



**HAL**  
open science

# Etude de la fonction des protéines de la voie canonique de NF-kB dans la différenciation et la fonction des lymphocytes T CD4 au cours de l'auto-immunité

Raphaëlle Lautraite

► **To cite this version:**

Raphaëlle Lautraite. Etude de la fonction des protéines de la voie canonique de NF-kB dans la différenciation et la fonction des lymphocytes T CD4 au cours de l'auto-immunité. Immunologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2023. Français. NNT : 2023LYO10195 . tel-04881085

**HAL Id: tel-04881085**

**<https://theses.hal.science/tel-04881085v1>**

Submitted on 11 Jan 2025

**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**

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

**Discipline : Immunologie**

Soutenue publiquement le 13/11/2023, par :  
**Raphaëlle Lautreite**

---

**Étude de la fonction des protéines de la  
voie canonique de NF- $\kappa$ B dans la  
différenciation et la fonction des  
lymphocytes T CD4 au cours de l'auto-  
immunité**

---

Devant le jury composé de :

DELPRAT Christine

BAUD Véronique

MARTIN Bruno

M'HOMA SOUDJA Saïdi

LIBLAU Roland

GRINBERG-BLEYER Yenkel

PU Université Claude Bernard Lyon1

Directrice de recherche INSERM

Chargé de recherche CNRS

Chargé de recherche CNRS

PU/PH Université Paul Sabatier Toulouse3

Chargé de recherche INSERM

Présidente

Rapporteuse

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

## *Résumé en français*

Les lymphocytes T sont des médiateurs critiques des réponses immunitaires, tant dans les maladies auto-immunes que dans le cancer. Comprendre les mécanismes moléculaires orchestrant le développement et la fonction des lymphocytes T est ainsi d'une importance primordiale pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. NF- $\kappa$ B est une famille de facteurs de transcription aux activités pléiotropes dans le système immunitaire. Néanmoins, la contribution sélective des différentes sous-unités de NF- $\kappa$ B dans la fonction des lymphocytes T reste à élucider.

Grâce à des modèles de souris transgéniques porteuses d'une ablation spécifique des sous-unités canoniques RelA et c-Rel de NF- $\kappa$ B dans les lymphocytes T, nous avons examiné les rôles potentiels de ces deux protéines dans la fonction des lymphocytes T CD4 conventionnels (Tconv) à l'état basal et dans des contextes pathologiques.

À l'aide d'analyses de séquençage à haut débit, nous avons mis en évidence un rôle primordial de RelA dans la régulation directe et indirecte de nombreux gènes associés à l'activation des Tconv, à la production de cytokines et à la différenciation des Thelper. Des conclusions similaires ont pu être tirées dans des Tconv humains déficients pour RelA et c-Rel.

Par la suite, nous avons démontré que RelA est requis pour la différenciation *in vitro* des Thelper de type Th17, acteurs majeurs de l'auto-immunité. En conséquence, les souris déficientes pour RelA sont protégées de la maladie dans un modèle murin de sclérose en plaques, du fait d'une baisse de la différenciation et de la fonction des Th17 dans le système nerveux central. À l'inverse, nous avons découvert que c-Rel, plutôt que RelA, est nécessaire pour établir la fonction anti-tumorale des Tconv. Ainsi, l'ablation de c-Rel conduit à une augmentation de la pousse tumorale chez la souris, et à une absence de réponse aux immunothérapies ciblant l'axe PD-1/PD-L1.

Nos résultats mettent en lumière de nouveaux régulateurs de la fonction des Tconv dans l'auto-immunité et le cancer. De plus, nos travaux démontrent une division du travail entre les sous-unités canoniques de NF- $\kappa$ B, RelA jouant un rôle prédominant dans l'auto-immunité et c-Rel dans le cancer. Ceci ouvre la voie vers des immunothérapies dirigées spécifiquement contre les sous-unités de NF- $\kappa$ B.

## *Summary in English*

T cells are critical mediators of immune responses, both in autoimmune diseases and in cancer. Understanding the molecular mechanisms orchestrating the development and function of T cells is therefore of paramount importance for identifying new therapeutic targets. NF- $\kappa$ B is a family of transcription factors with pleiotropic activities in the immune system. However, the selective contribution of different NF- $\kappa$ B subunits in T cell function remains to be elucidated.

Using transgenic mouse models carrying specific ablation of the canonical RelA and c-Rel subunits of NF- $\kappa$ B in T cells, we examined the potential roles of these two proteins in conventional CD4 T cell (Tconv) function, in the basal state and in pathological contexts.

