni, R.S.; HayGlass, K.T.; Greenberg, P.D. The role of B cells for in vivo T cell responses to a Friend virus-induced leukemia. *Science* **1990**, *249*, 921–923. [[CrossRef](#)]
116. Bruno, T.C.; Ebner, P.J.; Moore, B.L.; Squalls, O.G.; Waugh, K.A.; Eruslanov, E.B.; Singhal, S.; Mitchell, J.D.; Franklin, W.A.; Merrick, D.T.; et al. Antigen-Presenting Intratumoral B Cells Affect CD4(+) TIL Phenotypes in Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Cancer Immunol. Res.* **2017**, *5*, 898–907. [[CrossRef](#)]
117. Wouters, M.C.A.; Nelson, B.H. Prognostic Significance of Tumor-Infiltrating B Cells and Plasma Cells in Human Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2018**, *24*, 6125–6135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Cabrita, R.; Lauss, M.; Sanna, A.; Donia, M.; Skaarup Larsen, M.; Mitra, S.; Johansson, I.; Phung, B.; Harbst, K.; Vallon-Christersson, J.; et al. Tertiary lymphoid structures improve immunotherapy and survival in melanoma. *Nature* **2020**, *577*, 561–565. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. Petitprez, F.; de Reynies, A.; Keung, E.Z.; Chen, T.W.; Sun, C.M.; Calderaro, J.; Jeng, Y.M.; Hsiao, L.P.; Lacroix, L.; Bougouin, A.; et al. B cells are associated with survival and immunotherapy response in sarcoma. *Nature* **2020**, *577*, 556–560. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
120. Helmink, B.A.; Reddy, S.M.; Gao, J.; Zhang, S.; Basar, R.; Thakur, R.; Yizhak, K.; Sade-Feldman, M.; Blando, J.; Han, G.; et al. B cells and tertiary lymphoid structures promote immunotherapy response. *Nature* **2020**, *577*, 549–555. [[CrossRef](#)]
121. Milanovic, M.; Heise, N.; De Silva, N.S.; Anderson, M.M.; Silva, K.; Carette, A.; Orelli, F.; Bhagat, G.; Klein, U. Differential requirements for the canonical NF-kappaB transcription factors c-REL and RELA during the generation and activation of mature B cells. *Immunol. Cell Biol.* **2017**, *95*, 261–271. [[CrossRef](#)]
122. Pasparakis, M.; Schmidt-Supprian, M.; Rajewsky, K. IkappaB kinase signaling is essential for maintenance of mature B cells. *J. Exp. Med.* **2002**, *196*, 743–752. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Heise, N.; De Silva, N.S.; Silva, K.; Carette, A.; Simonetti, G.; Pasparakis, M.; Klein, U. Germinal center B cell maintenance and differentiation are controlled by distinct NF-kappaB transcription factor subunits. *J. Exp. Med.* **2014**, *211*, 2103–2118. [[CrossRef](#)]
124. De Silva, N.S.; Anderson, M.M.; Carette, A.; Silva, K.; Heise, N.; Bhagat, G.; Klein, U. Transcription factors of the alternative NF-kappaB pathway are required for germinal center B-cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 9063–9068. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Almaden, J.V.; Liu, Y.C.; Yang, E.; Otero, D.C.; Birnbaum, H.; Davis-Turak, J.; Asagiri, M.; David, M.; Goldrath, A.W.; Hoffmann, A. B-cell survival and development controlled by the coordination of NF-kappaB family members RelB and cRel. *Blood* **2016**, *127*, 1276–1286. [[CrossRef](#)]
126. Pages, F.; Berger, A.; Camus, M.; Sanchez-Cabo, F.; Costes, A.; Molidor, R.; Mlecnik, B.; Kirilovsky, A.; Nilsson, M.; Damotte, D.; et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *353*, 2654–2666. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Barnes, T.A.; Amir, E. HYPE or HOPE: The prognostic value of infiltrating immune cells in cancer. *Br. J. Cancer* **2017**, *117*, 451–460. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
128. Togashi, Y.; Shitara, K.; Nishikawa, H. Regulatory T cells in cancer immunosuppression - implications for anticancer therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2019**, *16*, 356–371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
129. deLeeuw, R.J.; Kost, S.E.; Kakal, J.A.; Nelson, B.H. The prognostic value of FoxP3+ tumor-infiltrating lymphocytes in cancer: A critical review of the literature. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2012**, *18*, 3022–3029. [[CrossRef](#)]
130. Voisin, A.; Grinberg-Bleyer, Y. The many-sided contributions of NF-κB to T-cell biology in health and disease. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **2020**. [[CrossRef](#)]
131. Kontgen, F.; Grumont, R.J.; Strasser, A.; Metcalf, D.; Li, R.; Tarlinton, D.; Gerondakis, S. Mice lacking the c-rel proto-oncogene exhibit defects in lymphocyte proliferation, humoral immunity, and interleukin-2 expression. *Genes Dev.* **1995**, *9*, 1965–1977. [[CrossRef](#)]
132. Sriskantharajah, S.; Belich, M.P.; Papoutsopoulou, S.; Janzen, J.; Tybulewicz, V.; Seddon, B.; Ley, S.C. Proteolysis of NF-kappaB1 p105 is essential for T cell antigen receptor-induced proliferation. *Nat. Immunol.* **2009**, *10*, 38–47. [[CrossRef](#)]
133. Shifrut, E.; Carnevale, J.; Tobin, V.; Roth, T.L.; Woo, J.M.; Bui, C.T.; Li, P.J.; Diolaiti, M.E.; Ashworth, A.; Marson, A. Genome-wide CRISPR Screens in Primary Human T Cells Reveal Key Regulators of Immune Function. *Cell* **2018**, *175*, 1958–1971.e1915. [[CrossRef](#)]
134. Doi, T.S.; Takahashi, T.; Taguchi, O.; Azuma, T.; Obata, Y. NF-kappa B RelA-deficient lymphocytes: Normal development of T cells and B cells, impaired production of IgA and IgG1 and reduced proliferative responses. *J. Exp. Med.* **1997**, *185*, 953–961. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Grumont, R.; Lock, P.; Mollinari, M.; Shannon, F.M.; Moore, A.; Gerondakis, S. The mitogen-induced increase in T cell size involves PKC and NFAT activation of Rel/NF-kappaB-dependent c-myc expression. *Immunity* **2004**, *21*, 19–30. [[CrossRef](#)]
136. Saibil, S.D.; Jones, R.G.; Deenick, E.K.; Liadis, N.; Elford, A.R.; Vainberg, M.G.; Baerg, H.; Woodgett, J.R.; Gerondakis, S.; Ohashi, P.S. CD4⁺ and CD8⁺ T Cell Survival Is Regulated Differentially by Protein Kinase Cθ, c-Rel, and Protein Kinase, B. *J. Immunol.* **2007**, *178*, 2932–2939. [[CrossRef](#)]
137. Ruan, Q.; Kameswaran, V.; Zhang, Y.; Zheng, S.; Sun, J.; Wang, J.; DeVirgiliis, J.; Liou, H.C.; Beg, A.A.; Chen, Y.H. The Th17 immune response is controlled by the Rel-RORgamma-RORgamma T transcriptional axis. *J. Exp. Med.* **2011**, *208*, 2321–2333. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

138. Chen, G.; Hardy, K.; Pagler, E.; Ma, L.; Lee, S.; Gerondakis, S.; Daley, S.; Shannon, M.F. The NF- κ B Transcription Factor c-Rel Is Required for Th17 Effector Cell Development in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Immunol.* **2011**, *187*, 4483–4491. [[CrossRef](#)]
139. Balasubramani, A.; Shibata, Y.; Crawford, G.E.; Baldwin, A.S.; Hatton, R.D.; Weaver, C.T. Modular Utilization of Distal cis-Regulatory Elements Controls Ifng Gene Expression in T Cells Activated by Distinct Stimuli. *Immunity* **2010**, *33*, 35–47. [[CrossRef](#)]
140. Hilliard, B.A.; Mason, N.; Xu, L.; Sun, J.; Lamhamedi-Cherradi, S.-E.; Liou, H.-C.; Hunter, C.; Chen, Y.H. Critical roles of c-Rel in autoimmune inflammation and helper T cell differentiation. *J. Clin. Investig.* **2002**, *110*, 843–850. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
141. Henriksson, J.; Chen, X.; Gomes, T.; Ullah, U.; Meyer, K.B.; Miragaia, R.; Duddy, G.; Pramanik, J.; Yusa, K.; Lahesmaa, R.; et al. Genome-wide CRISPR Screens in T Helper Cells Reveal Pervasive Crosstalk between Activation and Differentiation. *Cell* **2019**, *176*, 882–896.e818. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
142. Jash, A.; Sahoo, A.; Kim, G.-C.; Chae, C.-S.; Hwang, J.-S.; Kim, J.-E.; Im, S.-H. Nuclear factor of activated T cells 1 (NFAT1)-induced permissive chromatin modification facilitates nuclear factor- κ B (NF- κ B)-mediated interleukin-9 (IL-9) transactivation. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 15445–15457. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Xiao, X.; Balasubramanian, S.; Liu, W.; Chu, X.; Wang, H.; Taparowsky, E.J.; Fu, Y.-X.; Choi, Y.; Walsh, M.C.; Li, X.C. OX40 signaling favors the induction of TH9 cells and airway inflammation. *Nat. Immunol.* **2012**, *13*, 981–990. [[CrossRef](#)]
144. Knudson, K.M.; Pritzl, C.J.; Saxena, V.; Altman, A.; Daniels, M.A.; Teixeira, E. NF κ B-Pim-1-Eomesodermin axis is critical for maintaining CD8 T-cell memory quality. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, E1659–E1667. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Beaussant-Cohen, S.; Jaber, F.; Massaad, M.J.; Weeks, S.; Jones, J.; Alosaimi, M.F.; Wallace, J.; Al-Herz, W.; Geha, R.S.; Chou, J. Combined immunodeficiency in a patient with c-Rel deficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2019**, *144*, 606–608.e604. [[CrossRef](#)]
146. Deenick, E.K.; Po, L.; Chapatte, L.; Murakami, K.; Lu, Y.-C.; Elford, A.R.; Saibil, S.D.; Ruland, J.; Gerondakis, S.; Mak, T.W.; et al. c-Rel phenocopies PKC θ but not Bcl-10 in regulating CD8+ T-cell activation versus tolerance. *Eur. J. Immunol.* **2010**, *40*, 867–877. [[CrossRef](#)]
147. Ghosh, P.; Sica, A.; Young, H.A.; Ye, J.; Franco, J.L.; Wiltrout, R.H.; Longo, D.L.; Rice, N.R.; Komschlies, K.L. Alterations in NF kappa B/Rel family proteins in splenic T-cells from tumor-bearing mice and reversal following therapy. *Cancer Res.* **1994**, *54*, 2969–2972.
148. Li, X.; Liu, J.; Park, J.K.; Hamilton, T.A.; Rayman, P.; Klein, E.; Edinger, M.; Tubbs, R.; Bukowski, R.; Finke, J. T cells from renal cell carcinoma patients exhibit an abnormal pattern of kappa B-specific DNA-binding activity: A preliminary report. *Cancer Res.* **1994**, *54*, 5424–5429. [[PubMed](#)]
149. Clavijo, P.E.; Frauwirth, K.A. Anergic CD8+ T Lymphocytes Have Impaired NF- κ B Activation with Defects in p65 Phosphorylation and Acetylation. *J. Immunol.* **2012**, *188*, 1213–1221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
150. Barnes, S.E.; Wang, Y.; Chen, L.; Molinero, L.L.; Gajewski, T.F.; Evaristo, C.; Alegre, M.-L. T cell-NF- κ B activation is required for tumor control in vivo. *J. Immunother. Cancer* **2015**, *3*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
151. Evaristo, C.; Spranger, S.; Barnes, S.E.; Miller, M.L.; Molinero, L.L.; Locke, F.L.; Gajewski, T.F.; Alegre, M.-L. Cutting Edge: Engineering Active IKK β in T Cells Drives Tumor Rejection. *J. Immunol.* **2016**, *196*, 2933–2938. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
152. Giordano, M.; Roncagalli, R.; Bourdely, P.; Chasson, L.; Buferne, M.; Yamasaki, S.; Beyaert, R.; van Loo, G.; Auphan-Anezin, N.; Schmitt-Verhulst, A.-M.; et al. The tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 (TNFAIP3, A20) imposes a brake on antitumor activity of CD8 T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 11115–11120. [[CrossRef](#)]
153. Lu, C.; Klement, J.D.; Smith, A.D.; Yang, D.; Waller, J.L.; Browning, D.D.; Munn, D.H.; Liu, K. p50 suppresses cytotoxic T lymphocyte effector function to regulate tumor immune escape and response to immunotherapy. *J. Immunother. Cancer* **2020**, *8*. [[CrossRef](#)]
154. Tay, R.E.; Richardson, E.K.; Toh, H.C. Revisiting the role of CD4(+) T cells in cancer immunotherapy—new insights into old paradigms. *Cancer Gene* **2020**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
155. Deenick, E.K.; Elford, A.R.; Pellegrini, M.; Hall, H.; Mak, T.W.; Ohashi, P.S. c-Rel but not NF-kappaB1 is important for T regulatory cell development. *Eur. J. Immunol.* **2010**, *40*, 677–681. [[CrossRef](#)]
156. Molinero, L.L.; Yang, J.; Gajewski, T.; Abraham, C.; Farrar, M.A.; Alegre, M.-L. CARMA1 Controls an Early Checkpoint in the Thymic Development of FoxP3⁺ Regulatory T Cells. *J. Immunol.* **2009**, *182*, 6736–6743. [[CrossRef](#)]
157. Isomura, I.; Palmer, S.; Grumont, R.J.; Bunting, K.; Hoyne, G.; Wilkinson, N.; Banerjee, A.; Proietto, A.; Gugasyan, R.; Wu, L.; et al. c-Rel is required for the development of thymic Foxp3+ CD4 regulatory T cells. *J. Exp. Med.* **2009**, *206*, 3001–3014. [[CrossRef](#)]
158. Oh, H.; Grinberg-Bleyer, Y.; Liao, W.; Maloney, D.; Wang, P.; Wu, Z.; Wang, J.; Bhatt, D.M.; Heise, N.; Schmid, R.M.; et al. An NF- κ B Transcription-Factor-Dependent Lineage-Specific Transcriptional Program Promotes Regulatory T Cell Identity and Function. *Immunity* **2017**, *47*, 450–465.e455. [[CrossRef](#)]
159. Di Pilato, M.; Kim, E.Y.; Cadilha, B.L.; Prüßmann, J.N.; Nasrallah, M.N.; Seruggia, D.; Usmani, S.M.; Misale, S.; Zappulli, V.; Carrizosa, E.; et al. Targeting the CBM complex causes Treg cells to prime tumours for immune checkpoint therapy. *Nature* **2019**, *570*, 112–116. [[CrossRef](#)]
160. Rosenbaum, M.; Gewies, A.; Pechloff, K.; Heuser, C.; Engleitner, T.; Gehring, T.; Hartjes, L.; Krebs, S.; Krappmann, D.; Kriegsmann, M.; et al. Bcl10-controlled Malt1 paracaspase activity is key for the immune suppressive function of regulatory T cells. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 2352. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
161. Cheng, L.; Deng, N.; Yang, N.; Zhao, X.; Lin, X. Malt1 Protease Is Critical in Maintaining Function of Regulatory T Cells and May Be a Therapeutic Target for Antitumor Immunity. *J. Immunol.* **2019**, *202*, 3008–3019. [[CrossRef](#)]

162. Heuser, C.; Gotot, J.; Piotrowski, E.C.; Philipp, M.-S.; Courrèges, C.J.F.; Otte, M.S.; Guo, L.; Schmid-Burgk, J.L.; Hornung, V.; Heine, A.; et al. Prolonged IKK β Inhibition Improves Ongoing CTL Antitumor Responses by Incapacitating Regulatory T Cells. *Cell Rep.* **2017**, *21*, 578–586. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. Polesso, F.; Sarker, M.; Anderson, A.; Parker, D.C.; Murray, S.E. Constitutive expression of NF- κ B inducing kinase in regulatory T cells impairs suppressive function and promotes instability and pro-inflammatory cytokine production. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 14779. [[CrossRef](#)]
164. Grinberg-Bleyer, Y.; Caron, R.; Seeley, J.J.; Silva, N.S.D.; Schindler, C.W.; Hayden, M.S.; Klein, U.; Ghosh, S. The Alternative NF- κ B Pathway in Regulatory T Cell Homeostasis and Suppressive Function. *J. Immunol.* **2018**, *200*, 2362–2371. [[CrossRef](#)]
165. Koliesnik, I.O.; Andreas, N.; Thuy, A.; Sreekantapuram, S.; Haenold, R.; Weih, F. Alternative NF-kappaB signaling controls peripheral homeostasis and function of regulatory T cells. *Immunobiology* **2019**, *224*, 687–696. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
166. Li, J.; Chen, S.; Chen, W.; Ye, Q.; Dou, Y.; Xiao, Y.; Zhang, L.; Minze, L.J.; Li, X.C.; Xiao, X. Role of the NF-kappaB Family Member RelB in Regulation of Foxp3(+) Regulatory T Cells In Vivo. *J. Immunol.* **2018**, *200*, 1325–1334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
167. 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. NF- κ B c-Rel Is Crucial for the Regulatory T Cell Immune Checkpoint in Cancer. *Cell* **2017**, *170*, 1096–1108.e1013. [[CrossRef](#)]
168. Gao, F.; Cheng, Q.; Liu, M.D.; Rong, L.; KLiou, C.J.; Zhang, X.Z. Local T regulatory cells depletion by an integrated nanodrug system for efficient chem-immunotherapy of tumor. *Sci. China Chem.* **2019**, *62*, 1230–1244. [[CrossRef](#)]
169. Amato, C.M.; Hintzsche, J.D.; Wells, K.; Applegate, A.; Gorden, N.T.; Vorwald, V.M.; Tobin, R.P.; Nassar, K.; Shellman, Y.G.; Kim, J.; et al. Pre-Treatment Mutational and Transcriptomic Landscape of Responding Metastatic Melanoma Patients to Anti-PD1 Immunotherapy. *Cancers* **2020**, *12*, 1943. [[CrossRef](#)]
170. Grasso, C.S.; Tsoi, J.; Onyshchenko, M.; Abril-Rodriguez, G.; Ross-Macdonald, P.; Wind-Rotolo, M.; Champhekar, A.; Medina, E.; Torrejon, D.Y.; Shin, D.S.; et al. Conserved Interferon-gamma Signaling Drives Clinical Response to Immune Checkpoint Blockade Therapy in Melanoma. *Cancer Cell* **2020**, *38*, 500–515.e503. [[CrossRef](#)]
171. Roh, W.; Chen, P.L.; Reuben, A.; Spencer, C.N.; Prieto, P.A.; Miller, J.P.; Gopalakrishnan, V.; Wang, F.; Cooper, Z.A.; Reddy, S.M.; et al. Integrated molecular analysis of tumor biopsies on sequential CTLA-4 and PD-1 blockade reveals markers of response and resistance. *Sci. Transl. Med.* **2017**, *9*. [[CrossRef](#)]
172. Harlin, H.; Hwang, K.W.; Palucki, D.A.; Kim, O.; Thompson, C.B.; Boothby, M.; Alegre, M.L. CTLA-4 engagement regulates NF-kappaB activation in vivo. *Eur. J. Immunol.* **2002**, *32*, 2095–2104. [[CrossRef](#)]
173. Pioli, C.; Gatta, L.; Frasca, D.; Doria, G. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) inhibits CD28-induced IkappaBalpha degradation and RelA activation. *Eur. J. Immunol.* **1999**, *29*, 856–863. [[CrossRef](#)]
174. Arasanz, H.; Gato-Canas, M.; Zuazo, M.; Ibanez-Vea, M.; Breckpot, K.; Kochan, G.; Escors, D. PD1 signal transduction pathways in T cells. *Oncotarget* **2017**, *8*, 51936–51945. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
175. Jutz, S.; Hennig, A.; Paster, W.; Asrak, O.; Dijanovic, D.; Kellner, F.; Pickl, W.F.; Huppa, J.B.; Leitner, J.; Steinberger, P. A cellular platform for the evaluation of immune checkpoint molecules. *Oncotarget* **2017**, *8*, 64892–64906. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
176. Kamphorst, A.O.; Wieland, A.; Nasti, T.; Yang, S.; Zhang, R.; Barber, D.L.; Konieczny, B.T.; Daugherty, C.Z.; Koenig, L.; Yu, K.; et al. Rescue of exhausted CD8 T cells by PD-1-targeted therapies is CD28-dependent. *Science* **2017**, *355*, 1423–1427. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
177. Shi, L.Z.; Fu, T.; Guan, B.; Chen, J.; Blando, J.M.; Allison, J.P.; Xiong, L.; Subudhi, S.K.; Gao, J.; Sharma, P. Interdependent IL-7 and IFN- γ signalling in T-cell controls tumour eradication by combined α -CTLA-4+ α -PD-1 therapy. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12335. [[CrossRef](#)]
178. Dong, M.B.; Wang, G.; Chow, R.D.; Ye, L.; Zhu, L.; Dai, X.; Park, J.J.; Kim, H.R.; Errami, Y.; Guzman, C.D.; et al. Systematic Immunotherapy Target Discovery Using Genome-Scale In Vivo CRISPR Screens in CD8 T Cells. *Cell* **2019**, *178*, 1189–1204.e1123. [[CrossRef](#)]
179. Li, G.; Boucher, J.C.; Kotani, H.; Park, K.; Zhang, Y.; Shrestha, B.; Wang, X.; Guan, L.; Beatty, N.; Abate-Daga, D.; et al. 4-1BB enhancement of CAR T function requires NF-kappaB and TRAFs. *JCI Insight* **2018**, *3*. [[CrossRef](#)]
180. Philipson, B.I.; O'Connor, R.S.; May, M.J.; June, C.H.; Albelda, S.M.; Milone, M.C. 4-1BB costimulation promotes CAR T cell survival through noncanonical NF-kappaB signaling. *Sci. Signal.* **2020**, *13*. [[CrossRef](#)]
181. Smith, M.; Garcia-Martinez, E.; Pitter, M.R.; Fucikova, J.; Spisek, R.; Zitvogel, L.; Kroemer, G.; Galluzzi, L. Trial Watch: Toll-like receptor agonists in cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* **2018**, *7*, e1526250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
182. Fang, R.; Wang, C.; Jiang, Q.; Lv, M.; Gao, P.; Yu, X.; Mu, P.; Zhang, R.; Bi, S.; Feng, J.M.; et al. NEMO-IKKbeta Are Essential for IRF3 and NF-kappaB Activation in the cGAS-STING Pathway. *J. Immunol.* **2017**, *199*, 3222–3233. [[CrossRef](#)]
183. Hostager, B.S.; Bishop, G.A. CD40-Mediated Activation of the NF-kappaB2 Pathway. *Front. Immunol.* **2013**, *4*, 376. [[CrossRef](#)]
184. Ward-Kavanagh, L.K.; Lin, W.W.; Sedy, J.R.; Ware, C.F. The TNF Receptor Superfamily in Co-stimulating and Co-inhibitory Responses. *Immunity* **2016**, *44*, 1005–1019. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
185. Schaer, D.A.; Hirschhorn-Cymerman, D.; Wolchok, J.D. Targeting tumor-necrosis factor receptor pathways for tumor immunotherapy. *J. Immunother. Cancer* **2014**, *2*, 7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
186. Bhattacharyya, S.; Md Sakib Hossain, D.; Mohanty, S.; Sankar Sen, G.; Chattopadhyay, S.; Banerjee, S.; Chakraborty, J.; Das, K.; Sarkar, D.; Das, T.; et al. Curcumin reverses T cell-mediated adaptive immune dysfunctions in tumor-bearing hosts. *Cell Mol. Immunol.* **2010**, *7*, 306–315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

187. Churchill, M.; Chadburn, A.; Bilinski, R.T.; Bertagnolli, M.M. Inhibition of intestinal tumors by curcumin is associated with changes in the intestinal immune cell profile. *J. Surg. Res.* **2000**, *89*, 169–175. [[CrossRef](#)]
188. Luo, F.; Song, X.; Zhang, Y.; Chu, Y. Low-dose curcumin leads to the inhibition of tumor growth via enhancing CTL-mediated antitumor immunity. *Int. Immunopharmacol.* **2011**, *11*, 1234–1240. [[CrossRef](#)]
189. Shao, Y.; Zhu, W.; Da, J.; Xu, M.; Wang, Y.; Zhou, J.; Wang, Z. Bisdemethoxycurcumin in combination with alpha-PD-L1 antibody boosts immune response against bladder cancer. *Onco Targets* **2017**, *10*, 2675–2683. [[CrossRef](#)]
190. Shiri, S.; Alizadeh, A.M.; Baradaran, B.; Farhanghi, B.; Shanebandi, D.; Khodayari, S.; Khodayari, H.; Tavassoli, A. Dendrosomal curcumin suppresses metastatic breast cancer in mice by changing m1/m2 macrophage balance in the tumor microenvironment. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2015**, *16*, 3917–3922. [[CrossRef](#)]
191. Liu, D.; You, M.; Xu, Y.; Li, F.; Zhang, D.; Li, X.; Hou, Y. Inhibition of curcumin on myeloid-derived suppressor cells is requisite for controlling lung cancer. *Int. Immunopharmacol.* **2016**, *39*, 265–272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
192. Mukherjee, S.; Fried, A.; Hussaini, R.; White, R.; Baidoo, J.; Yalamanchi, S.; Banerjee, P. Phytosomal curcumin causes natural killer cell-dependent repolarization of glioblastoma (GBM) tumor-associated microglia/macrophages and elimination of GBM and GBM stem cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2018**, *37*, 168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
193. Zou, J.Y.; Su, C.H.; Luo, H.H.; Lei, Y.Y.; Zeng, B.; Zhu, H.S.; Chen, Z.G. Curcumin converts Foxp3+ regulatory T cells to T helper 1 cells in patients with lung cancer. *J. Cell Biochem.* **2018**, *119*, 1420–1428. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
194. Chesi, M.; Mirza, N.N.; Garbitt, V.M.; Sharik, M.E.; Dueck, A.C.; Asmann, Y.W.; Akhmetzyanova, I.; Kosiorek, H.E.; Calcinotto, A.; Riggs, D.L.; et al. IAP antagonists induce anti-tumor immunity in multiple myeloma. *Nat. Med.* **2016**, *22*, 1411–1420. [[CrossRef](#)]
195. Kim, D.S.; Dastidar, H.; Zhang, C.; Zemp, F.J.; Lau, K.; Ernst, M.; Rakic, A.; Sikdar, S.; Rajwani, J.; Naumenko, V.; et al. Smac mimetics and oncolytic viruses synergize in driving anticancer T-cell responses through complementary mechanisms. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 344. [[CrossRef](#)]
196. Shono, Y.; Tuckett, A.Z.; Ouk, S.; Liou, H.C.; Altan-Bonnet, G.; Tsai, J.J.; Oyler, J.E.; Smith, O.M.; West, M.L.; Singer, N.V.; et al. A small-molecule c-Rel inhibitor reduces alloactivation of T cells without compromising antitumor activity. *Cancer Discov.* **2014**, *4*, 578–591. [[CrossRef](#)]
197. Schumacher, L.Y.; Vo, D.D.; Garban, H.J.; Comin-Anduix, B.; Owens, S.K.; Dissette, V.B.; Glaspy, J.A.; McBride, W.H.; Bonavida, B.; Economou, J.S.; et al. Immunosenescence of tumor cells to dendritic cell-activated immune responses with the proteasome inhibitor bortezomib (PS-341, Velcade). *J. Immunol.* **2006**, *176*, 4757–4765. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
198. Enzler, T.; Sano, Y.; Choo, M.K.; Cottam, H.B.; Karin, M.; Tsao, H.; Park, J.M. Cell-selective inhibition of NF-kappaB signaling improves therapeutic index in a melanoma chemotherapy model. *Cancer Discov.* **2011**, *1*, 496–507. [[CrossRef](#)]
199. Xiao, Z.; Su, Z.; Han, S.; Huang, J.; Lin, L.; Shuai, X. Dual pH-sensitive nanodrug blocks PD-1 immune checkpoint and uses T cells to deliver NF-kappaB inhibitor for antitumor immunotherapy. *Sci. Adv.* **2020**, *6*, eaay7785. [[CrossRef](#)]
200. Stephan, P.; Lautreite, R.; Voisin, A.; Grinberg-Bleyer, Y. Transcriptional Control of Regulatory T Cells in Cancer: Toward Therapeutic Targeting? *Cancers* **2020**, *12*, 3194. [[CrossRef](#)]
201. Wei, Y.; Zhao, Q.; Gao, Z.; Lao, X.M.; Lin, W.M.; Chen, D.P.; Mu, M.; Huang, C.X.; Liu, Z.Y.; Li, B.; et al. The local immune landscape determines tumor PD-L1 heterogeneity and sensitivity to therapy. *J. Clin. Investig.* **2019**, *129*, 3347–3360. [[CrossRef](#)]
202. Hayakawa, T.; Yaguchi, T.; Kawakami, Y. Enhanced anti-tumor effects of the PD-1 blockade combined with a highly absorptive form of curcumin targeting STAT3. *Cancer Sci.* **2020**, *111*, 4326–4335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
203. Wang, X.; Feng, X.; Wang, J.; Shao, N.; Ji, C.; Ma, D.; Henter, J.I.; Fadeel, B.; Zheng, C. Bortezomib and IL-12 produce synergetic anti-multiple myeloma effects with reduced toxicity to natural killer cells. *Anticancer Drugs* **2014**, *25*, 282–288. [[CrossRef](#)]
204. Thirukkumaran, C.M.; Shi, Z.Q.; Nuovo, G.J.; Lui, J.; Kopciuk, K.A.; Dong, Y.; Mostafa, A.A.; Thakur, S.; Gratton, K.; Yang, A.; et al. Oncolytic immunotherapy and bortezomib synergy improves survival of refractory multiple myeloma in a preclinical model. *Blood Adv.* **2019**, *3*, 797–812. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
205. Guo, X.; Zheng, L.; Jiang, J.; Zhao, Y.; Wang, X.; Shen, M.; Zhu, F.; Tian, R.; Shi, C.; Xu, M.; et al. Blocking NF-kappaB Is Essential for the Immunotherapeutic Effect of Recombinant IL18 in Pancreatic Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2016**, *22*, 5939–5950. [[CrossRef](#)]
206. Beug, S.T.; Tang, V.A.; LaCasse, E.C.; Cheung, H.H.; Beauregard, C.E.; Brun, J.; Nuyens, J.P.; Earl, N.; St-Jean, M.; Holbrook, J.; et al. Smac mimetics and innate immune stimuli synergize to promote tumor death. *Nat. Biotechnol.* **2014**, *32*, 182–190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
207. Beug, S.T.; Beauregard, C.E.; Healy, C.; Sanda, T.; St-Jean, M.; Chabot, J.; Walker, D.E.; Mohan, A.; Earl, N.; Lun, X.; et al. Smac mimetics synergize with immune checkpoint inhibitors to promote tumour immunity against glioblastoma. *Nat. Commun.* **2017**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
208. Petrucci, M.T.; Vozella, F. The Anti-CD38 Antibody Therapy in Multiple Myeloma. *Cells* **2019**, *8*, 1629. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
209. Jelinek, T.; Paiva, B.; Hajek, R. Update on PD-1/PD-L1 Inhibitors in Multiple Myeloma. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 2431. [[CrossRef](#)]
210. Jakubowiak, A.; Offidani, M.; Pegourie, B.; De La Rubia, J.; Garderet, L.; Laribi, K.; Bosi, A.; Marasca, R.; Laubach, J.; Mohrbacher, A.; et al. Randomized phase 2 study: Elotuzumab plus bortezomib/dexamethasone vs. bortezomib/dexamethasone for relapsed/refractory MM. *Blood* **2016**, *127*, 2833–2840. [[CrossRef](#)]
211. Markowitz, J.; Luedke, E.A.; Grignol, V.P.; Hade, E.M.; Paul, B.K.; Mundy-Bosse, B.L.; Brooks, T.R.; Dao, T.V.; Kondalasila, S.V.; Lesinski, G.B.; et al. A phase I trial of bortezomib and interferon-alpha-2b in metastatic melanoma. *J. Immunother.* **2014**, *37*, 55–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

212. Morrish, E.; Brumatti, G.; Silke, J. Future Therapeutic Directions for Smac-Mimetics. *Cells* **2020**, *9*, 406. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
213. Chaturvedi, M.M.; Sung, B.; Yadav, V.R.; Kannappan, R.; Aggarwal, B.B. NF-kappaB addiction and its role in cancer: 'one size does not fit all'. *Oncogene* **2011**, *30*, 1615–1630. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
214. Chau, C.H.; Steeg, P.S.; Figg, W.D. Antibody-drug conjugates for cancer. *Lancet* **2019**, *394*, 793–804. [[CrossRef](#)]
215. Langone, P.; Debata, P.R.; Inigo Jdel, R.; Dolai, S.; Mukherjee, S.; Halat, P.; Mastroianni, K.; Curcio, G.M.; Castellanos, M.R.; Raja, K.; et al. Coupling to a glioblastoma-directed antibody potentiates antitumor activity of curcumin. *Int. J. Cancer. J. Int. Du Cancer* **2014**, *135*, 710–719. [[CrossRef](#)]
216. Langone, P.; Debata, P.R.; Dolai, S.; Curcio, G.M.; Inigo Jdel, R.; Raja, K.; Banerjee, P. Coupling to a cancer cell-specific antibody potentiates tumoricidal properties of curcumin. *Int. J. Cancer J. Int. Du Cancer* **2012**, *131*, E569–E578. [[CrossRef](#)]

Références Bibliographiques

1. Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP, Oltz EM, Stewart V, Mendelsohn M, et al. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell*. 1992 Mar 6;68(5):855–67.
2. St-Pierre C, Trofimov A, Brochu S, Lemieux S, Perreault C. Differential Features of AIRE-Induced and AIRE-Independent Promiscuous Gene Expression in Thymic Epithelial Cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2015 Jul 15;195(2):498–506.
3. Meredith M, Zemmour D, Mathis D, Benoist C. Aire controls gene expression in the thymic epithelium with ordered stochasticity. *Nat Immunol*. 2015 Sep;16(9):942–9.
4. Abramson J, Goldfarb Y. AIRE: From promiscuous molecular partnerships to promiscuous gene expression. *Eur J Immunol*. 2016 Jan;46(1):22–33.
5. Surh CD, Sprent J. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature*. 1994 Nov 3;372(6501):100–3.
6. Holländer GA. Claudins provide a breath of fresh Aire. *Nat Immunol*. 2007 Mar;8(3):234–6.
7. Voll RE, Jimi E, Phillips RJ, Barber DF, Rincon M, Hayday AC, et al. NF- κ B Activation by the Pre-T Cell Receptor Serves as a Selective Survival Signal in T Lymphocyte Development. *Immunity*. 2000 Nov 1;13(5):677–89.
8. Jimi E, Voll RE, Strickland I, Long M, Ghosh S. Differential role of NF- κ B in selection and survival of CD4 and CD8 thymocytes. *Immunity*. 2008 Oct;29(4):523–37.
9. Schmidt-Supprian M, Courtois G, Tian J, Coyle AJ, Israël A, Rajewsky K, et al. Mature T cells depend on signaling through the IKK complex. *Immunity*. 2003 Sep;19(3):377–89.
10. Webb LV, Barbarulo A, Huysentruyt J, Vanden Berghe T, Takahashi N, Ley S, et al. Survival of Single Positive Thymocytes Depends upon Developmental Control of RIPK1 Kinase Signaling by the IKK Complex Independent of NF- κ B. *Immunity*. 2019 Feb 19;50(2):348-361.e4.
11. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:591–619.
12. Call ME, Pyrdol J, Wiedmann M, Wucherpfennig KW. The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex. *Cell*. 2002 Dec 27;111(7):967–79.
13. Samelson LE, Harford JB, Klausner RD. Identification of the components of the murine T cell antigen receptor complex. *Cell*. 1985 Nov;43(1):223–31.

14. Yang YR, Choi JH, Chang JS, Kwon HM, Jang HJ, Ryu SH, et al. Diverse cellular and physiological roles of phospholipase C- γ 1. *Adv Biol Regul.* 2012 Jan;52(1):138–51.
15. Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell.* 1986 Aug 29;46(5):705–16.
16. Gilmore TD, Temin HM. Different localization of the product of the v-rel oncogene in chicken fibroblasts and spleen cells correlates with transformation by REV-T. *Cell.* 1986 Mar 14;44(5):791–800.
17. Naumann M, Nieters A, Hatada EN, Scheidereit C. NF-kappa B precursor p100 inhibits nuclear translocation and DNA binding of NF-kappa B/rel-factors. *Oncogene.* 1993 Aug;8(8):2275–81.
18. Liang C, Zhang M, Sun SC. beta-TrCP binding and processing of NF-kappaB2/p100 involve its phosphorylation at serines 866 and 870. *Cell Signal.* 2006 Aug;18(8):1309–17.
19. Moorthy AK, Savinova OV, Ho JQ, Wang VYF, Vu D, Ghosh G. The 20S proteasome processes NF-kappaB1 p105 into p50 in a translation-independent manner. *EMBO J.* 2006 May 3;25(9):1945–56.
20. Lu C, Klement JD, Smith AD, Yang D, Waller JL, Browning DD, et al. p50 suppresses cytotoxic T lymphocyte effector function to regulate tumor immune escape and response to immunotherapy. *J Immunother Cancer.* 2020 Oct;8(2):e001365.
21. Matsumoto R, Wang D, Blonska M, Li H, Kobayashi M, Pappu B, et al. Phosphorylation of CARMA1 plays a critical role in T Cell receptor-mediated NF-kappaB activation. *Immunity.* 2005 Dec;23(6):575–85.
22. Rueda D, Thome M. Phosphorylation of CARMA1: the link(er) to NF-kappaB activation. *Immunity.* 2005 Dec;23(6):551–3.
23. Sommer K, Guo B, Pomerantz JL, Bandaranayake AD, Moreno-García ME, Ovechkina YL, et al. Phosphorylation of the CARMA1 linker controls NF-kappaB activation. *Immunity.* 2005 Dec;23(6):561–74.
24. Thome M, Weil R. Post-translational modifications regulate distinct functions of CARMA1 and BCL10. *Trends Immunol.* 2007 Jun;28(6):281–8.
25. Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell.* 2008 Feb 8;132(3):344–62.
26. Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S. Crosstalk in NF-kB signaling pathways. *Nat Immunol.* 2011 Jul 19;12(8):695–708.
27. Waterfield MR, Zhang M, Norman LP, Sun SC. NF-kappaB1/p105 regulates lipopolysaccharide-stimulated MAP kinase signaling by governing the stability and function of the Tpl2 kinase. *Mol Cell.* 2003 Mar;11(3):685–94.
28. Sun SC. The noncanonical NF-kB pathway. *Immunol Rev.* 2012 Mar;246(1):125–40.
29. Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NFkB system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2016 May;8(3):227–41.