Using high-throughput sequencing analyses, we have demonstrated a primordial role for RelA in the direct and indirect regulation of numerous genes associated with Tconv activation, cytokine production and Thelper cell differentiation. Similar conclusions could be drawn in human Tconv deficient for RelA and c-Rel.

Subsequently, we demonstrated that RelA is required for the in vitro differentiation of Th17-cells that are major pathogenic players in autoimmunity. Accordingly, RelA-deficient mice are protected from the disease in a mouse model of multiple sclerosis, due to reduced Th17 differentiation and function in the central nervous system. Conversely, we discovered that c-Rel, rather than RelA, is required to establish the anti-tumor function of Tconvs. Indeed, ablation of c-Rel leads to an increase in tumor growth in mice, and to a lack of response to immunotherapies targeting the PD-1/PD-L1 axis.

Our results highlight novel regulators of Tconv function in autoimmunity and cancer. Furthermore, our work demonstrates a division of labor between canonical NF- $\kappa$ B subunits, with RelA playing a predominant role in autoimmunity and c-Rel in cancer. This paves the way towards immunotherapies directed specifically against NF- $\kappa$ B subunits.

## ***Remerciements***

La réalisation de cette thèse a été une aventure passionnante, et je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers toutes les personnes qui ont contribué à la rendre possible.

Tout d'abord, je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères à Yenkel Grinberg-Bleyer qui m'a donné ma chance en me prenant dans son laboratoire et qui m'a encadré durant 3ans. J'ai énormément appris et progressé avec toi, merci beaucoup ! Ta passion pour le sujet et ton dévouement à la recherche sont réellement inspirants.

Je tiens également à remercier particulièrement Véronique Baud et Bruno Martin d'avoir accepté de consacrer leur temps et leur expertise à l'évaluation de cette thèse. Leurs remarques éclairées et leurs suggestions ont enrichi ce travail, et je suis reconnaissant pour leur contribution à son amélioration.

Je remercie également par avance Roland Liblau et Saïdi M'Homa Soudja mes examinateurs pour avoir pris le temps de lire mon travail et pour leurs questions qui me permettront de grandir scientifiquement. Enfin, merci à Christine Delprat d'avoir accepté de présider ma thèse.

Mes remerciements s'étendent également à tous les membres de mon laboratoire et aux collaborateurs. Dans le travail votre collaboration a été précieuse, vos discussions stimulantes et votre dévouement ont été des éléments clés de mon parcours doctoral. Chacun d'entre vous a contribué à façonner les idées présentées dans cette thèse, et je suis reconnaissant de l'opportunité d'avoir travaillé à vos côtés. De manière plus personnelle, votre présence a permis que je me sente bien dans cette équipe au quotidien.

Julie, première copine au laboratoire tu as été d'un soutien sans faille. Tu es devenue une amie en plus d'une collègue, toujours présente pour rigoler, potiner et rendre service un grand merci. Même si les vacances sont sportives avec toi, j'ai toujours passé de super moment et merci à toi ! Bref tu sais que je ne suis pas douée avec les remerciements (on préfère râler non ?) donc merci et sans toi ça n'aurait pas été pareil. Ps tu peux garder le demi-avocat ! Allison, toi aussi tu es devenue une vraie amie, merci pour ta gentillesse, ton écoute et tes précieux conseils tant dans la vie personnelle que dans la vie professionnelle. Tu as été le ciment du groupe. Enfin Pierre le dernier du trio des anciens, tu es également devenu un ami. Tu m'as fait rire et tu as toujours été présent quand je stressais. Un super voisin de labo et de la coloc (c'est toi le 4<sup>e</sup> coloc non ?). Khaled, arrivé après, tu as su trouver ta place au labo et dans nos cœurs. Tu es le plus « rigolo » de tous, notre meilleure copine :p et une fouine de talent ! Bref tout ça en plus

d'être un super binôme de manip. Marlène merci pour ta gentillesse (parfois trop) et ta douceur. Tu es notre maman du labo. Maud, tu es arrivée un peu plus tard mais on a passé de supers moment ensemble au labo mais aussi au ski et en soirée. Insa merci pour ta gentillesse et ta bienveillance qui apportent de la douceur au labo. Et Guilhem merci de m'avoir formée à mon arrivée.