30. Huang DB, Vu D, Ghosh G. NF-kappaB RelB forms an intertwined homodimer. *Struct Lond Engl* 1993. 2005 Sep;13(9):1365–73.
31. Hoffmann A, Natoli G, Ghosh G. Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene*. 2006 Oct 30;25(51):6706–16.
32. Chen LF, Greene WC. Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004 May;5(5):392–401.
33. Christian F, Smith EL, Carmody RJ. The Regulation of NF-kB Subunits by Phosphorylation. *Cells*. 2016 Mar 18;5(1):E12.
34. Zhao B, Barrera LA, Ersing I, Willox B, Schmidt SCS, Greenfeld H, et al. The NF-kB Genomic Landscape in Lymphoblastoid B-cells. *Cell Rep*. 2014 Sep 11;8(5):1595–606.
35. Oh H, Grinberg-Bleyer Y, Liao W, Maloney D, Wang P, Wu Z, et al. An NF-kB transcription factor-dependent, lineage specific transcriptional program promotes regulatory T cell identity and function. *Immunity*. 2017 Sep 19;47(3):450-465.e5.
36. Hoffmann A, Baltimore D. Circuitry of nuclear factor kappaB signaling. *Immunol Rev*. 2006 Apr;210:171–86.
37. Hoffmann A, Levchenko A, Scott ML, Baltimore D. The IkappaB-NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation. *Science*. 2002 Nov 8;298(5596):1241–5.
38. Behar M, Hoffmann A. Understanding the temporal codes of intra-cellular signals. *Curr Opin Genet Dev*. 2010 Dec;20(6):684–93.
39. Adelaja A, Taylor B, Sheu KM, Liu Y, Luecke S, Hoffmann A. Six distinct NFkB signaling codons convey discrete information to distinguish stimuli and enable appropriate macrophage responses. *Immunity*. 2021 May 11;54(5):916-930.e7.
40. Krikos A, Laherty CD, Dixit VM. Transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha-inducible zinc finger protein, A20, is mediated by kappa B elements. *J Biol Chem*. 1992 Sep 5;267(25):17971–6.
41. Wertz IE, O'Rourke KM, Zhou H, Eby M, Aravind L, Seshagiri S, et al. De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature*. 2004 Aug 5;430(7000):694–9.
42. Lork M, Verhelst K, Beyaert R. CYLD, A20 and OTULIN deubiquitinases in NF-kB signaling and cell death: so similar, yet so different. *Cell Death Differ*. 2017 Jul;24(7):1172–83.
43. Bours V, Franzoso G, Azarenko V, Park S, Kanno T, Brown K, et al. The oncoprotein Bcl-3 directly transactivates through kappa B motifs via association with DNA-binding p50B homodimers. *Cell*. 1993 Mar 12;72(5):729–39.
44. Barnabei L, Laplantine E, Mbongo W, Rieux-Laucat F, Weil R. NF-kB: At the Borders of Autoimmunity and Inflammation. *Front Immunol [Internet]*. 2021 [cited 2022 Jul 13];12. Available from: <https://www.readcube.com/articles/10.3389%2Ffimmu.2021.716469>

45. Boztug H, Hirschmugl T, Holter W, Lakatos K, Kager L, Trapin D, et al. NF- κ B1 Haploinsufficiency Causing Immunodeficiency and EBV-Driven Lymphoproliferation. *J Clin Immunol*. 2016 Aug;36(6):533–40.
46. Lorenzini T, Fliegauf M, Klammer N, Frede N, Proietti M, Bulashevskaya A, et al. Characterization of the clinical and immunologic phenotype and management of 157 individuals with 56 distinct heterozygous NFKB1 mutations. *J Allergy Clin Immunol*. 2020 Oct;146(4):901–11.
47. Mandola AB, Sharfe N, Nagdi Z, Dadi H, Vong L, Merico D, et al. Combined immunodeficiency caused by a novel homozygous NFKB1 mutation. *J Allergy Clin Immunol*. 2021 Feb;147(2):727–733.e2.
48. Dieli-Crimi R, Martínez-Gallo M, Franco-Jarava C, Antolin M, Blasco L, Paramonov I, et al. Th1-skewed profile and excessive production of proinflammatory cytokines in a NFKB1-deficient patient with CVID and severe gastrointestinal manifestations. *Clin Immunol Orlando Fla*. 2018 Oct;195:49–58.
49. Kaustio M, Haapaniemi E, Göös H, Hautala T, Park G, Syrjänen J, et al. Damaging heterozygous mutations in NFKB1 lead to diverse immunologic phenotypes. *J Allergy Clin Immunol*. 2017 Sep;140(3):782–96.
50. Tuijnenburg P, Lango Allen H, Burns SO, Greene D, Jansen MH, Staples E, et al. Loss-of-function nuclear factor κ B subunit 1 (NFKB1) variants are the most common monogenic cause of common variable immunodeficiency in Europeans. *J Allergy Clin Immunol*. 2018 Oct;142(4):1285–96.
51. Kuehn HS, Niemela JE, Sreedhara K, Stoddard JL, Grossman J, Wysocki CA, et al. Novel nonsense gain-of-function NFKB2 mutations associated with a combined immunodeficiency phenotype. *Blood*. 2017 Sep 28;130(13):1553–64.
52. Klemann C, Camacho-Ordóñez N, Yang L, Eskandarian Z, Rojas-Restrepo JL, Frede N, et al. Clinical and Immunological Phenotype of Patients With Primary Immunodeficiency Due to Damaging Mutations in NFKB2. *Front Immunol*. 2019;10:297.
53. Lee CE, Fulcher DA, Whittle B, Chand R, Fewings N, Field M, et al. Autosomal-dominant B-cell deficiency with alopecia due to a mutation in NFKB2 that results in nonprocessable p100. *Blood*. 2014 Nov 6;124(19):2964–72.
54. Chen K, Coonrod EM, Kumánovics A, Franks ZF, Durtschi JD, Margraf RL, et al. Germline mutations in NFKB2 implicate the noncanonical NF- κ B pathway in the pathogenesis of common variable immunodeficiency. *Am J Hum Genet*. 2013 Nov 7;93(5):812–24.
55. Liu Y, Hanson S, Gurugama P, Jones A, Clark B, Ibrahim MAA. Novel NFKB2 mutation in early-onset CVID. *J Clin Immunol*. 2014 Aug;34(6):686–90.
56. Barnabei L, Lamrini H, Castela M, Jeremiah N, Stolzenberg MC, Chentout L, et al. Heterozygous RELA mutations cause early-onset systemic lupus erythematosus by hijacking the NF- κ B pathway towards transcriptional activation of type-I Interferon genes [Internet]. *Immunology*; 2020 Apr [cited 2022 Jul 13]. Available from: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.04.27.046102>

57. Adeeb F, Dorris ER, Morgan NE, Lawless D, Maqsood A, Ng WL, et al. A Novel RELA Truncating Mutation in a Familial Behçet's Disease-like Mucocutaneous Ulcerative Condition. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ*. 2021 Mar;73(3):490–7.
58. Badran YR, Dedeoglu F, Leyva Castillo JM, Bainter W, Ohsumi TK, Bousvaros A, et al. Human RELA haploinsufficiency results in autosomal-dominant chronic mucocutaneous ulceration. *J Exp Med*. 2017 Jul 3;214(7):1937–47.
59. Comrie WA, Faruqi AJ, Price S, Zhang Y, Rao VK, Su HC, et al. RELA haploinsufficiency in CD4 lymphoproliferative disease with autoimmune cytopenias. *J Allergy Clin Immunol*. 2018 Apr;141(4):1507-1510.e8.
60. Lévy R, Langlais D, Béziat V, Rapaport F, Rao G, Lazarov T, et al. Inherited human c-Rel deficiency disrupts myeloid and lymphoid immunity to multiple infectious agents. *J Clin Invest*. 2021 Sep 1;131(17):e150143.
61. Starczynowski DT, Trautmann H, Pott C, Harder L, Arnold N, Africa JA, et al. Mutation of an IKK phosphorylation site within the transactivation domain of REL in two patients with B-cell lymphoma enhances REL's in vitro transforming activity. *Oncogene*. 2007 Apr 26;26(19):2685–94.
62. Beausant-Cohen S, Jaber F, Massaad MJ, Weeks S, Jones J, Alosaimi MF, et al. Combined immunodeficiency in a patient with c-Rel deficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2019 Aug;144(2):606-608.e4.
63. Sharfe N, Merico D, Karanxha A, Macdonald C, Dadi H, Ngan B, et al. The effects of RelB deficiency on lymphocyte development and function. *J Autoimmun*. 2015 Dec;65:90–100.
64. Das J, Chen CH, Yang L, Cohn L, Ray P, Ray A. A critical role for NF-kappa B in GATA3 expression and TH2 differentiation in allergic airway inflammation. *Nat Immunol*. 2001 Jan;2(1):45–50.
65. Artis D, Speirs K, Joyce K, Goldschmidt M, Caamaño J, Hunter CA, et al. NF-kappa B1 is required for optimal CD4+ Th1 cell development and resistance to *Leishmania major*. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2003 Feb 15;170(4):1995–2003.
66. Artis D, Kane CM, Fiore J, Zaph C, Shapira S, Joyce K, et al. Dendritic cell-intrinsic expression of NF-kappa B1 is required to promote optimal Th2 cell differentiation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2005 Jun 1;174(11):7154–9.
67. Sha WC, Liou HC, Tuomanen EI, Baltimore D. Targeted disruption of the p50 subunit of NF-kappa B leads to multifocal defects in immune responses. *Cell*. 1995 Jan 27;80(2):321–30.
68. Ishikawa H, Claudio E, Dambach D, Raventós-Suárez C, Ryan C, Bravo R. Chronic inflammation and susceptibility to bacterial infections in mice lacking the polypeptide (p)105 precursor (NF-kappaB1) but expressing p50. *J Exp Med*. 1998 Apr 6;187(7):985–96.
69. Caamaño JH, Rizzo CA, Durham SK, Barton DS, Raventós-Suárez C, Snapper CM, et al. Nuclear Factor (NF)-κB2 (p100/p52) Is Required for Normal Splenic Microarchitecture and B Cell-mediated Immune Responses. *J Exp Med*. 1998 Jan 19;187(2):185–96.
70. Speirs K, Lieberman L, Caamano J, Hunter CA, Scott P. Cutting edge: NF-kappa B2 is a negative regulator of dendritic cell function. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2004 Jan 15;172(2):752–6.

71. Beinke S, Ley SC. Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. *Biochem J*. 2004 Sep 1;382(Pt 2):393–409.
72. Franzoso G, Carlson L, Poljak L, Shores EW, Epstein S, Leonardi A, et al. Mice deficient in nuclear factor (NF)-kappa B/p52 present with defects in humoral responses, germinal center reactions, and splenic microarchitecture. *J Exp Med*. 1998 Jan 19;187(2):147–59.
73. Ishikawa H, Carrasco D, Claudio E, Ryseck RP, Bravo R. Gastric hyperplasia and increased proliferative responses of lymphocytes in mice lacking the COOH-terminal ankyrin domain of NF-kappaB2. *J Exp Med*. 1997 Oct 6;186(7):999–1014.
74. Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science*. 1996 Nov 1;274(5288):782–4.
75. Beg AA, Sha WC, Bronson RT, Ghosh S, Baltimore D. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature*. 1995 Jul 13;376(6536):167–70.
76. Prendes M, Zheng Y, Beg AA. Regulation of developing B cell survival by RelA-containing NF-kappa B complexes. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2003 Oct 15;171(8):3963–9.
77. Senftleben U. NF-kappaB in critical diseases: a bad guy? *Intensive Care Med*. 2003 Nov;29(11):1873–6.
78. Alcamo E, Mizgerd JP, Horwitz BH, Bronson R, Beg AA, Scott M, et al. Targeted mutation of TNF receptor I rescues the RelA-deficient mouse and reveals a critical role for NF-kappa B in leukocyte recruitment. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2001 Aug 1;167(3):1592–600.
79. Li M, Shillinglaw W, Henzel WJ, Beg AA. The RelA(p65) subunit of NF-kappaB is essential for inhibiting double-stranded RNA-induced cytotoxicity. *J Biol Chem*. 2001 Jan 12;276(2):1185–94.
80. Grumont RJ, Rourke IJ, O'Reilly LA, Strasser A, Miyake K, Sha W, et al. B Lymphocytes Differentially Use the Rel and Nuclear Factor kappaB1 (NF-kappaB1) Transcription Factors to Regulate Cell Cycle Progression and Apoptosis in Quiescent and Mitogen-activated Cells. *J Exp Med*. 1998 Mar 2;187(5):663–74.
81. Grumont RJ, Rourke IJ, Gerondakis S. Rel-dependent induction of A1 transcription is required to protect B cells from antigen receptor ligation-induced apoptosis. *Genes Dev*. 1999 Feb 15;13(4):400–11.
82. Cheng S, Hsia CY, Leone G, Liou HC. Cyclin E and Bcl-xL cooperatively induce cell cycle progression in c-Rel-/- B cells. *Oncogene*. 2003 Nov 20;22(52):8472–86.
83. Pohl T, Gugasyan R, Grumont RJ, Strasser A, Metcalf D, Tarlinton D, et al. The combined absence of NF-kappa B1 and c-Rel reveals that overlapping roles for these transcription factors in the B cell lineage are restricted to the activation and function of mature cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Apr 2;99(7):4514–9.
84. Hilliard BA, Mason N, Xu L, Sun J, Lamhamedi-Cherradi SE, Liou HC, et al. Critical roles of c-Rel in autoimmune inflammation and helper T cell differentiation. *J Clin Invest*. 2002 Sep;110(6):843–50.

85. Mason NJ, Liou HC, Hunter CA. T cell-intrinsic expression of c-Rel regulates Th1 cell responses essential for resistance to *Toxoplasma gondii*. *J Immunol Baltim Md* 1950. 2004 Mar 15;172(6):3704–11.
86. Gerondakis S, Strasser A, Metcalf D, Grigoriadis G, Scheerlinck JY, Grumont RJ. Rel-deficient T cells exhibit defects in production of interleukin 3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Apr 16;93(8):3405–9.
87. Weih F, Carrasco D, Durham SK, Barton DS, Rizzo CA, Ryseck RP, et al. Multiorgan inflammation and hematopoietic abnormalities in mice with a targeted disruption of RelB, a member of the NF-kappa B/Rel family. *Cell*. 1995 Jan 27;80(2):331–40.
88. Caamaño J, Alexander J, Craig L, Bravo R, Hunter CA. The NF-kappa B family member RelB is required for innate and adaptive immunity to *Toxoplasma gondii*. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1999 Oct 15;163(8):4453–61.
89. Weih F, Warr G, Yang H, Bravo R. Multifocal defects in immune responses in RelB-deficient mice. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1997 Jun 1;158(11):5211–8.
90. Miggelbrink AM, Jackson JD, Lorrey SJ, Srinivasan ES, Waibl-Polania J, Wilkinson DS, et al. CD4 T-Cell Exhaustion: Does It Exist and What Are Its Roles in Cancer? *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2021 Nov 1;27(21):5742–52.
91. Crawford A, Angelosanto JM, Kao C, Doering TA, Odorizzi PM, Barnett BE, et al. Molecular and transcriptional basis of CD4⁺ T cell dysfunction during chronic infection. *Immunity*. 2014 Feb 20;40(2):289–302.
92. Ciucci T, Vacchio MS, Gao Y, Tomassoni Ardori F, Candia J, Mehta M, et al. The Emergence and Functional Fitness of Memory CD4⁺ T Cells Require the Transcription Factor Thpok. *Immunity*. 2019 Jan 15;50(1):91-105.e4.
93. Ames RY, Ting LM, Gendlina I, Kim K, Macian F. The Transcription Factor NFAT1 Participates in the Induction of CD4⁺ T Cell Functional Exhaustion during *Plasmodium yoelii* Infection. *Infect Immun*. 2017 Sep;85(9):e00364-17.
94. Rausch MP, Hastings KT. An exhaustion-like phenotype constrains the activity of CD4⁺ T cells specific for a self and melanoma antigen. *PLoS One*. 2015;10(4):e0123332.
95. Malandro N, Budhu S, Kuhn NF, Liu C, Murphy JT, Cortez C, et al. Clonal Abundance of Tumor-Specific CD4(+) T Cells Potentiates Efficacy and Alters Susceptibility to Exhaustion. *Immunity*. 2016 Jan 19;44(1):179–93.
96. Russ BE, Olshanksy M, Smallwood HS, Li J, Denton AE, Prier JE, et al. Distinct epigenetic signatures delineate transcriptional programs during virus-specific CD8(+) T cell differentiation. *Immunity*. 2014 Nov 20;41(5):853–65.
97. Taniuchi I. CD4 Helper and CD8 Cytotoxic T Cell Differentiation. *Annu Rev Immunol*. 2018 Apr 26;36:579–601.
98. Voisin A, Grinberg-Bleyer Y. The many-sided contributions of NF-κB to T-cell biology in health and disease. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2021;361:245–300.

99. Kingeter LM, Schaefer BC. Loss of protein kinase C theta, Bcl10, or Malt1 selectively impairs proliferation and NF-kappa B activation in the CD4+ T cell subset. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2008 Nov 1;181(9):6244–54.
100. Saibil SD, Jones RG, Deenick EK, Liadis N, Elford AR, Vainberg MG, et al. CD4+ and CD8+ T cell survival is regulated differentially by protein kinase Ctheta, c-Rel, and protein kinase B. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2007 Mar 1;178(5):2932–9.
101. Deenick EK, Po L, Chapatte L, Murakami K, Lu YC, Elford AR, et al. c-Rel phenocopies PKCtheta but not Bcl-10 in regulating CD8+ T-cell activation versus tolerance. *Eur J Immunol*. 2010 Mar;40(3):867–77.
102. Zeng H, Chen Y, Yu M, Xue L, Gao X, Morris SW, et al. T cell receptor-mediated activation of CD4+CD44hi T cells bypasses Bcl10: an implication of differential NF-kappaB dependence of naïve and memory T cells during T cell receptor-mediated responses. *J Biol Chem*. 2008 Sep 5;283(36):24392–9.
103. Torres JM, Martinez-Barricarte R, García-Gómez S, Mazariegos MS, Itan Y, Boisson B, et al. Inherited BCL10 deficiency impairs hematopoietic and nonhematopoietic immunity. *J Clin Invest*. 2014 Dec;124(12):5239–48.
104. Stepensky P, Keller B, Buchta M, Kienzler AK, Elpeleg O, Somech R, et al. Deficiency of caspase recruitment domain family, member 11 (CARD11), causes profound combined immunodeficiency in human subjects. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Feb;131(2):477-485.e1.
105. Schmidt-Supprian M, Tian J, Ji H, Terhorst C, Bhan AK, Grant EP, et al. I kappa B kinase 2 deficiency in T cells leads to defects in priming, B cell help, germinal center reactions, and homeostatic expansion. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2004 Aug 1;173(3):1612–9.
106. Heuser C, Gotot J, Piotrowski EC, Philipp MS, Courrèges CJF, Otte MS, et al. Prolonged IKKβ Inhibition Improves Ongoing CTL Antitumor Responses by Incapacitating Regulatory T Cells. *Cell Rep*. 2017 Oct 17;21(3):578–86.
107. Mora AL, Chen D, Boothby M, Rubin DH. Lineage-specific differences among CD8+ T cells in their dependence of NF-kappa B/Rel signaling. *Eur J Immunol*. 1999 Sep;29(9):2968–80.
108. Boothby MR, Mora AL, Scherer DC, Brockman JA, Ballard DW. Perturbation of the T lymphocyte lineage in transgenic mice expressing a constitutive repressor of nuclear factor (NF)-kappaB. *J Exp Med*. 1997 Jun 2;185(11):1897–907.
109. Gonzalez-Granado LI, Ruiz-García R, Blas-Espada J, Moreno-Villares JM, Germán-Díaz M, López-Nevado M, et al. Acquired and Innate Immunity Impairment and Severe Disseminated Mycobacterium genavense Infection in a Patient With a NF-κB1 Deficiency. *Front Immunol*. 2018;9:3148.
110. Clavijo PE, Frauwirth KA. Anergic CD8+ T lymphocytes have impaired NF-κB activation with defects in p65 phosphorylation and acetylation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2012 Feb 1;188(3):1213–21.
111. Mondor I, Schmitt-Verhulst AM, Guerder S. RelA regulates the survival of activated effector CD8 T cells. *Cell Death Differ*. 2005 Nov;12(11):1398–406.

112. Shifrut E, Carnevale J, Tobin V, Roth TL, Woo JM, Bui CT, et al. Genome-wide CRISPR Screens in Primary Human T Cells Reveal Key Regulators of Immune Function. *Cell*. 2018 Dec 13;175(7):1958-1971.e15.
113. Knudson KM, Pritzl CJ, Saxena V, Altman A, Daniels MA, Teixeira E. NFκB-Pim-1-Eomesodermin axis is critical for maintaining CD8 T-cell memory quality. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Feb 28;114(9):E1659–67.
114. Balasubramani A, Shibata Y, Crawford GE, Baldwin AS, Hatton RD, Weaver CT. Modular utilization of distal cis-regulatory elements controls Ifng gene expression in T cells activated by distinct stimuli. *Immunity*. 2010 Jul 23;33(1):35–47.
115. Schmidt R, Steinhart Z, Layeghi M, Freimer JW, Bueno R, Nguyen VQ, et al. CRISPR activation and interference screens decode stimulation responses in primary human T cells. *Science*. 2022 Feb 4;375(6580):eabj4008.
116. Li Y, Wang H, Zhou X, Xie X, Chen X, Jie Z, et al. Cell intrinsic role of NF-κB-inducing kinase in regulating T cell-mediated immune and autoimmune responses. *Sci Rep*. 2016 Feb 25;6:22115.
117. Willmann KL, Klaver S, Doğu F, Santos-Valente E, Garncarz W, Bilic I, et al. Biallelic loss-of-function mutation in NIK causes a primary immunodeficiency with multifaceted aberrant lymphoid immunity. *Nat Commun*. 2014 Nov 19;5:5360.
118. Lee SJ, Myers L, Muralimohan G, Dai J, Qiao Y, Li Z, et al. 4-1BB and OX40 dual costimulation synergistically stimulate primary specific CD8 T cells for robust effector function. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2004 Sep 1;173(5):3002–12.
119. Lee SJ, Long M, Adler AJ, Mittler RS, Vella AT. The IKK-neutralizing compound Bay11 kills supereffector CD8 T cells by altering caspase-dependent activation-induced cell death. *J Leukoc Biol*. 2009 Jan;85(1):175–85.
120. Lee SJ, Rossi RJ, Lee SK, Croft M, Kwon BS, Mittler RS, et al. CD134 Costimulation Couples the CD137 Pathway to Induce Production of Supereffector CD8 T Cells That Become IL-7 Dependent. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2007 Aug 15;179(4):2203–14.
121. Legut M, Gajic Z, Guarino M, Daniloski Z, Rahman JA, Xue X, et al. A genome-scale screen for synthetic drivers of T cell proliferation. *Nature*. 2022 Mar;603(7902):728–35.
122. Krishna S, Xie D, Gorentla B, Shin J, Gao J, Zhong XP. Chronic activation of the kinase IKKβ impairs T cell function and survival. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2012 Aug 1;189(3):1209–19.
123. Stéphan P, Lautreite R, Voisin A, Grinberg-Bleyer Y. Transcriptional Control of Regulatory T Cells in Cancer: Toward Therapeutic Targeting? *Cancers*. 2020 Oct 30;12(11):E3194.
124. Zheng SG, Wang JH, Gray JD, Soucier H, Horwitz DA. Natural and Induced CD4+CD25+ Cells Educate CD4+CD25– Cells to Develop Suppressive Activity: The Role of IL-2, TGF-β, and IL-10. *J Immunol*. 2004 May 1;172(9):5213–21.
125. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepers B, Clark LB, Yasayko SA, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet*. 2001 Jan;27(1):68–73.

126. Chatila TA, Blaeser F, Ho N, Lederman HM, Voulgaropoulos C, Helms C, et al. JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J Clin Invest*. 2000 Dec;106(12):R75-81.
127. Carbone F, De Rosa V, Carrieri PB, Montella S, Bruzzese D, Porcellini A, et al. Regulatory T cell proliferative potential is impaired in human autoimmune disease. *Nat Med*. 2014 Jan;20(1):69-74.
128. McGeachy MJ, Stephens LA, Anderson SM. Natural Recovery and Protection from Autoimmune Encephalomyelitis: Contribution of CD4+CD25+ Regulatory Cells within the Central Nervous System. *J Immunol*. 2005 Sep 1;175(5):3025-32.
129. Ronin E, Pouchy C, Khosravi M, Hilaire M, Grégoire S, Casrouge A, et al. Tissue-restricted control of established central nervous system autoimmunity by TNF receptor 2-expressing Treg cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021 Mar 30;118(13):e2014043118.
130. Schmidt A, Oberle N, Krammer P. Molecular Mechanisms of Treg-Mediated T Cell Suppression. *Front Immunol* [Internet]. 2012 [cited 2022 Jul 6];3. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2012.00051>
131. Ruan Q, Kameswaran V, Tone Y, Li L, Liou HC, Greene MI, et al. Development of Foxp3(+) regulatory t cells is driven by the c-Rel enhanceosome. *Immunity*. 2009 Dec 18;31(6):932-40.
132. Zheng Y, Josefowicz S, Chaudhry A, Peng XP, Forbush K, Rudensky AY. Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. *Nature*. 2010 Feb 11;463(7282):808-12.
133. Soligo M, Camperio C, Caristi S, Scottà C, Del Porto P, Costanzo A, et al. CD28 costimulation regulates FOXP3 in a RelA/NF-κB-dependent mechanism. *Eur J Immunol*. 2011 Feb;41(2):503-13.
134. Grinberg-Bleyer Y, Caron R, Seeley JJ, De Silva NS, Schindler CW, Hayden MS, et al. The Alternative NF-κB Pathway in Regulatory T Cell Homeostasis and Suppressive Function. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2018 Apr 1;200(7):2362-71.
135. Vieira PL, Christensen JR, Minaee S, O'Neill EJ, Barrat FJ, Boonstra A, et al. IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2004 May 15;172(10):5986-93.
136. Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C, Narula S, Levings MK. Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev*. 2001 Aug;182:68-79.
137. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*. 1997 Oct 16;389(6652):737-42.
138. Astier AL, Hafler DA. Abnormal Tr1 differentiation in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2007 Nov;191(1-2):70-8.
139. Astier AL, Meiffren G, Freeman S, Hafler DA. Alterations in CD46-mediated Tr1 regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Clin Invest*. 2006 Dec;116(12):3252-7.

140. Di Pilato M, Kim EY, Cadilha BL, Prüßmann JN, Nasrallah MN, Seruggia D, et al. Targeting the CBM complex causes Treg cells to prime tumours for immune checkpoint therapy. *Nature*. 2019 Jun;570(7759):112–6.
141. Cheng L, Deng N, Yang N, Zhao X, Lin X. Malt1 Protease Is Critical in Maintaining Function of Regulatory T Cells and May Be a Therapeutic Target for Antitumor Immunity. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2019 May 15;202(10):3008–19.
142. Rosenbaum M, Gewies A, Pechloff K, Heuser C, Engleitner T, Gehring T, et al. Bcl10-controlled Malt1 paracaspase activity is key for the immune suppressive function of regulatory T cells. *Nat Commun*. 2019 May 28;10(1):2352.
143. Ronin E, Lubrano di Ricco M, Vallion R, Divoux J, Kwon HK, Grégoire S, et al. The NF- κ B RelA Transcription Factor Is Critical for Regulatory T Cell Activation and Stability. *Front Immunol*. 2019;10:2487.
144. Grinberg-Bleyer Y, Oh H, Desrichard A, Bhatt DM, Caron R, Chan TA, et al. NF- κ B c-Rel Is Crucial for the Regulatory T Cell Immune Checkpoint in Cancer. *Cell*. 2017 Sep 7;170(6):1096-1108.e13.
145. Li T, Li X, Zamani A, Wang W, Lee CN, Li M, et al. c-Rel is a myeloid checkpoint for cancer immunotherapy. *Nat Cancer*. 2020 May;1(5):507–17.
146. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1986 Apr 1;136(7):2348–57.
147. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*. 2000 Mar 17;100(6):655–69.
148. Zhang DH, Cohn L, Ray P, Bottomly K, Ray A. Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene. *J Biol Chem*. 1997 Aug 22;272(34):21597–603.
149. Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*. 1997 May 16;89(4):587–96.
150. Seder RA, Paul WE. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol*. 1994;12:635–73.
151. Tibbitt CA, Stark JM, Martens L, Ma J, Mold JE, Deswarte K, et al. Single-Cell RNA Sequencing of the T Helper Cell Response to House Dust Mites Defines a Distinct Gene Expression Signature in Airway Th2 Cells. *Immunity*. 2019 Jul 16;51(1):169-184.e5.
152. Gowthaman U, Chen JS, Zhang B, Flynn WF, Lu Y, Song W, et al. Identification of a T follicular helper cell subset that drives anaphylactic IgE. *Science*. 2019 Aug 30;365(6456):eaaw6433.
153. Kiner E, Willie E, Vijaykumar B, Chowdhary K, Schmutz H, Chandler J, et al. Gut CD4+ T cell phenotypes are a continuum molded by microbes, not by TH archetypes. *Nat Immunol*. 2021 Feb;22(2):216–28.
154. Gaublotte JT, Yosef N, Lee Y, Gertner RS, Yang LV, Wu C, et al. Single-Cell Genomics Unveils Critical Regulators of Th17 Cell Pathogenicity. *Cell*. 2015 Dec 3;163(6):1400–12.

155. Tortola L, Jacobs A, Pohlmeier L, Obermair FJ, Ampenberger F, Bodenmiller B, et al. High-Dimensional T Helper Cell Profiling Reveals a Broad Diversity of Stably Committed Effector States and Uncovers Interlineage Relationships. *Immunity*. 2020 Sep 15;53(3):597-613.e6.
156. Zemmour D, Kiner E, Benoist C. CD4⁺ teff cell heterogeneity: the perspective from single-cell transcriptomics. *Curr Opin Immunol*. 2020 Apr;63:61-7.
157. Tuzlak S, Dejean AS, Iannacone M, Quintana FJ, Waisman A, Ginhoux F, et al. Repositioning TH cell polarization from single cytokines to complex help. *Nat Immunol*. 2021 Oct;22(10):1210-7.
158. Avni O, Lee D, Macian F, Szabo SJ, Glimcher LH, Rao A. T(H) cell differentiation is accompanied by dynamic changes in histone acetylation of cytokine genes. *Nat Immunol*. 2002 Jul;3(7):643-51.
159. Fields PE, Kim ST, Flavell RA. Cutting edge: changes in histone acetylation at the IL-4 and IFN-gamma loci accompany Th1/Th2 differentiation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2002 Jul 15;169(2):647-50.
160. Aronica MA, Mora AL, Mitchell DB, Finn PW, Johnson JE, Sheller JR, et al. Preferential role for NF-kappa B/Rel signaling in the type 1 but not type 2 T cell-dependent immune response in vivo. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1999 Nov 1;163(9):5116-24.
161. Corn RA, Aronica MA, Zhang F, Tong Y, Stanley SA, Kim SRA, et al. T cell-intrinsic requirement for NF-kappa B induction in postdifferentiation IFN-gamma production and clonal expansion in a Th1 response. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2003 Aug 15;171(4):1816-24.
162. Marsland BJ, Soos TJ, Späth G, Littman DR, Kopf M. Protein kinase C theta is critical for the development of in vivo T helper (Th)2 cell but not Th1 cell responses. *J Exp Med*. 2004 Jul 19;200(2):181-9.
163. Molinero LL, Cubre A, Mora-Solano C, Wang Y, Alegre ML. T cell receptor/CARMA1/NF-κB signaling controls T-helper (Th) 17 differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Nov 6;109(45):18529-34.
164. Sica A, Dorman L, Viggiano V, Cippitelli M, Ghosh P, Rice N, et al. Interaction of NF-kappaB and NFAT with the interferon-gamma promoter. *J Biol Chem*. 1997 Nov 28;272(48):30412-20.
165. Hertweck A, Evans CM, Eskandarpour M, Lau JCH, Oleinika K, Jackson I, et al. T-bet Activates Th1 Genes through Mediator and the Super Elongation Complex. *Cell Rep*. 2016 Jun 21;15(12):2756-70.
166. Vasanthakumar A, Liao Y, Teh P, Pascutti MF, Oja AE, Garnham AL, et al. The TNF Receptor Superfamily-NF-κB Axis Is Critical to Maintain Effector Regulatory T Cells in Lymphoid and Non-lymphoid Tissues. *Cell Rep*. 2017 Sep 19;20(12):2906-20.
167. Chen G, Hardy K, Pagler E, Ma L, Lee S, Gerondakis S, et al. The NF-κB transcription factor c-Rel is required for Th17 effector cell development in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2011 Nov 1;187(9):4483-91.
168. Ruan Q, Kameswaran V, Zhang Y, Zheng S, Sun J, Wang J, et al. The Th17 immune response is controlled by the Rel-RORγ-RORγ T transcriptional axis. *J Exp Med*. 2011 Oct 24;208(11):2321-33.
169. Corn RA, Hunter C, Liou HC, Siebenlist U, Boothby MR. Opposing roles for RelB and Bcl-3 in regulation of T-box expressed in T cells, GATA-3, and Th effector differentiation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2005 Aug 15;175(4):2102-10.

170. Reinhard K, Huber M, Wostl C, Hellhund A, Toboldt A, Abass E, et al. c-Rel promotes type 1 and type 17 immune responses during *Leishmania major* infection. *Eur J Immunol*. 2011 May;41(5):1388–98.
171. Shapiro VS, Mollenauer MN, Greene WC, Weiss A. c-rel regulation of IL-2 gene expression may be mediated through activation of AP-1. *J Exp Med*. 1996 Nov 1;184(5):1663–9.
172. Hwang ES, Hong JH, Glimcher LH. IL-2 production in developing Th1 cells is regulated by heterodimerization of RelA and T-bet and requires T-bet serine residue 508. *J Exp Med*. 2005 Nov 7;202(9):1289–300.
173. Hofmann J, Mair F, Greter M, Schmidt-Supprian M, Becher B. NIK signaling in dendritic cells but not in T cells is required for the development of effector T cells and cell-mediated immune responses. *J Exp Med*. 2011 Aug 29;208(9):1917–29.
174. Speirs K, Caamano J, Goldschmidt MH, Hunter CA, Scott P. NF-kappa B2 is required for optimal CD40-induced IL-12 production but dispensable for Th1 cell Differentiation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2002 May 1;168(9):4406–13.
175. Paul WE, Zhu J. How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nat Rev Immunol*. 2010 Apr;10(4):225–35.
176. Walker JA, McKenzie ANJ. TH2 cell development and function. *Nat Rev Immunol*. 2018 Feb;18(2):121–33.
177. Medoff BD, Seed B, Jackobek R, Zora J, Yang Y, Luster AD, et al. CARMA1 is critical for the development of allergic airway inflammation in a murine model of asthma. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2006 Jun 15;176(12):7272–7.
178. Blonska M, Joo D, Zweidler-McKay PA, Zhao Q, Lin X. CARMA1 controls Th2 cell-specific cytokine expression through regulating JunB and GATA3 transcription factors. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2012 Apr 1;188(7):3160–8.
179. Ramadas RA, Roche MI, Moon JJ, Ludwig T, Xavier RJ, Medoff BD. CARMA1 is necessary for optimal T cell responses in a murine model of allergic asthma. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2011 Dec 15;187(12):6197–207.
180. Donovan CE, Finn PW. Immune mechanisms of childhood asthma. *Thorax*. 1999 Oct;54(10):938–46.
181. Yang L, Cohn L, Zhang DH, Homer R, Ray A, Ray P. Essential role of nuclear factor kappaB in the induction of eosinophilia in allergic airway inflammation. *J Exp Med*. 1998 Nov 2;188(9):1739–50.
182. Gregorczyk I, Jasienska-Mikołajczyk A, Maślanka T. Blockade of NF-κB Translocation and of RANKL/RANK Interaction Decreases the Frequency of Th2 and Th17 Cells Capable of IL-4 and IL-17 Production, Respectively, in a Mouse Model of Allergic Asthma. *Mol Basel Switz*. 2021 May 23;26(11):3117.
183. Rizk J, Kaplinsky J, Agerholm R, Kadekar D, Ivars F, Agace WW, et al. SMAC mimetics promote NIK-dependent inhibition of CD4+ TH17 cell differentiation. *Sci Signal*. 2019 Aug 27;12(596):eaaw3469.

184. Henriksson J, Chen X, Gomes T, Ullah U, Meyer KB, Miragaia R, et al. Genome-wide CRISPR Screens in T Helper Cells Reveal Pervasive Crosstalk between Activation and Differentiation. *Cell*. 2019 Feb 7;176(4):882-896.e18.
185. Li-Weber M, Giaisi M, Baumann S, Pálfi K, Krammer PH. NF-kappa B synergizes with NF-AT and NF-IL6 in activation of the IL-4 gene in T cells. *Eur J Immunol*. 2004 Apr;34(4):1111–8.
186. Mills KHG. IL-17 and IL-17-producing cells in protection versus pathology. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2022 Jul 5 [cited 2022 Jul 8]; Available from: <https://www.nature.com/articles/s41577-022-00746-9>
187. Brockmann L, Giannou AD, Gagliani N, Huber S. Regulation of TH17 Cells and Associated Cytokines in Wound Healing, Tissue Regeneration, and Carcinogenesis. *Int J Mol Sci*. 2017 May 11;18(5):1033.
188. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*. 2005 Nov;6(11):1123–32.
189. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, et al. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*. 2006 Sep 22;126(6):1121–33.
190. Sandquist I, Kolls J. Update on regulation and effector functions of Th17 cells. *F1000Research*. 2018;7:205.
191. Zwicky P, Unger S, Becher B. Targeting interleukin-17 in chronic inflammatory disease: A clinical perspective. *J Exp Med*. 2020 Jan 6;217(1):e20191123.
192. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*. 2005 Jan 17;201(2):233–40.
193. Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, et al. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2006 Jul 1;177(1):566–73.
194. Littman DR, Rudensky AY. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell*. 2010 Mar 19;140(6):845–58.
195. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006 May 11;441(7090):235–8.
196. Veldhoen M, Stockinger B. TGFbeta1, a “Jack of all trades”: the link with pro-inflammatory IL-17-producing T cells. *Trends Immunol*. 2006 Aug;27(8):358–61.
197. Brüstle A, Brenner D, Knobbe CB, Lang PA, Virtanen C, Hershenfield BM, et al. The NF-kB regulator MALT1 determines the encephalitogenic potential of Th17 cells. *J Clin Invest*. 2012 Dec;122(12):4698–709.

198. Greve B, Weissert R, Hamdi N, Bettelli E, Sobel RA, Coyle A, et al. I kappa B kinase 2/beta deficiency controls expansion of autoreactive T cells and suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2007 Jul 1;179(1):179–85.
199. Li L, Ruan Q, Hilliard B, Devirgiliis J, Karin M, Chen YH. Transcriptional regulation of the Th17 immune response by IKK(alpha). *J Exp Med*. 2011 Apr 11;208(4):787–96.
200. He Z, Wang F, Zhang J, Sen S, Pang Q, Luo S, et al. Regulation of Th17 Differentiation by IKK α -Dependent and -Independent Phosphorylation of ROR γ t. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2017 Aug 1;199(3):955–64.
201. Ma CS, Wong N, Rao G, Nguyen A, Avery DT, Payne K, et al. Unique and shared signaling pathways cooperate to regulate the differentiation of human CD4+ T cells into distinct effector subsets. *J Exp Med*. 2016 Jul 25;213(8):1589–608.
202. Okamoto K, Iwai Y, Oh-Hora M, Yamamoto M, Morio T, Aoki K, et al. IkappaBzeta regulates T(H)17 development by cooperating with ROR nuclear receptors. *Nature*. 2010 Apr 29;464(7293):1381–5.
203. Chang M, Lee AJ, Fitzpatrick L, Zhang M, Sun SC. NF-kappa B1 p105 regulates T cell homeostasis and prevents chronic inflammation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2009 Mar 1;182(5):3131–8.
204. Visekruna A, Huber M, Hellhund A, Bothur E, Reinhard K, Bollig N, et al. c-Rel is crucial for the induction of Foxp3+ regulatory CD4+ T cells but not TH17 cells. *Eur J Immunol*. 2010;40(3):671–6.
205. Powolny-Budnicka I, Riemann M, Tänzer S, Schmid RM, Hehlhans T, Weih F. RelA and RelB transcription factors in distinct thymocyte populations control lymphotoxin-dependent interleukin-17 production in $\gamma\delta$ T cells. *Immunity*. 2011 Mar 25;34(3):364–74.
206. Jin W, Zhou XF, Yu J, Cheng X, Sun SC. Regulation of Th17 cell differentiation and EAE induction by MAP3K NIK. *Blood*. 2009 Jun 25;113(26):6603–10.
207. Yu J, Zhou X, Nakaya M, Jin W, Cheng X, Sun SC. T cell-intrinsic function of the noncanonical NF- κ B pathway in the regulation of GM-CSF expression and experimental autoimmune encephalomyelitis pathogenesis. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2014 Jul 1;193(1):422–30.
208. Xiao X, Shi X, Fan Y, Wu C, Zhang X, Minze L, et al. The Costimulatory Receptor OX40 Inhibits Interleukin-17 Expression through Activation of Repressive Chromatin Remodeling Pathways. *Immunity*. 2016 Jun 21;44(6):1271–83.
209. Koliesnik IO, Andreas N, Romanov VS, Sreekantapuram S, Krljanac B, Haenold R, et al. RelB regulates Th17 differentiation in a cell-intrinsic manner. *Immunobiology*. 2018 Feb 1;223(2):191–9.
210. Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, Galileos G, Gao W, Sobel RA, et al. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nat Immunol*. 2008 Dec;9(12):1347–55.
211. Staudt V, Bothur E, Klein M, Lingnau K, Reuter S, Grebe N, et al. Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells. *Immunity*. 2010 Aug 27;33(2):192–202.
212. Veldhoen M, Uyttenhove C, van Snick J, Helmby H, Westendorf A, Buer J, et al. Transforming growth factor-beta “reprograms” the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol*. 2008 Dec;9(12):1341–6.