Ah les JM, les Grinberg ne serait pas ce qu'ils sont sans vous. Ossama mon voisin de bureau pas du tout compliqué :p. Même si on s'est engueulé sur le ménage, le chauffage... tu restes un super copain ! Tu as été une oreille attentive pour moi et tes débats passionnés (et longs parfois :p) me manqueront. Tu connais mon cadeau de thèse : « ça en est où le dossier brulant ?! ». Valentin tu as été aussi un super ami, un super cuisinier (oooh waou les diner chez toi) et un très bon conseiller, merci à toi. Ghita, arrivée après dans le meilleur des bureaux tu as apporté de la joie et de la bonne humeur ! Hélène la labM des JM (et franchement gros big up de gérer les bébés de ton équipe :p), toujours partante pour faire la fête et pour rire tu apportes toi aussi de la bonne humeur au labo. Clem, toi aussi tu es la police du ménage et ça fait plaisir de ne pas être la seule ! Merci pour ta bonne humeur, et si j'avais le droit je te lèguerais avec plaisir mon bureau !! Maeva, Sarah et Hani merci pour votre gentillesse.

Manue, rencontrée à ma première SFI tu as rendu mes congrès tellement sympas. On aura chassé les goodies, forgé pleins de bon souvenirs et passé de super diners ensemble.

Mes remerciements s'adressent également à l'ensemble des membres du CRCL avec qui j'ai eu la chance de travailler. Le dynamisme et l'esprit de collaboration qui règnent au sein du centre m'ont offert un environnement propice à la recherche et à l'apprentissage. Je tiens particulièrement à remercier les membres de la plateforme de cytométrie. Priscilla merci d'avoir répondu présente quand le cytomètre faisait des siennes (je pense avoir vu toutes les pannes techniques possible et imaginable) mais également pour ta bonne humeur et gentillesse. Thibault merci également d'avoir été présent et d'avoir toujours répondu de bon cœur à mes NOMBREUSES questions.

J'adresse un merci tout particulier à mes amis, qui ont su m'offrir des moments de répit et de distraction indispensables à mon équilibre. A Lyon, merci à Jeanne et au groupe de la Madone de m'avoir changé les idées tant de jeudi. A Paris, merci à Astrid, Sixitne et tant d'autres d'avoir été là. Merci également à Marianne et la team de la Pitié, rencontrée au premier stage.

Enfin un grand merci à mes colocos Lolo et Juliette, vous m'avez écouté râler quand ça n'allait pas puis m'avez soutenu et fait rire. Vous m'avez aussi appris à danser (même si je « bounce »

pas au bon rythme) entre autres. La coloc me manquera. Cam, tu es partie pour créer ton chez toi mais on a aussi passé de super moments à la coloc ensemble !

Enfin, je ne saurais exprimer la profondeur de ma gratitude envers ma famille. A mes parents, pour leur foi inébranlable en mes capacités et leur soutien sans faille qui m'ont portée au-delà des limites que j'imaginai. À mon doudounet et petit canard, merci pour vos messages, vos appels, vos visites (surtout Penelope qui a traversé plusieurs fois la France), et tout simplement votre présence. Cet été vous avez été un support pour l'écriture de ma thèse et extrêmement compréhensif.

Theo merci d'avoir été là pour moi. En plus d'être mon meilleur ami depuis plus de 10ans tu es un merveilleux copain. Merci infiniment pour ton aide pendant l'écriture. Aussi bien lors du télétravail en Corse en réunissant des conditions de travail optimales que les week-end lorsque tu m'aidais à m'évader quand je stressais un peu trop. Enfin merci pour tes relectures, tes skills d'harmonisation n'auront jamais autant servi.

Encore une fois merci à tous pour votre soutien et la force que vous m'avez donné et pour finir comme l'a si bien dit snoop dogg :

“Last but not least, I wanna thank me. I wanna thank me for believing in me. I wanna thank me for doing all this hard work. I wanna thank me for having no days off. I wanna thank me for, for never quitting. I wanna thank me for always being a giver. And tryna give more than I reciev. I wanna thank me for tryna do more right than wrong. I wanna thank me for just being me at all times.”

## **Table des Figures :**

Figure 1 : Différenciation des LT en sous-populations spécialisées.....	14
Figure 2 : Mécanismes d'inhibition des Treg .....	22
Figure 3 : Plasticité des différents lignages de Th. ....	23
Figure 4 : Mécanisme physiopathologique de la SEP :.....	28
Figure 5 : Modèle de l'EAE : .....	29
Figure 6 : Immunosurveillance et initiation de la réponse antitumorale.....	34
Figure 7 : Rôle des LT CD4 dans l'immunité antitumorale :.....	39
Figure 8 : Principales voies d'activation des LT CD4 :.....	41
Figure 9 : Voie de signalisation de NF- $\kappa$ B dans les LT :.....	47
Figure 10 : Structure des sous-unités de la famille de NF- $\kappa$ B : .....	48
Figure 11 : Fonction de NF- $\kappa$ B dans la polarisation des Th : .....	56
Figure 12 : Protéines de la voie canonique de NF- $\kappa$ B impliquées dans la SEP ou l'EAE .....	65
Figure 13 : Différenciation en Th17 avec une stimulation aCD3/aCD28 coaté .....	131
Figure 14 : Étude de l'apoptose .....	132
Figure 15 : Impact de l'environnement sur le phénotype des souris Rel-cKO .....	138