213. Goswami R, Kaplan MH. Yoking OX40 to regulation of IL-9. *Nat Immunol*. 2012 Oct;13(10):942–3.
214. Chang HC, Sehra S, Goswami R, Yao W, Yu Q, Stritesky GL, et al. The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. *Nat Immunol*. 2010 Jun;11(6):527–34.
215. Lu Y, Wang Q, Xue G, Bi E, Ma X, Wang A, et al. Th9 Cells Represent a Unique Subset of CD4+ T Cells Endowed with the Ability to Eradicate Advanced Tumors. *Cancer Cell*. 2018 Jun 11;33(6):1048–1060.e7.
216. Early SB, Huyett P, Brown-Steinke K, Borish L, Steinke JW. Functional analysis of -351 interleukin-9 promoter polymorphism reveals an activator controlled by NF-kappaB. *Genes Immun*. 2009 Jun;10(4):341–9.
217. Jash A, Sahoo A, Kim GC, Chae CS, Hwang JS, Kim JE, et al. Nuclear factor of activated T cells 1 (NFAT1)-induced permissive chromatin modification facilitates nuclear factor- κ B (NF- κ B)-mediated interleukin-9 (IL-9) transactivation. *J Biol Chem*. 2012 May 4;287(19):15445–57.
218. Bonadies N, Neururer C, Steege A, Vallabhapurapu S, Pabst T, Mueller BU. PU.1 is regulated by NF-kappaB through a novel binding site in a 17 kb upstream enhancer element. *Oncogene*. 2010 Feb 18;29(7):1062–72.
219. Zhou Q, Wang H, Schwartz DM, Stoffels M, Park YH, Zhang Y, et al. Loss-of-function mutations in TNFAIP3 leading to A20 haploinsufficiency cause an early-onset autoinflammatory disease. *Nat Genet*. 2016 Jan;48(1):67–73.
220. Harusato A, Abo H, Ngo VL, Yi SW, Mitsutake K, Osuka S, et al. IL-36 γ signaling controls the induced regulatory T cell-Th9 cell balance via NF κ B activation and STAT transcription factors. *Mucosal Immunol*. 2017 Nov;10(6):1455–67.
221. Wu X, Jiang W, Wang X, Zhang C, Cai J, Yu S, et al. SGK1 enhances Th9 cell differentiation and airway inflammation through NF- κ B signaling pathway in asthma. *Cell Tissue Res*. 2020 Dec;382(3):563–74.
222. Xiao X, Balasubramanian S, Liu W, Chu X, Wang H, Taparowsky EJ, et al. OX40 signaling favors the induction of T(H)9 cells and airway inflammation. *Nat Immunol*. 2012 Oct;13(10):981–90.
223. Xiao X, Fan Y, Li J, Zhang X, Lou X, Dou Y, et al. Guidance of super-enhancers in regulation of IL-9 induction and airway inflammation. *J Exp Med*. 2018 Feb 5;215(2):559–74.
224. Jiang Y, Chen J, Bi E, Zhao Y, Qin T, Wang Y, et al. TNF- α enhances Th9 cell differentiation and antitumor immunity via TNFR2-dependent pathways. *J Immunother Cancer*. 2019 Feb 4;7(1):28.
225. Breitfeld D, Ohl L, Kremmer E, Ellwart J, Sallusto F, Lipp M, et al. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med*. 2000 Dec 4;192(11):1545–52.
226. Schaerli P, Willimann K, Lang AB, Lipp M, Loetscher P, Moser B. CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J Exp Med*. 2000 Dec 4;192(11):1553–62.

227. Johnston RJ, Poholek AC, DiToro D, Yusuf I, Eto D, Barnett B, et al. Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science*. 2009 Aug 21;325(5943):1006–10.
228. Crotty S. T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. *Immunity*. 2019 May 21;50(5):1132–48.
229. Ma CS, Wong N, Rao G, Avery DT, Torpy J, Hambridge T, et al. Monogenic mutations differentially impact the quantity and quality of T follicular helper cells in human primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol*. 2015 Oct;136(4):993-1006.e1.
230. Cardinez C, Miraghadzadeh B, Tanita K, da Silva E, Hoshino A, Okada S, et al. Gain-of-function IKBKB mutation causes human combined immune deficiency. *J Exp Med*. 2018 Nov 5;215(11):2715–24.
231. Chen G, Hardy K, Bunting K, Daley S, Ma L, Shannon MF. Regulation of the IL-21 gene by the NF- κ B transcription factor c-Rel. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2010 Aug 15;185(4):2350–9.
232. Liu WH, Kang SG, Huang Z, Wu CJ, Jin HY, Maine CJ, et al. A miR-155-Peli1-c-Rel pathway controls the generation and function of T follicular helper cells. *J Exp Med*. 2016 Aug 22;213(9):1901–19.
233. Luu M, Binder K, Hartmann S, Kespohl M, Bazant J, Romero R, et al. Transcription factor c-Rel mediates communication between commensal bacteria and mucosal lymphocytes. *J Leukoc Biol*. 2022 May;111(5):1001–7.
234. Serre K, Mohr E, Bénézech C, Bird R, Khan M, Caamaño JH, et al. Selective effects of NF- κ B1 deficiency in CD4⁺ T cells on Th2 and TFh induction by alum-precipitated protein vaccines. *Eur J Immunol*. 2011 Jun;41(6):1573–82.
235. Hu H, Wu X, Jin W, Chang M, Cheng X, Sun SC. Noncanonical NF- κ B regulates inducible costimulator (ICOS) ligand expression and T follicular helper cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Aug 2;108(31):12827–32.
236. De Leo P, Gazzarelli L, Baronio M, Montin D, Di Cesare S, Giancotta C, et al. NFKB2 regulates human Tfh and Tfr pool formation and germinal center potential. *Clin Immunol Orlando Fla*. 2020 Jan;210:108309.
237. Akiba H, Takeda K, Kojima Y, Usui Y, Harada N, Yamazaki T, et al. The role of ICOS in the CXCR5+ follicular B helper T cell maintenance in vivo. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2005 Aug 15;175(4):2340–8.
238. Cao B, Bray F, Ilbawi A, Soerjomataram I. Effect on longevity of one-third reduction in premature mortality from non-communicable diseases by 2030: a global analysis of the Sustainable Development Goal health target. *Lancet Glob Health*. 2018 Dec;6(12):e1288–96.
239. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Dyba T, Randi G, Bettio M, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *Eur J Cancer*. 2018 Nov 1;103:356–87.
240. GBD 2019 Risk Factors Collaborators. Global burden of 87 risk factors in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Lond Engl*. 2020 Oct 17;396(10258):1223–49.

241. Lalle P, Bignon YJ, Stoppa-Lyonnet D, Narod SA, Mazoyer S, Rio P, et al. Screening of inherited breast cancer with DNA markers. *Lancet Lond Engl*. 1993 May 29;341(8857):1422.
242. Moyret-Lalle C, Pommier R, Bouard C, Nouri E, Richard G, Puisieux A. Plasticité des cellules cancéreuses et dissémination métastatique. *médecine/sciences*. 2016 Aug 1;32(8–9):725–31.
243. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57–70.
244. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. 2022 Jan;12(1):31–46.
245. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646–74.
246. Lyseng-Williamson K, Jarvis B. Imatinib. *Drugs*. 2001 Oct 1;61(12):1765–74.
247. Dobosz P, Dzieciatkowski T. The Intriguing History of Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*. 2019 Dec 17;10:2965.
248. McCarthy EF. The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *Iowa Orthop J*. 2006;26:154–8.
249. Ehrlich P. Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung. 1908.
250. Murphy JB, Morton JJ. The Lymphocyte as a Factor in Natural and Induced Resistance to Transplanted Cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1915 Jul;1(7):435–7.
251. Barnd DL, Lan MS, Metzgar RS, Finn OJ. Specific, major histocompatibility complex-unrestricted recognition of tumor-associated mucins by human cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Sep;86(18):7159–63.
252. Old LJ. Cancer immunology. *Sci Am*. 1977 May;236(5):62–70, 72–3, 76, 79.
253. Old LJ, Clarke DA, Benacerraf B. Effect of Bacillus Calmette-Guerin infection on transplanted tumours in the mouse. *Nature*. 1959 Jul 25;184(Suppl 5):291–2.
254. Morales A, Eiding D, Bruce AW. Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol*. 1976 Aug;116(2):180–3.
255. Stutman O. Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science*. 1974 Feb 8;183(4124):534–6.
256. Stutman O. Delayed tumour appearance and absence of regression in nude mice infected with murine sarcoma virus. *Nature*. 1975 Jan 10;253(5487):142–4.
257. Stutman O. Chemical carcinogenesis in nude mice: comparison between nude mice from homozygous matings and heterozygous matings and effect of age and carcinogen dose. *J Natl Cancer Inst*. 1979 Feb;62(2):353–8.
258. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, et al. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*. 2001 Apr 26;410(6832):1107–11.

259. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:329–60.
260. Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res.* 1970;13:1–27.
261. Yarchoan R, Uldrick TS. HIV-Associated Cancers and Related Diseases. *N Engl J Med.* 2018 Mar 15;378(11):1029–41.
262. Bassères DS, Ebbs A, Levantini E, Baldwin AS. Requirement of the NF-kappaB subunit p65/RelA for K-Ras-induced lung tumorigenesis. *Cancer Res.* 2010 May 1;70(9):3537–46.
263. Carneiro-Lobo TC, Scalabrini LC, Magalhães L da S, Cardeal LB, Rodrigues FS, Dos Santos EO, et al. IKK β targeting reduces KRAS-induced lung cancer angiogenesis in vitro and in vivo: A potential anti-angiogenic therapeutic target. *Lung Cancer Amst Neth.* 2019 Apr;130:169–78.
264. Meylan E, Dooley AL, Feldser DM, Shen L, Turk E, Ouyang C, et al. Requirement for NF-kappaB signalling in a mouse model of lung adenocarcinoma. *Nature.* 2009 Nov 5;462(7269):104–7.
265. Yang H, Zhang Y, Wu M, Li J, Zhou W, Li G, et al. Suppression of ongoing experimental autoimmune myasthenia gravis by transfer of RelB-silenced bone marrow dendritic cells is associated with a change from a T helper Th17/Th1 to a Th2 and FoxP3+ regulatory T-cell profile. *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc Al.* 2010 Mar;59(3):197–205.
266. He G, Yu GY, Temkin V, Ogata H, Kuntzen C, Sakurai T, et al. Hepatocyte IKKbeta/NF-kappaB inhibits tumor promotion and progression by preventing oxidative stress-driven STAT3 activation. *Cancer Cell.* 2010 Mar 16;17(3):286–97.
267. van Hogerlinden M, Rozell BL, Toftgård R, Sundberg JP. Characterization of the progressive skin disease and inflammatory cell infiltrate in mice with inhibited NF-kappaB signaling. *J Invest Dermatol.* 2004 Jul;123(1):101–8.
268. Capece D, Verzella D, Tessitore A, Alesse E, Capalbo C, Zazzeroni F. Cancer secretome and inflammation: The bright and the dark sides of NF- κ B. *Semin Cell Dev Biol.* 2018 Jun;78:51–61.
269. Wang N, Liang H, Zen K. Molecular Mechanisms That Influence the Macrophage M1–M2 Polarization Balance. *Front Immunol [Internet].* 2014 Nov 28 [cited 2020 Apr 6];5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4246889/>
270. Ji Z, He L, Regev A, Struhl K. Inflammatory regulatory network mediated by the joint action of NF- κ B, STAT3, and AP-1 factors is involved in many human cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019 May 7;116(19):9453–62.
271. Gowrishankar K, Gunatilake D, Gallagher SJ, Tiffen J, Rizos H, Hersey P. Inducible but not constitutive expression of PD-L1 in human melanoma cells is dependent on activation of NF- κ B. *PLoS One.* 2015;10(4):e0123410.
272. Lim SO, Li CW, Xia W, Cha JH, Chan LC, Wu Y, et al. Deubiquitination and Stabilization of PD-L1 by CSN5. *Cancer Cell.* 2016 Dec 12;30(6):925–39.
273. Li D, Beisswenger C, Herr C, Hellberg J, Han G, Zakharkina T, et al. Myeloid cell RelA/p65 promotes lung cancer proliferation through Wnt/ β -catenin signaling in murine and human tumor cells. *Oncogene.* 2014 Mar;33(10):1239–48.

274. Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ, et al. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell*. 2004 Aug 6;118(3):285–96.
275. Li L, Han L, Sun F, Zhou J, Ohaegbulam KC, Tang X, et al. NF- κ B RelA renders tumor-associated macrophages resistant to and capable of directly suppressing CD8+ T cells for tumor promotion. *Oncoimmunology* [Internet]. 2018 Feb 27 [cited 2020 Dec 4];7(6). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5980414/>
276. Hagemann T, Wilson J, Kulbe H, Li NF, Leinster DA, Charles K, et al. Macrophages Induce Invasiveness of Epithelial Cancer Cells Via NF- κ B and JNK. *J Immunol*. 2005 Jul 15;175(2):1197–205.
277. Hagemann T, Lawrence T, McNeish I, Charles KA, Kulbe H, Thompson RG, et al. “Re-educating” tumor-associated macrophages by targeting NF-kappaB. *J Exp Med*. 2008 Jun 9;205(6):1261–8.
278. Achyut BR, Angara K, Jain M, Borin TF, Rashid MH, Iskander ASM, et al. Canonical NF κ B signaling in myeloid cells is required for the glioblastoma growth. *Sci Rep*. 2017 23;7(1):13754.
279. Suresh R, Barakat DJ, Barberi T, Zheng L, Jaffee E, Pienta KJ, et al. NF- κ B p50-deficient immature myeloid cell (p50-IMC) adoptive transfer slows the growth of murine prostate and pancreatic ductal carcinoma. *Open Access*. :12.
280. Porta C, Consonni FM, Morlacchi S, Sangaletti S, Bleva A, Totaro MG, et al. Tumor-Derived Prostaglandin E2 Promotes p50 NF- κ B-Dependent Differentiation of Monocytic MDSCs. *Cancer Res*. 2020 Jul 1;80(13):2874–88.
281. Yu J, Wang Y, Yan F, Zhang P, Li H, Zhao H, et al. Noncanonical NF- κ B Activation Mediates STAT3-stimulated IDO Upregulation in Myeloid-Derived Suppressor Cells in Breast Cancer. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2014 Sep 1;193(5):2574–86.
282. Ibrahim SA, Kulshrestha A, Katara GK, Riehl V, Sahoo M, Beaman KD. Cancer-associated V-ATPase induces delayed apoptosis of protumorigenic neutrophils. *Mol Oncol*. 2020 Mar;14(3):590–610.
283. Zhang X, Shi H, Yuan X, Jiang P, Qian H, Xu W. Tumor-derived exosomes induce N2 polarization of neutrophils to promote gastric cancer cell migration. *Mol Cancer*. 2018 06;17(1):146.
284. Lecot P, Sarabi M, Pereira Abrantes M, Mussard J, Koenderman L, Caux C, et al. Neutrophil Heterogeneity in Cancer: From Biology to Therapies. *Front Immunol*. 2019;10:2155.
285. Gao F, Shen J, Zhao L, Hao Q, Yang Y. Curcumin Alleviates Lipopolysaccharide (LPS)-Activated Neuroinflammation via Modulation of miR-199b-5p/I κ B Kinase β (IKK β)/Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) Pathway in Microglia. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res*. 2019 Dec 21;25:9801–10.
286. Hubert M, Gobbini E, Couillault C, Manh TPV, Doffin AC, Berthet J, et al. IFN-III is selectively produced by cDC1 and predicts good clinical outcome in breast cancer. *Sci Immunol*. 2020 Apr 17;5(46):eaav3942.
287. Salmon H, Idoyaga J, Rahman A, Leboeuf M, Remark R, Jordan S, et al. Expansion and Activation of CD103(+) Dendritic Cell Progenitors at the Tumor Site Enhances Tumor Responses to Therapeutic PD-L1 and BRAF Inhibition. *Immunity*. 2016 Apr 19;44(4):924–38.

288. Binnewies M, Mujal AM, Pollack JL, Combes AJ, Hardison EA, Barry KC, et al. Unleashing Type-2 Dendritic Cells to Drive Protective Antitumor CD4+ T Cell Immunity. *Cell*. 2019 18;177(3):556-571.e16.
289. Ouaaz F, Arron J, Zheng Y, Choi Y, Beg AA. Dendritic cell development and survival require distinct NF-kappaB subunits. *Immunity*. 2002 Feb;16(2):257-70.
290. Grumont R, Hochrein H, O'Keeffe M, Gugasyan R, White C, Caminschi I, et al. c-Rel regulates interleukin 12 p70 expression in CD8(+) dendritic cells by specifically inducing p35 gene transcription. *J Exp Med*. 2001 Oct 15;194(8):1021-32.
291. Wu L, D'Amico A, Winkel KD, Suter M, Lo D, Shortman K. RelB is essential for the development of myeloid-related CD8alpha- dendritic cells but not of lymphoid-related CD8alpha+ dendritic cells. *Immunity*. 1998 Dec;9(6):839-47.
292. Castiglioni P, Janssen EM, Prilliman KR, Gerloni M, Schoenberger S, Zanetti M. Cross-priming is under control of the relB gene. *Scand J Immunol*. 2002 Sep;56(3):219-23.
293. Katakam AK, Brightbill H, Franci C, Kung C, Nunez V, Jones C, et al. Dendritic cells require NIK for CD40-dependent cross-priming of CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Nov 24;112(47):14664-9.
294. Shih VFS, Davis-Turak J, Macal M, Huang JQ, Ponomarenko J, Kearns JD, et al. Control of RelB during dendritic cell activation integrates canonical and noncanonical NF-kB pathways. *Nat Immunol*. 2012 Dec;13(12):1162-70.
295. Hou Y, Liang H, Rao E, Zheng W, Huang X, Deng L, et al. Non-canonical NF-kB Antagonizes STING Sensor-Mediated DNA Sensing in Radiotherapy. *Immunity*. 2018 18;49(3):490-503.e4.
296. Lee JM, Mahtabifard A, Yamada R, Crystal RG, Korst RJ. Adenovirus vector-mediated overexpression of a truncated form of the p65 nuclear factor kappa B cDNA in dendritic cells enhances their function resulting in immune-mediated suppression of preexisting murine tumors. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2002 Nov;8(11):3561-9.
297. Dougan SK, Dougan M. Regulation of innate and adaptive antitumor immunity by IAP antagonists. *Immunotherapy*. 2018 Jul;10(9):787-96.
298. Garris CS, Arlauckas SP, Kohler RH, Trefny MP, Garren S, Piot C, et al. Successful Anti-PD-1 Cancer Immunotherapy Requires T Cell-Dendritic Cell Crosstalk Involving the Cytokines IFN-gamma and IL-12. *Immunity*. 2018 18;49(6):1148-1161.e7.
299. Tato CM, Villarino A, Caamaño JH, Boothby M, Hunter CA. Inhibition of NF-kappa B activity in T and NK cells results in defective effector cell expansion and production of IFN-gamma required for resistance to *Toxoplasma gondii*. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2003 Mar 15;170(6):3139-46.
300. Tato CM, Mason N, Artis D, Shapira S, Caamano JC, Bream JH, et al. Opposing roles of NF-kappaB family members in the regulation of NK cell proliferation and production of IFN-gamma. *Int Immunol*. 2006 Apr;18(4):505-13.
301. Xu Y, Evaristo C, Alegre ML, Gurbuxani S, Kee BL. Analysis of GzmbCre as a Model System for Gene Deletion in the Natural Killer Cell Lineage. *PloS One*. 2015;10(4):e0125211.

302. Ni J, Wang X, Stojanovic A, Zhang Q, Wincher M, Bühler L, et al. Single-Cell RNA Sequencing of Tumor-Infiltrating NK Cells Reveals that Inhibition of Transcription Factor HIF-1 α Unleashes NK Cell Activity. *Immunity*. 2020 Jun 16;52(6):1075-1087.e8.
303. Xie X, Ma L, Zhou Y, Shen W, Xu D, Dou J, et al. Polysaccharide enhanced NK cell cytotoxicity against pancreatic cancer via TLR4/MAPKs/NF- κ B pathway in vitro/vivo. *Carbohydr Polym*. 2019 Dec 1;225:115223.
304. Kubo M, Morisaki T, Matsumoto K, Tasaki A, Yamanaka N, Nakashima H, et al. Paclitaxel probably enhances cytotoxicity of natural killer cells against breast carcinoma cells by increasing perforin production. *Cancer Immunol Immunother CII*. 2005 May;54(5):468–76.
305. Wang X, Jasinski DL, Medina JL, Spencer DM, Foster AE, Bayle JH. Inducible MyD88/CD40 synergizes with IL-15 to enhance antitumor efficacy of CAR-NK cells. *Blood Adv*. 2020 May 12;4(9):1950–64.
306. Zheng Y, Li Y, Lian J, Yang H, Li F, Zhao S, et al. TNF- α -induced Tim-3 expression marks the dysfunction of infiltrating natural killer cells in human esophageal cancer. *J Transl Med*. 2019 May 20;17(1):165.
307. Wouters MCA, Nelson BH. Prognostic Significance of Tumor-Infiltrating B Cells and Plasma Cells in Human Cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2018 Dec 15;24(24):6125–35.
308. Dieu-Nosjean MC, Antoine M, Danel C, Heudes D, Wislez M, Poulot V, et al. Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2008 Sep 20;26(27):4410–7.
309. Hiraoka N, Ino Y, Yamazaki-Itoh R, Kanai Y, Kosuge T, Shimada K. Intratumoral tertiary lymphoid organ is a favourable prognosticator in patients with pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2015 May 26;112(11):1782–90.
310. Siliņa K, Rulle U, Kalniņa Z, Linē A. Manipulation of tumour-infiltrating B cells and tertiary lymphoid structures: a novel anti-cancer treatment avenue? *Cancer Immunol Immunother CII*. 2014 Jul;63(7):643–62.
311. Fridman WH, Zitvogel L, Sautès-Fridman C, Kroemer G. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017 Dec;14(12):717–34.
312. Gu-Trantien C, Loi S, Garaud S, Equeter C, Libin M, de Wind A, et al. CD4⁺ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J Clin Invest*. 2013 Jul;123(7):2873–92.
313. Niogret J, Berger H, Rebe C, Mary R, Ballot E, Truntzer C, et al. Follicular helper-T cells restore CD8⁺-dependent antitumor immunity and anti-PD-L1/PD-1 efficacy. *J Immunother Cancer*. 2021 Jun;9(6):e002157.
314. Brodt P, Gordon J. Anti-tumor immunity in B lymphocyte-deprived mice. I. Immunity to a chemically induced tumor. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1978 Jul;121(1):359–62.
315. Ammirante M, Luo JL, Grivennikov S, Nedospasov S, Karin M. B-cell-derived lymphotoxin promotes castration-resistant prostate cancer. *Nature*. 2010 Mar 11;464(7286):302–5.

316. Heise N, De Silva NS, Silva K, Carette A, Simonetti G, Pasparakis M, et al. Germinal center B cell maintenance and differentiation are controlled by distinct NF- κ B transcription factor subunits. *J Exp Med*. 2014 Sep 22;211(10):2103–18.
317. De Silva NS, Silva K, Anderson MM, Bhagat G, Klein U. Impairment of mature B-cell maintenance upon combined deletion of the alternative NF- κ B transcription factors RELB and NF- κ B2 in B cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2016 Mar 15;196(6):2591–601.
318. Almaden JV, Liu YC, Yang E, Otero DC, Birnbaum H, Davis-Turak J, et al. B-cell survival and development controlled by the coordination of NF- κ B family members RelB and cRel. *Blood*. 2016 Mar 10;127(10):1276–86.
319. Griss J, Bauer W, Wagner C, Simon M, Chen M, Grabmeier-Pfistershammer K, et al. B cells sustain inflammation and predict response to immune checkpoint blockade in human melanoma. *Nat Commun*. 2019 13;10(1):4186.
320. Barnes SE, Wang Y, Chen L, Molinero LL, Gajewski TF, Evaristo C, et al. T cell-NF- κ B activation is required for tumor control in vivo. *J Immunother Cancer*. 2015;3(1):1.
321. Evaristo C, Spranger S, Barnes SE, Miller ML, Molinero LL, Locke FL, et al. Cutting Edge: Engineering Active IKK β in T Cells Drives Tumor Rejection. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2016 Apr 1;196(7):2933–8.
322. Giordano M, Roncagalli R, Bourdely P, Chasson L, Buferne M, Yamasaki S, et al. The tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 (TNFAIP3, A20) imposes a brake on antitumor activity of CD8 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Jul 29;111(30):11115–20.
323. Barnes TA, Amir E. HYPE or HOPE: the prognostic value of infiltrating immune cells in cancer. *Br J Cancer*. 2017 Aug 8;117(4):451–60.
324. Zanetti M. Tapping CD4 T cells for cancer immunotherapy: the choice of personalized genomics. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2015 Mar 1;194(5):2049–56.
325. Borst J, Ahrends T, Bąbała N, Melief CJM, Kastenmüller W. CD4+ T cell help in cancer immunology and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2018 Oct;18(10):635–47.
326. Overacre-Delgoffe AE, Bumgarner HJ, Cillo AR, Burr AHP, Tometich JT, Bhattacharjee A, et al. Microbiota-specific T follicular helper cells drive tertiary lymphoid structures and anti-tumor immunity against colorectal cancer. *Immunity*. 2021 Dec 14;54(12):2812-2824.e4.
327. Quezada SA, Simpson TR, Peggs KS, Merghoub T, Vider J, Fan X, et al. Tumor-reactive CD4(+) T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *J Exp Med*. 2010 Mar 15;207(3):637–50.
328. Oh DY, Fong L. Cytotoxic CD4+ T cells in cancer: Expanding the immune effector toolbox. *Immunity*. 2021 Dec 14;54(12):2701–11.
329. Ghosh P, Sica A, Young HA, Ye J, Franco JL, Wiltrott RH, et al. Alterations in NF kappa B/Rel family proteins in splenic T-cells from tumor-bearing mice and reversal following therapy. *Cancer Res*. 1994 Jun 1;54(11):2969–72.

330. Li X, Liu J, Park JK, Hamilton TA, Rayman P, Klein E, et al. T cells from renal cell carcinoma patients exhibit an abnormal pattern of kappa B-specific DNA-binding activity: a preliminary report. *Cancer Res.* 1994 Oct 15;54(20):5424–9.
331. Wesseling-Rozendaal Y, van Doorn A, Willard-Gallo K, van de Stolpe A. Characterization of Immunoactive and Immunotolerant CD4+ T Cells in Breast Cancer by Measuring Activity of Signaling Pathways That Determine Immune Cell Function. *Cancers.* 2022 Jan 19;14(3):490.
332. Ossendorp F, Mengedé E, Camps M, Filius R, Melief CJ. Specific T helper cell requirement for optimal induction of cytotoxic T lymphocytes against major histocompatibility complex class II negative tumors. *J Exp Med.* 1998 Mar 2;187(5):693–702.
333. Ahrends T, Spanjaard A, Pilzecker B, Bąbała N, Bovens A, Xiao Y, et al. CD4+ T Cell Help Confers a Cytotoxic T Cell Effector Program Including Coinhibitory Receptor Downregulation and Increased Tissue Invasiveness. *Immunity.* 2017 Nov 21;47(5):848-861.e5.
334. Diehl L, den Boer AT, Schoenberger SP, van der Voort EI, Schumacher TN, Melief CJ, et al. CD40 activation in vivo overcomes peptide-induced peripheral cytotoxic T-lymphocyte tolerance and augments anti-tumor vaccine efficacy. *Nat Med.* 1999 Jul;5(7):774–9.
335. Sahin U, Derhovanessian E, Miller M, Kloke BP, Simon P, Löwer M, et al. Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. *Nature.* 2017 Jul 13;547(7662):222–6.
336. Eickhoff S, Brewitz A, Gerner MY, Klauschen F, Komander K, Hemmi H, et al. Robust Anti-viral Immunity Requires Multiple Distinct T Cell-Dendritic Cell Interactions. *Cell.* 2015 Sep 10;162(6):1322–37.
337. Hor JL, Whitney PG, Zaid A, Brooks AG, Heath WR, Mueller SN. Spatiotemporally Distinct Interactions with Dendritic Cell Subsets Facilitates CD4+ and CD8+ T Cell Activation to Localized Viral Infection. *Immunity.* 2015 Sep 15;43(3):554–65.
338. Prilliman KR, Lemmens EE, Palioungas G, Wolfe TG, Allison JP, Sharpe AH, et al. Cutting edge: a crucial role for B7-CD28 in transmitting T help from APC to CTL. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2002 Oct 15;169(8):4094–7.
339. Bullock TNJ, Yagita H. Induction of CD70 on dendritic cells through CD40 or TLR stimulation contributes to the development of CD8+ T cell responses in the absence of CD4+ T cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2005 Jan 15;174(2):710–7.
340. Greyer M, Whitney PG, Stock AT, Davey GM, Tebartz C, Bachem A, et al. T Cell Help Amplifies Innate Signals in CD8(+) DCs for Optimal CD8(+) T Cell Priming. *Cell Rep.* 2016 Jan 26;14(3):586–97.
341. Wilson EB, Livingstone AM. Cutting edge: CD4+ T cell-derived IL-2 is essential for help-dependent primary CD8+ T cell responses. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2008 Dec 1;181(11):7445–8.
342. Srahna M, Remacle JE, Annamalai K, Pype S, Huylebroeck D, Boogaerts MA, et al. NF-kappaB is involved in the regulation of CD154 (CD40 ligand) expression in primary human T cells. *Clin Exp Immunol.* 2001 Aug;125(2):229–36.

343. Curtis C, Shah SP, Chin SF, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*. 2012 Apr 18;486(7403):346–52.
344. Ascierto ML, Kmieciak M, Idowu MO, Manjili R, Zhao Y, Grimes M, et al. A signature of immune function genes associated with recurrence-free survival in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2012 Feb;131(3):871–80.
345. Camus M, Tosolini M, Mlecnik B, Pagès F, Kirilovsky A, Berger A, et al. Coordination of intratumoral immune reaction and human colorectal cancer recurrence. *Cancer Res*. 2009 Mar 15;69(6):2685–93.
346. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006 Sep 29;313(5795):1960–4.
347. Bos R, Sherman LA. CD4+ T-cell help in the tumor milieu is required for recruitment and cytolytic function of CD8+ T lymphocytes. *Cancer Res*. 2010 Nov 1;70(21):8368–77.
348. Oldford SA, Robb JD, Codner D, Gadag V, Watson PH, Drover S. Tumor cell expression of HLA-DM associates with a Th1 profile and predicts improved survival in breast carcinoma patients. *Int Immunol*. 2006 Nov;18(11):1591–602.
349. Kambayashi T, Laufer TM. Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: can anything replace a dendritic cell? *Nat Rev Immunol*. 2014 Nov;14(11):719–30.
350. House IG, Savas P, Lai J, Chen AXY, Oliver AJ, Teo ZL, et al. Macrophage-Derived CXCL9 and CXCL10 Are Required for Antitumor Immune Responses Following Immune Checkpoint Blockade. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2020 Jan 15;26(2):487–504.
351. Jabrane-Ferrat N, Faille A, Loiseau P, Poirier O, Charron D, Calvo F. Effect of gamma interferon on HLA class-I and -II transcription and protein expression in human breast adenocarcinoma cell lines. *Int J Cancer*. 1990 Jun 15;45(6):1169–76.
352. Li X, Dong L, Liu J, Wang C, Zhang Y, Mei Q, et al. Low-Dose Decitabine Augments the Activation and Anti-Tumor Immune Response of IFN- γ + CD4+ T Cells Through Enhancing I κ B α Degradation and NF- κ B Activation. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:647713.
353. De Monte L, Reni M, Tassi E, Clavenna D, Papa I, Recalde H, et al. Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopoietin production and reduced survival in pancreatic cancer. *J Exp Med*. 2011 Mar 14;208(3):469–78.
354. Yoon NK, Maresh EL, Shen D, Elshimali Y, Apple S, Horvath S, et al. Higher levels of GATA3 predict better survival in women with breast cancer. *Hum Pathol*. 2010 Dec;41(12):1794–801.
355. Schreck S, Friebel D, Buettner M, Distel L, Grabenbauer G, Young LS, et al. Prognostic impact of tumour-infiltrating Th2 and regulatory T cells in classical Hodgkin lymphoma. *Hematol Oncol*. 2009 Mar;27(1):31–9.

356. Kitajima M, Ito T, Tumes DJ, Endo Y, Onodera A, Hashimoto K, et al. Memory type 2 helper T cells induce long-lasting antitumor immunity by activating natural killer cells. *Cancer Res.* 2011 Jul 15;71(14):4790–8.
357. Kusuda T, Shigemasa K, Arihiro K, Fujii T, Nagai N, Ohama K. Relative expression levels of Th1 and Th2 cytokine mRNA are independent prognostic factors in patients with ovarian cancer. *Oncol Rep.* 2005 Jun;13(6):1153–8.
358. Boieri M, Malishkevich A, Guennoun R, Marchese E, Kroon S, Trerice KE, et al. CD4+ T helper 2 cells suppress breast cancer by inducing terminal differentiation. *J Exp Med.* 2022 Jul 4;219(7):e20201963.
359. Lazarski CA, Ford J, Katzman SD, Rosenberg AF, Fowell DJ. IL-4 attenuates Th1-associated chemokine expression and Th1 trafficking to inflamed tissues and limits pathogen clearance. *PLoS One.* 2013;8(8):e71949.
360. Fischer M, Bijman M, Molin D, Cormont F, Uyttenhove C, van Snick J, et al. Increased serum levels of interleukin-9 correlate to negative prognostic factors in Hodgkin's lymphoma. *Leukemia.* 2003 Dec;17(12):2513–6.
361. Salazar Y, Zheng X, Brunn D, Raifer H, Picard F, Zhang Y, et al. Microenvironmental Th9 and Th17 lymphocytes induce metastatic spreading in lung cancer. *J Clin Invest.* 2020 Jul 1;130(7):3560–75.
362. Shen Y, Song Z, Lu X, Ma Z, Lu C, Zhang B, et al. Fas signaling-mediated TH9 cell differentiation favors bowel inflammation and antitumor functions. *Nat Commun.* 2019 Jul 2;10(1):2924.
363. Sek K, Chan CW, Beavis PA, Darcy PK. Adoptive transfer of tumor-specific Th9 cells eradicates heterogeneous antigen-expressing tumor cells. *Cancer Cell.* 2021 Dec 13;39(12):1564–6.
364. Lu L, Pan K, Zheng HX, Li JJ, Qiu HJ, Zhao JJ, et al. IL-17A promotes immune cell recruitment in human esophageal cancers and the infiltrating dendritic cells represent a positive prognostic marker for patient survival. *J Immunother Hagerstown Md 1997.* 2013 Oct;36(8):451–8.
365. Végran F, Apetoh L, Ghiringhelli F. Th9 cells: a novel CD4 T-cell subset in the immune war against cancer. *Cancer Res.* 2015 Feb 1;75(3):475–9.
366. Purwar R, Schlapbach C, Xiao S, Kang HS, Elyaman W, Jiang X, et al. Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin-9-producing T cells. *Nat Med.* 2012 Aug;18(8):1248–53.
367. Xue G, Zheng N, Fang J, Jin G, Li X, Dotti G, et al. Adoptive cell therapy with tumor-specific Th9 cells induces viral mimicry to eliminate antigen-loss-variant tumor cells. *Cancer Cell.* 2021 Dec 13;39(12):1610-1622.e9.
368. Xue G, Jin G, Fang J, Lu Y. IL-4 together with IL-1 β induces antitumor Th9 cell differentiation in the absence of TGF- β signaling. *Nat Commun.* 2019 Mar 26;10(1):1376.
369. Pan B, Shen J, Cao J, Zhou Y, Shang L, Jin S, et al. Interleukin-17 promotes angiogenesis by stimulating VEGF production of cancer cells via the STAT3/GIV signaling pathway in non-small-cell lung cancer. *Sci Rep.* 2015 Nov 3;5:16053.

370. Liu J, Duan Y, Cheng X, Chen X, Xie W, Long H, et al. IL-17 is associated with poor prognosis and promotes angiogenesis via stimulating VEGF production of cancer cells in colorectal carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Apr 8;407(2):348–54.
371. He S, Fei M, Wu Y, Zheng D, Wan D, Wang L, et al. Distribution and clinical significance of Th17 cells in the tumor microenvironment and peripheral blood of pancreatic cancer patients. *Int J Mol Sci*. 2011;12(11):7424–37.
372. Zhang JP, Yan J, Xu J, Pang XH, Chen MS, Li L, et al. Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *J Hepatol*. 2009 May;50(5):980–9.
373. Ye ZJ, Zhou Q, Gu YY, Qin SM, Ma WL, Xin JB, et al. Generation and differentiation of IL-17-producing CD4+ T cells in malignant pleural effusion. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2010 Nov 15;185(10):6348–54.
374. Lv L, Pan K, Li X dong, She K lin, Zhao J jing, Wang W, et al. The accumulation and prognosis value of tumor infiltrating IL-17 producing cells in esophageal squamous cell carcinoma. *PloS One*. 2011 Mar 31;6(3):e18219.
375. Sfanos KS, Bruno TC, Maris CH, Xu L, Thoburn CJ, DeMarzo AM, et al. Phenotypic analysis of prostate-infiltrating lymphocytes reveals TH17 and Treg skewing. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2008 Jun 1;14(11):3254–61.
376. Alves JJP, De Medeiros Fernandes TAA, De Araújo JMG, Cobucci RNO, Lanza DCF, Bezerra FL, et al. Th17 response in patients with cervical cancer. *Oncol Lett*. 2018 Nov;16(5):6215–27.
377. Li J, Lau GKK, Chen L, Dong S sui, Lan HY, Huang XR, et al. Interleukin 17A promotes hepatocellular carcinoma metastasis via NF-kB induced matrix metalloproteinases 2 and 9 expression. *PloS One*. 2011;6(7):e21816.
378. Fabre JAS, Giustinniani J, Garbar C, Merrouche Y, Antonicelli F, Bensussan A. The Interleukin-17 Family of Cytokines in Breast Cancer. *Int J Mol Sci*. 2018 Dec 4;19(12):E3880.
379. Xiang T, Long H, He L, Han X, Lin K, Liang Z, et al. Interleukin-17 produced by tumor microenvironment promotes self-renewal of CD133+ cancer stem-like cells in ovarian cancer. *Oncogene*. 2015 Jan 8;34(2):165–76.
380. Furuta S, Jeng YM, Zhou L, Huang L, Kuhn I, Bissell MJ, et al. IL-25 causes apoptosis of IL-25R-expressing breast cancer cells without toxicity to nonmalignant cells. *Sci Transl Med*. 2011 Apr 13;3(78):78ra31.
381. He D, Li H, Yusuf N, Elmets CA, Li J, Mountz JD, et al. IL-17 promotes tumor development through the induction of tumor promoting microenvironments at tumor sites and myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2010 Mar 1;184(5):2281–8.
382. Al Omar S, Flanagan BF, Almeahmadi M, Christmas SE. The effects of IL-17 upon human natural killer cells. *Cytokine*. 2013 Apr;62(1):123–30.
383. Kryczek I, Wei S, Szeliga W, Vatan L, Zou W. Endogenous IL-17 contributes to reduced tumor growth and metastasis. *Blood*. 2009 Jul 9;114(2):357–9.

384. Cillo AR, Kürten CHL, Tabib T, Qi Z, Onkar S, Wang T, et al. Immune Landscape of Viral- and Carcinogen-Driven Head and Neck Cancer. *Immunity*. 2020 Jan 14;52(1):183-199.e9.
385. Helmink BA, Reddy SM, Gao J, Zhang S, Basar R, Thakur R, et al. B cells and tertiary lymphoid structures promote immunotherapy response. *Nature*. 2020 Jan;577(7791):549–55.
386. Petitprez F, de Reyniès A, Keung EZ, Chen TWW, Sun CM, Calderaro J, et al. B cells are associated with survival and immunotherapy response in sarcoma. *Nature*. 2020 Jan;577(7791):556–60.
387. Cabrita R, Lauss M, Sanna A, Donia M, Skaarup Larsen M, Mitra S, et al. Tertiary lymphoid structures improve immunotherapy and survival in melanoma. *Nature*. 2020 Jan;577(7791):561–5.
388. Hollern DP, Xu N, Thennavan A, Glodowski C, Garcia-Recio S, Mott KR, et al. B Cells and T Follicular Helper Cells Mediate Response to Checkpoint Inhibitors in High Mutation Burden Mouse Models of Breast Cancer. *Cell*. 2019 Nov 14;179(5):1191-1206.e21.
389. Zander R, Schauder D, Xin G, Nguyen C, Wu X, Zajac A, et al. CD4+ T Cell Help Is Required for the Formation of a Cytolytic CD8+ T Cell Subset that Protects against Chronic Infection and Cancer. *Immunity*. 2019 Dec 17;51(6):1028-1042.e4.
390. Cui C, Wang J, Fagerberg E, Chen PM, Connolly KA, Damo M, et al. Neoantigen-driven B cell and CD4 T follicular helper cell collaboration promotes anti-tumor CD8 T cell responses. *Cell*. 2021 Dec 9;184(25):6101-6118.e13.
391. Hirschhorn-Cymerman D, Budhu S, Kitano S, Liu C, Zhao F, Zhong H, et al. Induction of tumoricidal function in CD4+ T cells is associated with concomitant memory and terminally differentiated phenotype. *J Exp Med*. 2012 Oct 22;209(11):2113–26.
392. So T, Croft M. Regulation of the PKC θ -NF- κ B Axis in T Lymphocytes by the Tumor Necrosis Factor Receptor Family Member OX40. *Front Immunol*. 2012;3:133.
393. Song J, So T, Croft M. Activation of NF- κ B1 by OX40 contributes to antigen-driven T cell expansion and survival. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2008 Jun 1;180(11):7240–8.
394. Zhang H, Li F, Cao J, Wang X, Cheng H, Qi K, et al. A chimeric antigen receptor with antigen-independent OX40 signaling mediates potent antitumor activity. *Sci Transl Med*. 2021 Jan 27;13(578):eaba7308.
395. Guo X, Zhang Y, Zheng L, Zheng C, Song J, Zhang Q, et al. Global characterization of T cells in non-small-cell lung cancer by single-cell sequencing. *Nat Med*. 2018 Jul;24(7):978–85.
396. Zhang Q, He Y, Luo N, Patel SJ, Han Y, Gao R, et al. Landscape and Dynamics of Single Immune Cells in Hepatocellular Carcinoma. *Cell*. 2019 Oct 31;179(4):829-845.e20.
397. Oh DY, Kwek SS, Raju SS, Li T, McCarthy E, Chow E, et al. Intratumoral CD4+ T Cells Mediate Anti-tumor Cytotoxicity in Human Bladder Cancer. *Cell*. 2020 Jun 25;181(7):1612-1625.e13.
398. Azizi E, Carr AJ, Plitas G, Cornish AE, Konopacki C, Prabhakaran S, et al. Single-Cell Map of Diverse Immune Phenotypes in the Breast Tumor Microenvironment. *Cell*. 2018 Aug 23;174(5):1293-1308.e36.