## **Table des Tableaux**

Tableau 1 : Mutations germinales de NF- $\kappa$ B chez l'homme .....	53
Tableau 2 : Mutations germinales de NF- $\kappa$ B chez la souris .....	54



# Table des matières

<b>Partie 1 : Les lymphocytes T CD4, acteurs cruciaux de l'immunité adaptative</b> .....	12
<b>1.1 Présentation des lymphocytes T CD4 et de leurs rôles dans le système immunitaire adaptatif.</b> .....	12
<b>1.2 Différenciation des LT CD4 en sous-populations spécialisées</b> .....	14
1.2a Les Th1.....	15
1.2b Les Th2 .....	16
1.2c Les Th9.....	16
1.2d Les Th17 .....	16
1.2e Les T CD4 cytotoxiques .....	18
1.2f Les Th Folliculaires (Tfh) .....	19
<b>1.3 Les LT CD4 dans le contexte de l'auto-immunité</b> .....	23
1.3a Perturbation de l'équilibre des LT dans les maladies auto-immunes et rupture de la tolérance.....	23
1.3b La Sclérose En Plaque (SEP) .....	24
<b>1.4 Les LT CD4 dans le contexte du cancer</b> .....	32
<b>1.5 Mécanismes moléculaires d'activation des LT</b> .....	39
<b>Partie 2 : La famille NF-<math>\kappa</math>B</b> .....	42
<b>2.1 Mécanismes d'activation de NF-<math>\kappa</math>B dans les LT</b> .....	44
2.1a Voies de signalisation canonique de NF- $\kappa$ B.....	44
2.1b Voies de signalisation alternatives de NF- $\kappa$ B.....	45
<b>2.2 Présentation des sous-unités de NF<math>\kappa</math>B</b> .....	47
2.2a Structures des différentes sous-unités .....	47
<b>Partie 3 : Fonctions de NF-<math>\kappa</math>B dans les LT CD4</b> .....	49
<b>3.1 Rôle des sous-unités de NF<math>\kappa</math>B dans la régulation des T effecteurs</b> .....	55
3.1a Rôle des sous-unités de la voie canonique.....	55
3.1b Rôle des sous-unités de la voie alternative.....	62
<b>3.2 Rôle des sous-unités de NF-<math>\kappa</math>B dans la régulation de la réponse immunitaire</b> .....	63
3.2a Rôle des sous-unités canoniques de NF- $\kappa$ B dans l'auto-immunité.....	63
3.2b Rôle des sous-unités canonique de NF- $\kappa$ B dans la réponse anti-cancéreuse.....	66
<b>Résultats</b> .....	69
<b>NF-<math>\kappa</math>B transcription factors RelA and c-Rel selectively control CD4+ T-cell function in multiple sclerosis and cancer.</b> .....	70
<b>Analyse de la complémentarité et redondance des sous-unités RelA et c-Rel dans les Tconv.</b> .....	119
<b>Discussion</b> .....	130
<b>Annexes</b> .....	145
<b>Annexe 1 : Transcriptional Control of Regulatory T Cells in Cancer: Toward Therapeutic Targeting?</b> .....	145

<b>Annexe 2 : A T cell-intrinsic function for NF-<math>\kappa</math>B RelB in experimental autoimmune encephalomyelitis.....</b>	<b>166</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>178</b>

## Table des abréviations :

AIRE : Autoimmune regulator	IPEX : Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked syndrome.
BHE : Barrière Hemato-Encéphalique	IRAK : kinases associées aux IL-1R
CAR-T cells : Chimeric Antigen Receptor T-cells	IκB: inhibitor of κB
CARMA1 : Caspase recruitment domain-containing membrane-associated guanylate kinase protein-1	KO: knock-out
CCR : Chemokine (C-C motif) récepteur	LCR : Liquide Cephalo Rachidien
CD : Cluster de différenciation	LT : Lymphocytes T
CFA : adjuvant de Freund complet	LTC : Lymphocyte T Cytotoxique
ChIP : immunoprécipitation de la chromatine	MAI : Maladie AutoImmune
CIA : Arthrite induite par le collagène	MALT1 : mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité	MEF : Fibroblastes embryonnaires murins
CRISPR :	MOG : glycoprotéine des oligodendryocytes de la myéline
CRTAM : Class I-restricted Tcell-associated molecule	mTOR: mammalian Target Of Rapamycin
DC : Cellule Dendritique	NF-κB : Nuclear Factor of the κ-chain in B-cells
DKO: double KO	NK : Natural Killer
EAE: Encéphalomyélite Autoimmune Expérimental	OVA : ovalbumine
EBV : Epstein-Barr Virus	PD-L1 : Programmed death-ligand 1
GM-CSF : Granulocyte Macrophage colony-stimulating factor	PD1 : programmed death 1
GNLY : Granulysin	PKCθ : protéine kinase C θ
GzA : Granzyme A	PKCθ : protéine kinase C θ
GzB : Granzyme B	PLCγ : phospholipase Cγ
ICOS : Inductible COStimulator	PMA : acétate de myristate de phorbol
IFNγ : Interferon	PRF1 : Perforine
IKK : IκB kinase	RHD : Rel Homologie domaine
IL : Interleukine	SEP : Sclérose en plaque
IP3: inositol-tri-Phosphate	SI : Système immunitaire
	SKO : Simple KO
	SNC : Système Nerveux Central
	SFB : Bactéries filamenteuses segmentées

SPF : Specific-pathogen-free

SOPF : Exempt d'agents pathogènes  
spécifiques

TAD : Domaine d'activation de la  
transcription

Tconv : LT CD4 conventionnels

TCR : T Cell Receptor

Teff : Lymphocytes T effecteurs

Tfh : Thelper folliculaire

Th : T helper

Th17p : Th17 pathogénique

TLS : Structure lymphoïde tertiaire

TNF : Tumor Necrosis factor

TNFRSF : Super Famille des Récepteurs du  
TNF

TRAIL : TNF-related apoptosis-inducing  
ligand

Treg : T régulateurs

# Partie 1 : Les lymphocytes T CD4, acteurs cruciaux de l'immunité adaptative

## 1.1 Présentation des lymphocytes T CD4 et de leurs rôles dans le système immunitaire adaptatif.

Le système immunitaire (SI) constitue un mécanisme de défense essentiel contre les agents pathogènes et participe au maintien de l'homéostasie tissulaire. Au-delà de ces fonctions, le système immunitaire peut réagir à la présence de cellules tumorales et régule bien souvent leur progression. Il est divisé en deux sous-systèmes interconnectés : l'immunité innée et l'immunité adaptative. Alors qu'historiquement la réponse immunitaire innée répond au danger de manière rapide et peu spécifique, le SI adaptatif intervient généralement dans un second temps et permet une réponse hautement spécifique. Au cœur de ce système se trouvent les lymphocytes T (LT) CD4, des acteurs essentiels qui orchestrent une réponse immunitaire précise et coordonnée. A l'inverse dans un contexte d'auto-immunité, ils vont être à l'origine d'une réponse dysfonctionnelle et pathologique. Les LT CD4 exercent une pléthore de fonctions. Ils peuvent par exemple fournir une aide aux LT CD8 en favorisant leur expansion et leur différenciation en LT mémoires fonctionnels<sup>1</sup>. D'autre part, ils agissent sur les lymphocytes B en favorisant la commutation de classe, l'hypermutation somatique et la différenciation en cellules mémoires<sup>2</sup>. Ils régulent l'homéostasie des tissus grâce à la sécrétion de cytokines<sup>3</sup>. Enfin, certaines protéines secrétées par les LT CD4 ont aussi un effet cytotoxique et/ou anti-microbien direct<sup>4,5</sup>.

Ces LT CD4 proviennent de précurseurs lymphoïdes (CLP) de la moelle osseuse qui dérivent de cellules souches hématopoïétiques. Les CLP migrent vers le thymus, organe central du développement des LT, grâce au gradient des chimiokines CCL19, CCL21 et CCL25 produites en grande quantité<sup>6</sup>.

Les CLPs ayant passé la jonction cortico-médullaire du thymus, sont appelés thymocytes. Ces cellules passent par plusieurs stades<sup>7</sup> permettant leur « éducation » et conduisant à un état mature fonctionnel :

- le stade double négatif (DN) : les thymocytes doubles négatifs (DN) ne présentent ni CD4 ni CD8 à leur surface. Il est subdivisé en quatre stades (DN1 à DN4) basés sur l'expression des marqueurs CD44 et CD25. A partir du stade DN3, le réarrangement des locus du récepteur à l'antigène des LT (T-cell Receptor, TCR), médié par les enzymes

RAG, débute, avec d'abord la chaîne  $\beta$  permettant l'expression d'un pré-TCR. Les cellules DN4 prolifèrent avant de passer au stade double positif (DP).