399. Zhang Y, Chen H, Mo H, Hu X, Gao R, Zhao Y, et al. Single-cell analyses reveal key immune cell subsets associated with response to PD-L1 blockade in triple-negative breast cancer. *Cancer Cell*. 2021 Dec 13;39(12):1578-1593.e8.
400. Puram SV, Tirosh I, Parikh AS, Patel AP, Yizhak K, Gillespie S, et al. Single-Cell Transcriptomic Analysis of Primary and Metastatic Tumor Ecosystems in Head and Neck Cancer. *Cell*. 2017 Dec 14;171(7):1611-1624.e24.
401. Cachot A, Bilous M, Liu YC, Li X, Saillard M, Cenerenti M, et al. Tumor-specific cytolytic CD4 T cells mediate immunity against human cancer. *Sci Adv*. 2021 Feb;7(9):eabe3348.
402. Huang C, Bi E, Hu Y, Deng W, Tian Z, Dong C, et al. A novel NF-kappaB binding site controls human granzyme B gene transcription. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2006 Apr 1;176(7):4173–81.
403. Blank CU, Haining WN, Held W, Hogan PG, Kallies A, Lugli E, et al. Defining “T cell exhaustion.” *Nat Rev Immunol*. 2019 Nov;19(11):665–74.
404. Balança CC, Salvioni A, Scarlata CM, Michelas M, Martinez-Gomez C, Gomez-Roca C, et al. PD-1 blockade restores helper activity of tumor-infiltrating, exhausted PD-1hiCD39+ CD4 T cells. *JCI Insight*. 2021 Jan 25;6(2):142513.
405. Hwang S, Cobb DA, Bhadra R, Youngblood B, Khan IA. Blimp-1-mediated CD4 T cell exhaustion causes CD8 T cell dysfunction during chronic toxoplasmosis. *J Exp Med*. 2016 Aug 22;213(9):1799–818.
406. Maine CJ, Teijaro JR, Marquardt K, Sherman LA. PTPN22 contributes to exhaustion of T lymphocytes during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Nov 15;113(46):E7231–9.
407. Jadhav RR, Im SJ, Hu B, Hashimoto M, Li P, Lin JX, et al. Epigenetic signature of PD-1+ TCF1+ CD8 T cells that act as resource cells during chronic viral infection and respond to PD-1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Jul 9;116(28):14113–8.
408. Saxena M, van der Burg SH, Melief CJM, Bhardwaj N. Therapeutic cancer vaccines. *Nat Rev Cancer*. 2021 Jun;21(6):360–78.
409. Koski GK, Koldovsky U, Xu S, Mick R, Sharma A, Fitzpatrick E, et al. A novel dendritic cell-based immunization approach for the induction of durable Th1-polarized anti-HER-2/neu responses in women with early breast cancer. *J Immunother Hagerstown Md 1997*. 2012 Jan;35(1):54–65.
410. Sharma A, Koldovsky U, Xu S, Mick R, Roses R, Fitzpatrick E, et al. HER-2 pulsed dendritic cell vaccine can eliminate HER-2 expression and impact ductal carcinoma in situ. *Cancer*. 2012 Sep 1;118(17):4354–62.
411. Lowenfeld L, Mick R, Datta J, Xu S, Fitzpatrick E, Fisher CS, et al. Dendritic Cell Vaccination Enhances Immune Responses and Induces Regression of HER2pos DCIS Independent of Route: Results of Randomized Selection Design Trial. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2017 Jun 15;23(12):2961–71.
412. Gross G, Waks T, Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Dec;86(24):10024–8.

413. Imai C, Mihara K, Andreansky M, Nicholson IC, Pui CH, Geiger TL, et al. Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2004 Apr;18(4):676–84.
414. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, Aplenc R, Porter DL, Rheingold SR, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med*. 2013 Apr 18;368(16):1509–18.
415. Koneru M, Purdon TJ, Spriggs D, Koneru S, Brentjens RJ. IL-12 secreting tumor-targeted chimeric antigen receptor T cells eradicate ovarian tumors in vivo. *Oncoimmunology*. 2015 Jan 23;4(3):e994446.
416. Yang Y, Kohler ME, Chien CD, Sauter CT, Jacoby E, Yan C, et al. TCR engagement negatively affects CD8 but not CD4 CAR T cell expansion and leukemic clearance. *Sci Transl Med*. 2017 Nov 22;9(417):eaag1209.
417. Boulch M, Cazaux M, Loe-Mie Y, Thibaut R, Corre B, Lemaître F, et al. A cross-talk between CAR T cell subsets and the tumor microenvironment is essential for sustained cytotoxic activity. *Sci Immunol*. 2021 Mar 26;6(57):eabd4344.
418. Wang D, Aguilar B, Starr R, Alizadeh D, Brito A, Sarkissian A, et al. Glioblastoma-targeted CD4+ CAR T cells mediate superior antitumor activity. *JCI Insight*. 2018 May 17;3(10):99048.
419. Agarwal S, Hanauer JDS, Frank AM, Riechert V, Thalheimer FB, Buchholz CJ. In Vivo Generation of CAR T Cells Selectively in Human CD4+ Lymphocytes. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. 2020 Aug 5;28(8):1783–94.
420. Shah NN, Highfill SL, Shalabi H, Yates B, Jin J, Wolters PL, et al. CD4/CD8 T-Cell Selection Affects Chimeric Antigen Receptor (CAR) T-Cell Potency and Toxicity: Updated Results From a Phase I Anti-CD22 CAR T-Cell Trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2020 Jun 10;38(17):1938–50.
421. Sommermeyer D, Hudecek M, Kosasih PL, Gogishvili T, Maloney DG, Turtle CJ, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells derived from defined CD8+ and CD4+ subsets confer superior antitumor reactivity in vivo. *Leukemia*. 2016 Feb;30(2):492–500.
422. Dong MB, Wang G, Chow RD, Ye L, Zhu L, Dai X, et al. Systematic Immunotherapy Target Discovery Using Genome-Scale In Vivo CRISPR Screens in CD8 T Cells. *Cell*. 2019 Aug 22;178(5):1189–1204.e23.
423. Walker LSK, Sansom DM. Confusing signals: Recent progress in CTLA-4 biology. *Trends Immunol*. 2015 Feb;36(2):63–70.
424. Corse E, Allison JP. Cutting edge: CTLA-4 on effector T cells inhibits in trans. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2012 Aug 1;189(3):1123–7.
425. Hodi FS, O’Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010 Aug 19;363(8):711–23.
426. Home - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2022 Jul 16]. Available from: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/home>

427. Arce Vargas F, Furness AJS, Litchfield K, Joshi K, Rosenthal R, Ghorani E, et al. Fc Effector Function Contributes to the Activity of Human Anti-CTLA-4 Antibodies. *Cancer Cell*. 2018 Apr 9;33(4):649-663.e4.
428. Sharma A, Subudhi SK, Blando J, Scutti J, Vence L, Wargo J, et al. Anti-CTLA-4 Immunotherapy Does Not Deplete FOXP3+ Regulatory T Cells (Tregs) in Human Cancers. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2019 Feb 15;25(4):1233–8.
429. Wei SC, Anang NAAS, Sharma R, Andrews MC, Reuben A, Levine JH, et al. Combination anti-CTLA-4 plus anti-PD-1 checkpoint blockade utilizes cellular mechanisms partially distinct from monotherapies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Nov 5;116(45):22699–709.
430. Jiao S, Subudhi SK, Aparicio A, Ge Z, Guan B, Miura Y, et al. Differences in Tumor Microenvironment Dictate T Helper Lineage Polarization and Response to Immune Checkpoint Therapy. *Cell*. 2019 Nov 14;179(5):1177-1190.e13.
431. Poole RM. Pembrolizumab: first global approval. *Drugs*. 2014 Oct;74(16):1973–81.
432. Robert C, Schachter J, Long GV, Arance A, Grob JJ, Mortier L, et al. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med*. 2015 Jun 25;372(26):2521–32.
433. Simeone E, Grimaldi AM, Festino L, Giannarelli D, Vanella V, Palla M, et al. Correlation between previous treatment with BRAF inhibitors and clinical response to pembrolizumab in patients with advanced melanoma. *Oncoimmunology*. 2017 Jan 19;6(3):e1283462.
434. Cercek A, Lumish M, Sinopoli J, Weiss J, Shia J, Lamendola-Essel M, et al. PD-1 Blockade in Mismatch Repair-Deficient, Locally Advanced Rectal Cancer. *N Engl J Med*. 2022 Jun 23;386(25):2363–76.
435. Gao J, Navai N, Alhalabi O, Siefker-Radtke A, Campbell MT, Tidwell RS, et al. Neoadjuvant PD-L1 plus CTLA-4 blockade in patients with cisplatin-ineligible operable high-risk urothelial carcinoma. *Nat Med*. 2020 Dec;26(12):1845–51.
436. Nagasaki J, Togashi Y, Sugawara T, Itami M, Yamauchi N, Yuda J, et al. The critical role of CD4+ T cells in PD-1 blockade against MHC-II-expressing tumors such as classic Hodgkin lymphoma. *Blood Adv*. 2020 Sep 8;4(17):4069–82.
437. Giladi A, Cohen M, Medaglia C, Baran Y, Li B, Zada M, et al. Dissecting cellular crosstalk by sequencing physically interacting cells. *Nat Biotechnol*. 2020 May;38(5):629–37.
438. Cohen M, Giladi A, Barboy O, Hamon P, Li B, Zada M, et al. The interaction of CD4+ helper T cells with dendritic cells shapes the tumor microenvironment and immune checkpoint blockade response. *Nat Cancer*. 2022 Mar;3(3):303–17.
439. Amato CM, Hintzsche JD, Wells K, Applegate A, Gorden NT, Vorwald VM, et al. Pre-Treatment Mutational and Transcriptomic Landscape of Responding Metastatic Melanoma Patients to Anti-PD1 Immunotherapy. *Cancers*. 2020 Jul 17;12(7):E1943.
440. Grasso CS, Tsoi J, Onyshchenko M, Abril-Rodriguez G, Ross-Macdonald P, Wind-Rotolo M, et al. Conserved Interferon- γ Signaling Drives Clinical Response to Immune Checkpoint Blockade Therapy in Melanoma. *Cancer Cell*. 2020 Oct 12;38(4):500-515.e3.

441. Roh W, Chen PL, Reuben A, Spencer CN, Prieto PA, Miller JP, et al. Integrated molecular analysis of tumor biopsies on sequential CTLA-4 and PD-1 blockade reveals markers of response and resistance. *Sci Transl Med*. 2017 Mar 1;9(379):eaah3560.
442. Harlin H, Hwang KW, Palucki DA, Kim O, Thompson CB, Boothby M, et al. CTLA-4 engagement regulates NF-kappaB activation in vivo. *Eur J Immunol*. 2002 Aug;32(8):2095–104.
443. Pioli C, Gatta L, Frasca D, Doria G. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) inhibits CD28-induced IkkappaBalpha degradation and RelA activation. *Eur J Immunol*. 1999 Mar;29(3):856–63.
444. Arasanz H, Gato-Cañas M, Zuazo M, Ibañez-Vea M, Breckpot K, Kochan G, et al. PD1 signal transduction pathways in T cells. *Oncotarget*. 2017 Aug 1;8(31):51936–45.
445. Jutz S, Hennig A, Paster W, Asrak Ö, Dijanovic D, Kellner F, et al. A cellular platform for the evaluation of immune checkpoint molecules. *Oncotarget*. 2017 Sep 12;8(39):64892–906.
446. Kraehenbuehl L, Weng CH, Eghbali S, Wolchok JD, Merghoub T. Enhancing immunotherapy in cancer by targeting emerging immunomodulatory pathways. *Nat Rev Clin Oncol*. 2022 Jan;19(1):37–50.
447. Tawbi HA, Schadendorf D, Lipson EJ, Ascierto PA, Matamala L, Castillo Gutiérrez E, et al. Relatlimab and Nivolumab versus Nivolumab in Untreated Advanced Melanoma. *N Engl J Med*. 2022 Jan 6;386(1):24–34.
448. Hirschhorn-Cymerman D, Rizzuto GA, Merghoub T, Cohen AD, Avogadri F, Lesokhin AM, et al. OX40 engagement and chemotherapy combination provides potent antitumor immunity with concomitant regulatory T cell apoptosis. *J Exp Med*. 2009 May 11;206(5):1103–16.
449. Cohen AD, Diab A, Perales MA, Wolchok JD, Rizzuto G, Merghoub T, et al. Agonist anti-GITR antibody enhances vaccine-induced CD8(+) T-cell responses and tumor immunity. *Cancer Res*. 2006 May 1;66(9):4904–12.
450. Zappasodi R, Sirard C, Li Y, Budhu S, Abu-Akeel M, Liu C, et al. Rational design of anti-GITR-based combination immunotherapy. *Nat Med*. 2019 May;25(5):759–66.
451. Tran B, Carvajal RD, Marabelle A, Patel SP, LoRusso PM, Rasmussen E, et al. Dose escalation results from a first-in-human, phase 1 study of glucocorticoid-induced TNF receptor-related protein agonist AMG 228 in patients with advanced solid tumors. *J Immunother Cancer*. 2018 Sep 25;6(1):93.
452. Heinhuis KM, Carlino M, Joerger M, Di Nicola M, Meniawy T, Rottey S, et al. Safety, Tolerability, and Potential Clinical Activity of a Glucocorticoid-Induced TNF Receptor-Related Protein Agonist Alone or in Combination With Nivolumab for Patients With Advanced Solid Tumors: A Phase 1/2a Dose-Escalation and Cohort-Expansion Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2020 Jan 1;6(1):100–7.
453. Gutierrez M, Moreno V, Heinhuis KM, Olszanski AJ, Spreafico A, Ong M, et al. OX40 Agonist BMS-986178 Alone or in Combination With Nivolumab and/or Ipilimumab in Patients With Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2021 Jan 15;27(2):460–72.

454. Segal NH, He AR, Doi T, Levy R, Bhatia S, Pishvaian MJ, et al. Phase I Study of Single-Agent Utomilumab (PF-05082566), a 4-1BB/CD137 Agonist, in Patients with Advanced Cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2018 Apr 15;24(8):1816–23.
455. Segal NH, Logan TF, Hodi FS, McDermott D, Melero I, Hamid O, et al. Results from an Integrated Safety Analysis of Urelumab, an Agonist Anti-CD137 Monoclonal Antibody. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2017 Apr 15;23(8):1929–36.
456. Définition et chiffres - Fondation Sclérose en plaques [Internet]. [cited 2022 May 23]. Available from: <https://www.arsep.org/fr/168-d%C3%A9finition%20et%20chiffres.html>
457. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. Multiple sclerosis genomic map implicates peripheral immune cells and microglia in susceptibility. *Science*. 2019 Sep 27;365(6460):eaav7188.
458. Patsopoulos NA, Barcellos LF, Hintzen RQ, Schaefer C, van Duijn CM, Noble JA, et al. Fine-Mapping the Genetic Association of the Major Histocompatibility Complex in Multiple Sclerosis: HLA and Non-HLA Effects. *PLoS Genet*. 2013 Nov 21;9(11):e1003926.
459. Housley WJ, Fernandez SD, Vera K, Murikinati SR, Grutzendler J, Cuerdon N, et al. Genetic variants associated with autoimmunity drive NF κ B signaling and responses to inflammatory stimuli. *Sci Transl Med*. 2015 Jun 10;7(291):291ra93.
460. Belbasis L, Bellou V, Evangelou E, Ioannidis JPA, Tzoulaki I. Environmental risk factors and multiple sclerosis: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Lancet Neurol*. 2015 Mar;14(3):263–73.
461. Lünemann JD, Tintoré M, Messmer B, Strowig T, Rovira Á, Perkal H, et al. Elevated EBNA1 Immune Responses Predict Conversion to Multiple Sclerosis. *Ann Neurol*. 2010 Feb;67(2):159–69.
462. Handel AE, Williamson AJ, Disanto G, Handunnetthi L, Giovannoni G, Ramagopalan SV. An updated meta-analysis of risk of multiple sclerosis following infectious mononucleosis. *PLoS One*. 2010 Sep 1;5(9):e12496.
463. Bjernevik K, Cortese M, Healy BC, Kuhle J, Mina MJ, Leng Y, et al. Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science*. 2022 Jan 21;375(6578):296–301.
464. Jacobs BM, Giovannoni G, Cuzick J, Dobson R. Systematic review and meta-analysis of the association between Epstein-Barr virus, multiple sclerosis and other risk factors. *Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl*. 2020 Oct;26(11):1281–97.
465. Vesterinen HM, Sena ES, French-Constant C, Williams A, Chandran S, Macleod MR. Improving the translational hit of experimental treatments in multiple sclerosis. *Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl*. 2010 Sep;16(9):1044–55.
466. Hooke - Contract Research - Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) - Mouse EAE scoring [Internet]. [cited 2022 Jun 2]. Available from: <https://hookelabs.com/services/cro/eae/MouseEAEScoring.html>

467. Burrows DJ, McGown A, Jain SA, De Felice M, Ramesh TM, Sharrack B, et al. Animal models of multiple sclerosis: From rodents to zebrafish. *Mult Scler* Houndmills Basingstoke Engl. 2019 Mar;25(3):306–24.
468. Paterson PY. Transfer of allergic encephalomyelitis in rats by means of lymph node cells. *J Exp Med*. 1960 Jan 1;111:119–36.
469. Flügel A, Berkowicz T, Ritter T, Labeur M, Jenne DE, Li Z, et al. Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunity*. 2001 May;14(5):547–60.
470. Lafaille JJ, Nagashima K, Katsuki M, Tonegawa S. High incidence of spontaneous autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Cell*. 1994 Aug 12;78(3):399–408.
471. Pöllinger B, Krishnamoorthy G, Berer K, Lassmann H, Bösl MR, Dunn R, et al. Spontaneous relapsing-remitting EAE in the SJL/J mouse: MOG-reactive transgenic T cells recruit endogenous MOG-specific B cells. *J Exp Med*. 2009 Jun 8;206(6):1303–16.
472. Madsen LS, Andersson EC, Jansson L, Krogsgaard M, Andersen CB, Engberg J, et al. A humanized model for multiple sclerosis using HLA-DR2 and a human T-cell receptor. *Nat Genet*. 1999 Nov;23(3):343–7.
473. Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M, et al. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain J Neurol*. 2009 May;132(Pt 5):1175–89.
474. Machado-Santos J, Saji E, Tröscher AR, Paunovic M, Liblau R, Gabriely G, et al. The compartmentalized inflammatory response in the multiple sclerosis brain is composed of tissue-resident CD8+ T lymphocytes and B cells. *Brain J Neurol*. 2018 Jul 1;141(7):2066–82.
475. Booss J, Esiri MM, Tourtellotte WW, Mason DY. Immunohistological analysis of T lymphocyte subsets in the central nervous system in chronic progressive multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 1983 Dec;62(1–3):219–32.
476. Hayashi T, Morimoto C, Burks JS, Kerr C, Hauser SL. Dual-label immunocytochemistry of the active multiple sclerosis lesion: major histocompatibility complex and activation antigens. *Ann Neurol*. 1988 Oct;24(4):523–31.
477. Absinta M, Maric D, Gharagozloo M, Garton T, Smith MD, Jin J, et al. A lymphocyte-microglia-astrocyte axis in chronic active multiple sclerosis. *Nature*. 2021 Sep;597(7878):709–14.
478. Schafflick D, Xu CA, Hartlehnert M, Cole M, Schulte-Mecklenbeck A, Lautwein T, et al. Integrated single cell analysis of blood and cerebrospinal fluid leukocytes in multiple sclerosis. *Nat Commun*. 2020 Jan 14;11(1):247.
479. Lepennetier G, Hracsko Z, Unger M, Van Griensven M, Grummel V, Krumbholz M, et al. Cytokine and immune cell profiling in the cerebrospinal fluid of patients with neuro-inflammatory diseases. *J Neuroinflammation*. 2019 Nov 14;16:219.