- le stade DP : les thymocytes expriment à la fois CD4 et CD8. La chaîne  $\alpha$  du TCR est réarrangée, conduisant à l'expression d'un TCR  $\alpha\beta$  fonctionnel. Les cellules qui n'expriment pas ce dimère ou un TCR avec une trop faible affinité pour le complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH)/peptide présenté par des cTECs (cellules corticales épithéliales thymiques) meurent par apoptose : il s'agit du phénomène de sélection positive, ou mort par négligence. A l'inverse, les cellules reconnaissant des complexes CMH/peptide du soi avec une trop forte affinité sont éliminées : il s'agit de la sélection négative.

Les cellules DP migrent vers la médulla thymique et deviennent soit CD4+ simple positifs (SP) (s'ils reconnaissent le CMH II) soit CD8+ SP (s'ils reconnaissent le CMH I). La sélection négative se poursuit via la rencontre avec des cellules dendritiques, des macrophages et des mTEC (cellules épithéliales médullaires thymiques) et conduit à la mort de la plupart des LT auto-réactifs. Il ne s'agit cependant pas d'un phénomène parfait car certains LT auto-réactifs peuvent donc être retrouvés en périphérie. Enfin, il a été proposé que certains LT très auto-réactifs pourraient se différencier en LT régulateurs Foxp3+ (cf Partie 1.2g).

Les LT matures naïfs ainsi formés sont attirés hors du thymus dans la circulation sanguine grâce au gradient de sphingosine-1-phosphate (S1P)<sup>8,9</sup>. Ces LT migrent ensuite vers les organes lymphoïdes secondaires, tels que la rate ou les ganglions lymphatiques, en réponse aux gradients chimiotactiques et à l'expression de molécules d'adhésion comme CD62L.

Ces LT naïfs, nécessitent afin d'être fonctionnels et d'acquérir des fonctions « effectrices », une phase d'activation médiée par trois types de signaux. Le premier est l'engagement de leur TCR par le complexe CMH+ peptide cognitif. Alors que le CMH-I est exprimé de manière constitutive et ubiquitaire, le CMH-II est exprimé de manière constitutive par des cellules présentatrices d'antigène professionnelles, notamment les cellules dendritiques (DC), et peut être induit sur les macrophages et les lymphocytes B. Le signal 2 consiste en l'engagement de récepteurs de co-stimulation, tels que le prototype CD28, par leur ligand (CD80/CD86 pour CD28). Enfin, le signal 3 est médié par l'engagement de récepteurs aux cytokines, par exemple l'interleukine (IL)-2. L'action coordonnée de ces trois signaux entraîne la prolifération et différenciation en diverses sous-populations de LT effecteurs. Ces LT effecteurs (Teff) auront

des fonctions variées qui sont déterminées par des événements de spécification environnementale précis, tels que des cytokines ou la force/durée de l'interaction TCR/CMH<sup>10</sup>.

## 1.2 Différenciation des LT CD4 en sous-populations spécialisées

Les LT naïfs peuvent se différencier en une variété de sous-population effecteurs appelés T auxiliaires ou Thelper (Th), T régulateurs (Treg) ou T cytotoxiques. L'existence de différents types de Th a été mise en évidence pour la première fois par Mosmann *et al*, en 1986 avec la description des Th1 et Th2<sup>11</sup>. Depuis cette découverte fondamentale, de nouvelles sous-populations associées à des phénotypes ou des fonctions particulières ont été identifiées, comme les Th17, Th17p (ou Th1.17), Th9, Tfh, T cytotoxiques et les iTreg (Figure 1).

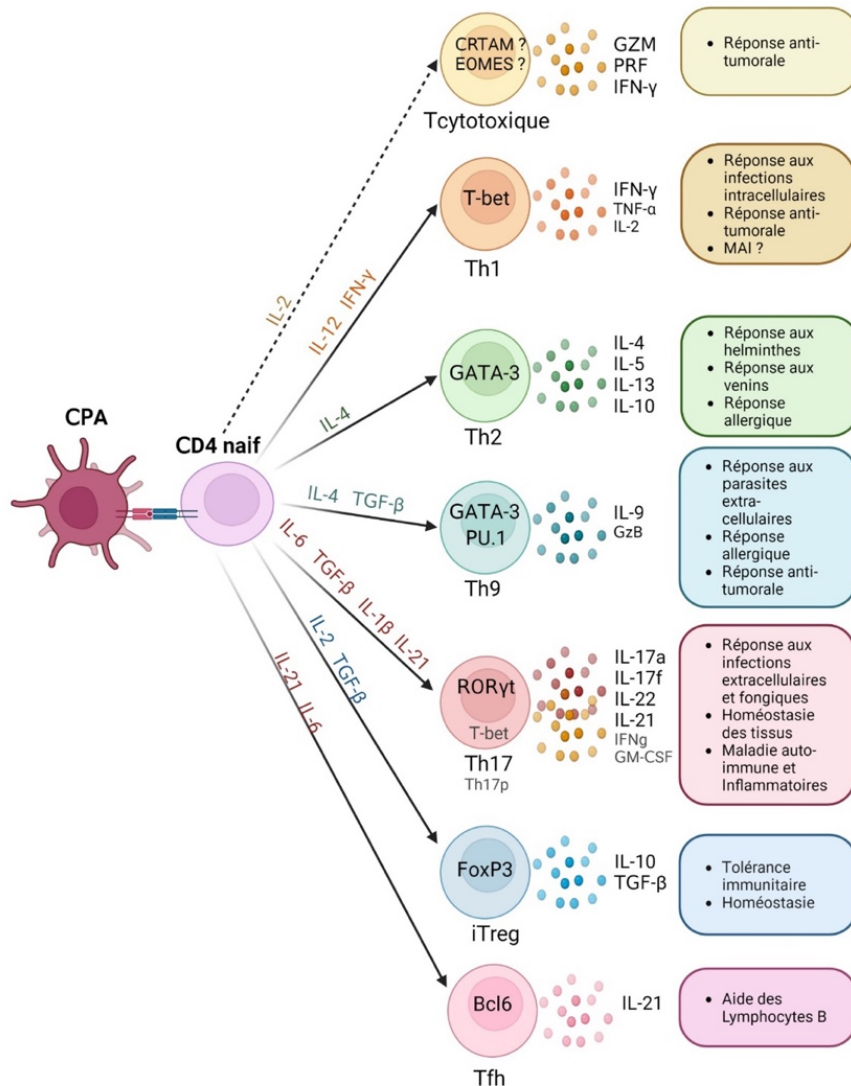


Figure 1 : Différenciation des LT en sous-populations spécialisées.

*Les cytokines nécessaires pour polariser les CD4 naïfs vers les différents types de Thelper sont indiquées sur les flèches et les fonctions des différents types de Th sont indiquées dans les carrés.*

## **1.2a Les Th1**

Les Th1 jouent un rôle clé dans la défense de l'organisme contre les pathogènes intracellulaires (les protozoaires, les bactéries et les virus) ainsi que dans la réponse antitumorale mais ils seraient également impliqués dans le développement de certains types de maladies auto-immunes (MAI)<sup>12-14</sup>. Les Th1 ont été décrits par Mosmann *et al*, comme des cellules capables de produire de l'Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ). Suite à cette découverte, T-bet a rapidement été identifié comme facteur de transcription spécifique de la lignée Th1 (Figure 1)<sup>15</sup>. Peu de temps après, plusieurs voies régulatrices en amont ont été décrites pour favoriser la différenciation des Th1. Ainsi, l'induction de T-bet est dépendante de la signalisation Stat1 et Stat4 qui est induite de façon efficace par l'interleukine 12 (IL-12)<sup>16-18</sup>. Comme T-bet peut réguler positivement la production d'IFN $\gamma$ , la signalisation autocrine IFN $\gamma$ -IFN $\gamma$ R-Stat1 peut renforcer l'expression de T-bet<sup>19</sup>.

Les Th1 peuvent participer à la réponse immunitaire antitumorale en produisant en plus de l'IFN $\gamma$ , du « Tumor Necrosis Factor »  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) et de l'IL-2. Ces cytokines permettent de moduler l'activité des autres cellules immunitaires (recrutement et activation des LT CD8<sup>20</sup>, amplification des fonctions cytotoxiques des « Natural Killer » (NK) et des LT CD8<sup>20,21</sup>, activation des macrophages de type M1<sup>21,22</sup>) et agissent également directement sur les cellules tumorales et les cellules stromales<sup>23,24</sup>.