480. Ramesh A, Schubert RD, Greenfield AL, Dandekar R, Loudermilk R, Sabatino JJ, et al. A pathogenic and clonally expanded B cell transcriptome in active multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020 Sep 15;117(37):22932–43.
481. Attfield KE, Jensen LT, Kaufmann M, Friese MA, Fugger L. The immunology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2022 May 4 [cited 2022 Jun 28]; Available from: <https://www.nature.com/articles/s41577-022-00718-z>
482. Krishnarajah S, Becher B. TH Cells and Cytokines in Encephalitogenic Disorders. *Front Immunol*. 2022;13:822919.
483. Kunkl M, Frasca S, Amormino C, Volpe E, Tuosto L. T Helper Cells: The Modulators of Inflammation in Multiple Sclerosis. *Cells*. 2020 Feb 19;9(2):482.
484. Kunkl M, Amormino C, Tedeschi V, Fiorillo MT, Tuosto L. Astrocytes and Inflammatory T Helper Cells: A Dangerous Liaison in Multiple Sclerosis. *Front Immunol*. 2022;13:824411.
485. Ben-Nun A, Wekerle H, Cohen IR. The rapid isolation of clonable antigen-specific T lymphocyte lines capable of mediating autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol*. 1981 Mar;11(3):195–9.
486. Zamvil S, Nelson P, Trotter J, Mitchell D, Knobler R, Fritz R, et al. T-cell clones specific for myelin basic protein induce chronic relapsing paralysis and demyelination. *Nature*. 1985 Oct 26;317(6035):355–8.
487. Lider O, Reshef T, Beraud E, Ben-Nun A, Cohen IR. Anti-idiotypic network induced by T cell vaccination against experimental autoimmune encephalomyelitis. *Science*. 1988 Jan 8;239(4836):181–3.
488. Steinman L, Waisman A, Altmann D. Major T-cell responses in multiple sclerosis. *Mol Med Today*. 1995 May;1(2):79–83.
489. Cruciani C, Puthenparampil M, Tomas-Ojer P, Jelcic I, Docampo MJ, Planas R, et al. T-Cell Specificity Influences Disease Heterogeneity in Multiple Sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflammation*. 2021 Sep 17;8(6):e1075.
490. Lodygin D, Hermann M, Schweingruber N, Flügel-Koch C, Watanabe T, Schlosser C, et al. β -Synuclein-reactive T cells induce autoimmune CNS grey matter degeneration. *Nature*. 2019 Feb;566(7745):503–8.
491. Ando DG, Clayton J, Kono D, Urban JL, Sercarz EE. Encephalitogenic T cells in the B10.PL model of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) are of the Th-1 lymphokine subtype. *Cell Immunol*. 1989 Nov;124(1):132–43.
492. Kleiter I, Song J, Lukas D, Hasan M, Neumann B, Croxford AL, et al. Smad7 in T cells drives T helper 1 responses in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain J Neurol*. 2010 Apr;133(Pt 4):1067–81.
493. Ferber IA, Brocke S, Taylor-Edwards C, Ridgway W, Dinisco C, Steinman L, et al. Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Immunol Baltim Md 1950*. 1996 Jan 1;156(1):5–7.

494. Murphy AC, Lalor SJ, Lynch MA, Mills KHG. Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav Immun*. 2010 May;24(4):641–51.
495. Hofstetter HH, Ibrahim SM, Koczan D, Kruse N, Weishaupt A, Toyka KV, et al. Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol*. 2005 Oct;237(2):123–30.
496. Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, Esiri MM, et al. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol*. 2008 Jan;172(1):146–55.
497. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*. 2005 Nov;6(11):1133–41.
498. Haak S, Croxford AL, Kreyborg K, Heppner FL, Pouly S, Becher B, et al. IL-17A and IL-17F do not contribute vitally to autoimmune neuro-inflammation in mice. *J Clin Invest*. 2009 Jan;119(1):61–9.
499. Codarri L, Gyölvérsi G, Tosevski V, Hesske L, Fontana A, Magnenat L, et al. ROR γ t drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol*. 2011 Jun;12(6):560–7.
500. Regen T, Isaac S, Amorim A, Núñez NG, Hauptmann J, Shanmugavadivu A, et al. IL-17 controls central nervous system autoimmunity through the intestinal microbiome. *Sci Immunol*. 2021 Feb 5;6(56):eaaz6563.
501. Tahmasebinia F, Pourgholaminejad A. The role of Th17 cells in auto-inflammatory neurological disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2017 Oct;79:408–16.
502. El-Behi M, Ciric B, Dai H, Yan Y, Cullimore M, Safavi F, et al. The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nat Immunol*. 2011 Jun;12(6):568–75.
503. King IL, Dickendesher TL, Segal BM. Circulating Ly-6C⁺ myeloid precursors migrate to the CNS and play a pathogenic role during autoimmune demyelinating disease. *Blood*. 2009 Apr 2;113(14):3190–7.
504. Croxford AL, Lanzinger M, Hartmann FJ, Schreiner B, Mair F, Pelczar P, et al. The Cytokine GM-CSF Drives the Inflammatory Signature of CCR2⁺ Monocytes and Licenses Autoimmunity. *Immunity*. 2015 Sep 15;43(3):502–14.
505. Komuczki J, Tuzlak S, Friebel E, Hartwig T, Spath S, Rosenstiel P, et al. Fate-Mapping of GM-CSF Expression Identifies a Discrete Subset of Inflammation-Driving T Helper Cells Regulated by Cytokines IL-23 and IL-1 β . *Immunity*. 2019 May 21;50(5):1289-1304.e6.
506. Spath S, Komuczki J, Hermann M, Pelczar P, Mair F, Schreiner B, et al. Dysregulation of the Cytokine GM-CSF Induces Spontaneous Phagocyte Invasion and Immunopathology in the Central Nervous System. *Immunity*. 2017 Feb 21;46(2):245–60.

507. Hartmann FJ, Khademi M, Aram J, Ammann S, Kockum I, Constantinescu C, et al. Multiple sclerosis-associated IL2RA polymorphism controls GM-CSF production in human TH cells. *Nat Commun.* 2014 Oct 3;5:5056.
508. Galli E, Hartmann FJ, Schreiner B, Ingelfinger F, Arvaniti E, Diebold M, et al. GM-CSF and CXCR4 define a T helper cell signature in multiple sclerosis. *Nat Med.* 2019 Aug;25(8):1290–300.
509. Raveney BJE, Oki S, Hohjoh H, Nakamura M, Sato W, Murata M, et al. Eomesodermin-expressing T-helper cells are essential for chronic neuroinflammation. *Nat Commun.* 2015 Oct 5;6:8437.
510. Yokote H, Miyake S, Croxford JL, Oki S, Mizusawa H, Yamamura T. NKT cell-dependent amelioration of a mouse model of multiple sclerosis by altering gut flora. *Am J Pathol.* 2008 Dec;173(6):1714–23.
511. Hiltensperger M, Beltrán E, Kant R, Tyystjärvi S, Lepennetier G, Domínguez Moreno H, et al. Skin and gut imprinted helper T cell subsets exhibit distinct functional phenotypes in central nervous system autoimmunity. *Nat Immunol.* 2021 Jul;22(7):880–92.
512. Berer K, Mues M, Koutrolos M, Rasbi ZA, Boziki M, Johner C, et al. Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature.* 2011 Oct 26;479(7374):538–41.
513. Berer K, Gerdes LA, Cekanaviciute E, Jia X, Xiao L, Xia Z, et al. Gut microbiota from multiple sclerosis patients enables spontaneous autoimmune encephalomyelitis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017 Oct 3;114(40):10719–24.
514. Cekanaviciute E, Yoo BB, Runia TF, Debelius JW, Singh S, Nelson CA, et al. Gut bacteria from multiple sclerosis patients modulate human T cells and exacerbate symptoms in mouse models. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017 Oct 3;114(40):10713–8.
515. Lanz TV, Brewer RC, Ho PP, Moon JS, Jude KM, Fernandez D, et al. Clonally expanded B cells in multiple sclerosis bind EBV EBNA1 and GlialCAM. *Nature.* 2022 Mar;603(7900):321–7.
516. Wang J, Jelcic I, Mühlenbruch L, Haunerding V, Toussaint NC, Zhao Y, et al. HLA-DR15 Molecules Jointly Shape an Autoreactive T Cell Repertoire in Multiple Sclerosis. *Cell.* 2020 Nov 25;183(5):1264–1281.e20.
517. Veroni C, Aloisi F. The CD8 T Cell-Epstein-Barr Virus-B Cell Triologue: A Central Issue in Multiple Sclerosis Pathogenesis. *Front Immunol.* 2021;12:665718.
518. Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol.* 2000 Jun;47(6):707–17.
519. Gveric D, Kaltschmidt C, Cuzner ML, Newcombe J. Transcription factor NF-kappaB and inhibitor I kappaBalpha are localized in macrophages in active multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1998 Feb;57(2):168–78.
520. Goldmann T, Wieghofer P, Müller PF, Wolf Y, Varol D, Yona S, et al. A new type of microglia gene targeting shows TAK1 to be pivotal in CNS autoimmune inflammation. *Nat Neurosci.* 2013 Nov;16(11):1618–26.

521. Ellrichmann G, Thöne J, Lee DH, Rupec RA, Gold R, Linker RA. Constitutive activity of NF-kappa B in myeloid cells drives pathogenicity of monocytes and macrophages during autoimmune neuroinflammation. *J Neuroinflammation*. 2012 Jan 20;9:15.
522. Lee MJ, Bing SJ, Choi J, Jang M, Lee G, Lee H, et al. IKK β -mediated inflammatory myeloid cell activation exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis by potentiating Th1/Th17 cell activation and compromising blood brain barrier. *Mol Neurodegener*. 2016 Jul 22;11(1):54.
523. Voet S, Mc Guire C, Hagemeyer N, Martens A, Schroeder A, Wieghofer P, et al. A20 critically controls microglia activation and inhibits inflammasome-dependent neuroinflammation. *Nat Commun*. 2018 May 23;9(1):2036.
524. Zhang H, Bi J, Yi H, Fan T, Ruan Q, Cai L, et al. Silencing c-Rel in macrophages dampens Th1 and Th17 immune responses and alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Immunol Cell Biol*. 2017 Aug;95(7):593–600.
525. Jie Z, Ko CJ, Wang H, Xie X, Li Y, Gu M, et al. Microglia promote autoimmune inflammation via the noncanonical NF- κ B pathway. *Sci Adv*. 7(36):eabh0609.
526. Lalle G, Lautreite R, Voisin A, Twardowski J, Stéphan P, Perrin-Niquet M, et al. A T cell-intrinsic function for NF- κ B RelB in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Sci Rep*. 2021 Oct 4;11(1):19674.
527. Chen D, Ireland SJ, Remington G, Alvarez E, Racke MK, Greenberg B, et al. CD40-Mediated NF- κ B Activation in B Cells Is Increased in Multiple Sclerosis and Modulated by Therapeutics. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2016 Dec 1;197(11):4257–65.
528. Yan J, Winterford CM, Catts VS, Pat BK, Pender MP, McCombe PA, et al. Increased constitutive activation of NF- κ B p65 (RelA) in peripheral blood cells of patients with progressive multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2018 Jul 15;320:111–6.
529. Burkly L, Hession C, Ogata L, Reilly C, Marconi LA, Olson D, et al. Expression of relB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells. *Nature*. 1995 Feb 9;373(6514):531–6.
530. O’Sullivan BJ, Yekollu S, Ruscher R, Mehdi AM, Maradana MR, Chidgey AP, et al. Autoimmune-Mediated Thymic Atrophy Is Accelerated but Reversible in RelB-Deficient Mice. *Front Immunol*. 2018;9:1092.
531. Satoh J ichi, Misawa T, Tabunoki H, Yamamura T. Molecular network analysis of T-cell transcriptome suggests aberrant regulation of gene expression by NF-kappaB as a biomarker for relapse of multiple sclerosis. *Dis Markers*. 2008;25(1):27–35.
532. Hilliard B, SamoiloVA EB, Liu TS, Rostami A, Chen Y. Experimental autoimmune encephalomyelitis in NF-kappa B-deficient mice:roles of NF-kappa B in the activation and differentiation of autoreactive T cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1999 Sep 1;163(5):2937–43.
533. Brettingham-Moore KH, Rao S, Juelich T, Shannon MF, Holloway AF. GM-CSF promoter chromatin remodelling and gene transcription display distinct signal and transcription factor requirements. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(1):225–34.

534. Gilmore TD, Herscovitch M. Inhibitors of NF-kappaB signaling: 785 and counting. *Oncogene*. 2006 Oct 30;25(51):6887–99.
535. Molinero LL, Miller ML, Evaristo C, Alegre ML. High TCR stimuli prevent induced regulatory T cell differentiation in a NF-κB-dependent manner. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2011 Apr 15;186(8):4609–17.
536. Sallusto F, Impellizzieri D, Basso C, Laroni A, Uccelli A, Lanzavecchia A, et al. T-cell trafficking in the central nervous system. *Immunol Rev*. 2012 Jul;248(1):216–27.
537. Sasaki CY, Ghosh P, Longo DL. Recruitment of RelB to the Csf2 promoter enhances RelA-mediated transcription of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Biol Chem*. 2011 Jan 14;286(2):1093–102.
538. Hou L, Yuki K. CCR6 and CXCR6 Identify the Th17 Cells With Cytotoxicity in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Front Immunol*. 2022;13:819224.
539. Lee YK, Menezes JS, Umesaki Y, Mazmanian SK. Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Mar 15;108 Suppl 1:4615–22.
540. Kober-Hasslacher M, Oh-Strauß H, Kumar D, Soberon V, Diehl C, Lech M, et al. c-Rel gain in B cells drives germinal center reactions and autoantibody production. *J Clin Invest*. 130(6):3270–86.
541. Chaurio RA, Anadon CM, Lee Costich T, Payne KK, Biswas S, Harro CM, et al. TGF-β-mediated silencing of genomic organizer SATB1 promotes Tfh cell differentiation and formation of intra-tumoral tertiary lymphoid structures. *Immunity*. 2022 Jan 11;55(1):115-128.e9.
542. Rodriguez AB, Peske JD, Woods AN, Leick KM, Mauldin IS, Meneveau MO, et al. Immune mechanisms orchestrate tertiary lymphoid structures in tumors via cancer-associated fibroblasts. *Cell Rep*. 2021 Jul 20;36(3):109422.
543. Bindea G, Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Waldner M, Obenauf AC, et al. Spatiotemporal Dynamics of Intratumoral Immune Cells Reveal the Immune Landscape in Human Cancer. *Immunity*. 2013 Oct 17;39(4):782–95.
544. Beltra JC, Manne S, Abdel-Hakeem MS, Kurachi M, Giles JR, Chen Z, et al. Developmental Relationships of Four Exhausted CD8+ T Cell Subsets Reveals Underlying Transcriptional and Epigenetic Landscape Control Mechanisms. *Immunity*. 2020 May 19;52(5):825-841.e8.
545. Kourtis N, Wang Q, Wang B, Oswald E, Adler C, Cherravuru S, et al. A single-cell map of dynamic chromatin landscapes of immune cells in renal cell carcinoma. *Nat Cancer*. 2022 Jul;3(7):885–98.
546. Jaiswal A, Verma A, Dannenfelser R, Melssen M, Tirosh I, Izar B, et al. An activation to memory differentiation trajectory of tumor-infiltrating lymphocytes informs metastatic melanoma outcomes. *Cancer Cell*. 2022 May 9;40(5):524-544.e5.
547. Karin M, Yamamoto Y, Wang QM. The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development. *Nat Rev Drug Discov*. 2004 Jan;3(1):17–26.
548. Baud V, Karin M. Is NF-κB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat Rev Drug Discov*. 2009 Jan;8(1):33–40.

549. Yan H, Duan X, Pan H, Holguin N, Rai MF, Akk A, et al. Suppression of NF- κ B activity via nanoparticle-based siRNA delivery alters early cartilage responses to injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Oct 11;113(41):E6199–208.
550. Chau CH, Steeg PS, Figg WD. Antibody-drug conjugates for cancer. *Lancet Lond Engl*. 2019 Aug 31;394(10200):793–804.
551. Wong D, Teixeira A, Oikonomopoulos S, Humburg P, Lone IN, Saliba D, et al. Extensive characterization of NF- κ B binding uncovers non-canonical motifs and advances the interpretation of genetic functional traits. *Genome Biol*. 2011 Jul 29;12(7):R70.
552. Zhong H, May MJ, Jimi E, Ghosh S. The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Mol Cell*. 2002 Mar;9(3):625–36.
553. Zhong H, Voll RE, Ghosh S. Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol Cell*. 1998 Apr;1(5):661–71.
554. Dong J, Jimi E, Zhong H, Hayden MS, Ghosh S. Repression of gene expression by unphosphorylated NF-kappaB p65 through epigenetic mechanisms. *Genes Dev*. 2008 May 1;22(9):1159–73.
555. Saccani S, Pantano S, Natoli G. Modulation of NF-kappaB activity by exchange of dimers. *Mol Cell*. 2003 Jun;11(6):1563–74.
556. Panne D. The enhanceosome. *Curr Opin Struct Biol*. 2008 Apr;18(2):236–42.
557. Cheng QJ, Ohta S, Sheu KM, Spreafico R, Adelaja A, Taylor B, et al. NF- κ B dynamics determine the stimulus specificity of epigenomic reprogramming in macrophages. *Science*. 2021 Jun 18;372(6548):1349–53.

Régulation de la biologie des Lymphocytes T CD4⁺ conventionnels par les facteurs de transcription NF-κB

Les lymphocytes T CD4⁺ conventionnels (Tconv) sont des acteurs centraux de la réponse immunitaire. En fonction des agents pathogènes et du contexte inflammatoire, les Tconv sont capables de se polariser en différentes sous-populations cellulaires nommées T auxiliaires (ou Th), chacune présentant des fonctions effectrices spécifiques, orientant ainsi la réponse immunitaire. Dans le cancer, les Tconv ont majoritairement des fonctions protectrices, notamment la sous-population Th1. Cependant, le recrutement des Tconv dans la tumeur ainsi que l'expression de leurs fonctions effectrices sont bien souvent inhibés. A l'inverse, les Tconv reconnaissant des antigènes du soi sont pathologiques dans diverses maladies auto-immunes. La Sclérose en plaque (SEP) est une maladie dans laquelle les Tconv reconnaissent des antigènes de myéline. Ces cellules présentent un profil Th17 dit "pathogéniques" et sont responsables de l'inflammation du système nerveux central.

Les voies de signalisation contrôlant l'activation/la fonction des Tconv dans la tumeur et dans la SEP sont méconnues. NF-κB est une famille de cinq facteurs de transcription, RelA, c-Rel, RelB, NF-κB1 et NF-κB2 qui s'associent sous forme de dimères pour induire la transcription de leurs nombreux gènes cibles. La voie NF-κB contrôle de nombreux aspects de la fonction des lymphocytes T. Cependant, la fonction spécifique des cinq sous-unités dans les Tconv n'a presque jamais été explorée. Lors de mes travaux de thèse, j'ai tout d'abord montré que la délétion spécifique de RelB dans les lymphocytes T diminue la sévérité d'un modèle murin de SEP en diminuant l'expression du GM-CSF par les Tconv. En parallèle, j'ai étudié les fonctions intrinsèques aux Tconv de RelA et c-Rel à l'état basal, dans le cancer et l'autoimmunité. En utilisant différents modèles humains et murins, j'ai démontré que RelA contrôle l'activation des Tconv à l'état basal ainsi que le programme pathogénique des Tconv dans la SEP. La protéine c-Rel contrôle les fonctions anti tumorales des Tconv.

Molecular Regulation of conventional CD4⁺ T cells by the NF-κB subunits.

Conventional CD4⁺ T cells (Tconv) are central actors of the immune response. Depending on the pathogen and the inflammatory context, Tconv are able to polarize into different cell subpopulations, called Helper T cells (Th) each with specific effector functions. Thus, they can shape the immune response. In cancer, Tconv are mainly protective, especially the Th1 subpopulation. However, the recruitment of Tconv into the tumor and the expression of their effector functions are often inhibited. Conversely, in multiple sclerosis (MS), Tconv cells recognize myelin antigens and have a pathogenic Th17 profile which triggers the inflammation of the central nervous system. The signaling pathways controlling Tconv activation/function in tumor and MS are not well understood. NF-κB is a family of five transcription factors, RelA, c-Rel, RelB, NF-κB1, and NF-κB2 that associate as dimers to induce transcription of their many target genes. The NF-κB pathway controls various aspects of T cell function. However, the specific function of each of the five subunits in Tconv has almost never been explored. In my thesis work, I first showed that specific deletion of RelB in T cells decreases the severity of a mouse model of MS by decreasing GM-CSF expression by Tconv.

In a second axis of my PhD project, I studied the Tconv-intrinsic functions of RelA and c-Rel in Tconv at steady state, in autoimmunity and in cancer. Using different mouse and human models, I observed a separation of duties between the two subunits. While RelA controls the activation of Tconv in the basal state and the pathological program in autoimmunity, c-Rel is required for the antitumor functions of the cells.