Le rôle des Th1 dans les MAI n'est pas clair et continue d'évoluer. Historiquement, certaines réponses auto-immunes ont été attribuées aux Th1, comme l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE, un modèle de sclérose en plaques), l'arthrite induite par le collagène (CIA, artefact de la polyarthrite rhumatoïde) et certaines formes de maladies inflammatoires de l'intestin (IBD). Toutefois, il a été démontré que les réponses dans l'EAE et la CIA étaient surtout médiées par les Th17<sup>12</sup>. En effet, alors que les souris déficientes pour l'IL-12 p40 sont résistantes à l'induction de l'EAE<sup>25</sup>, les souris déficientes pour l'IFN $\gamma$  sont plus sensibles<sup>26</sup>. La découverte de l'IL-23, composée de l'IL-12p40 associée à une chaîne distincte (p19), a conduit à une réévaluation des contributions relatives de l'IL-12 et de l'IL-23 dans l'induction de l'EAE<sup>27</sup>. En effet, c'est l'IL-23, et non l'IL-12, qui joue le rôle principal dans l'induction de l'EAE<sup>27</sup>. En raison du lien entre l'IL-23 et l'expression de l'IL-17, une nouvelle lignée de Thelpers, les Th17, a rapidement été identifiée par la suite<sup>28,29</sup> et est détaillée ci-dessous.



## 1.2b Les Th2

Les Th2 occupent une place prépondérante dans la réponse aux infections à helminthes et à l'exposition aux venins. Ils sont également impliqués dans le développement de diverses maladies allergiques telles que l'asthme, la dermatite atopique, la rhinite allergique et l'allergie alimentaire. Une décennie après l'introduction de l'hypothèse Th1/Th2, des avancées ont permis d'identifier GATA3 comme le facteur de transcription majeur responsable de la différenciation des Th2<sup>30</sup> (Figure 1). Suite à l'engagement du TCR et en présence d'IL-4, l'expression de GATA-3 est augmentée grâce à STAT6, permettant la sécrétion d'IL-4, IL-5, IL-10 et d'IL-13. Les Th2 agissent sur la prolifération des lymphocytes B et la commutation de classe des Ig en IgE et induisent aussi l'activation des éosinophiles et mastocytes ainsi que la polarisation des macrophages vers un phénotype de type M2<sup>22</sup>.

## 1.2c Les Th9

Plus récemment identifiés, les Th9 sont caractérisés par leur capacité à produire l'IL-9. Ils jouent principalement un rôle dans les réactions allergiques et dans la réponse immunitaire contre les parasites extracellulaires. Ils ont un lignage très proche de celui des Th2. En effet, STAT6 et GATA3 (facteurs de transcription majeurs dans la différenciation Th2) sont également cruciaux pour les Th9. Il a d'ailleurs été proposé que les Th9 ne seraient qu'une sous-population de Th2 chez l'homme<sup>31</sup>. Cependant et contrairement aux Th2, la différenciation des Th9 dépend également du facteur de transcription PU.1 ce qui peut conduire à les classer comme une population à part entière<sup>32</sup>. La polarisation en Th9 est obtenue *in vitro* en stimulant des LT naïfs avec de l'IL-4 et du TGF- $\beta$ <sup>33</sup> (Figure 1).

En plus de leur implication dans les allergies et la réponse anti-parasitaire, les Th9 seraient fortement impliqués dans la réponse antitumorale (notamment dans le cadre des mélanomes)<sup>34,35</sup>.

## 1.2d Les Th17

Les Th17 ont été décrits pour la première fois en 2005 par Park *et al*, et Harrington *et al*, des groupes de Casey Weaver et Chen Dong, qui identifient un nouveau lignage distinct des Th1 et

Th2<sup>28,29</sup>. Ces Th17 produisent de l'IL-17a, de l'IL-17f, de l'IL-21 et de l'IL-22. ROR $\gamma$ t a ensuite été identifié comme le facteur de transcription majeur impliqué dans le lignage Th17<sup>36</sup>. L'induction de ROR $\gamma$ t dépend de STAT3, qui est préférentiellement activé par IL-6, IL-21 et IL-23, et joue un rôle essentiel dans la régulation de la production d'IL-17. ROR $\gamma$ t doit probablement coopérer avec d'autres facteurs de transcription, comme IRF4, dans l'induction des Th17 mais tous n'ont pas encore été identifiés<sup>37</sup>. En plus de ROR $\gamma$ t, les Th17 expriment de façon sélective ROR $\alpha$  même si son rôle dans la différenciation Th17 est plus discrète (en effet Yang *et al*, ont montré que la délétion de ROR $\alpha$  a un effet minime sur la production de l'IL-17<sup>38</sup>).

*In vitro*, les Th17 peuvent être induits en stimulant des CD4 naïfs en présence d'IL-6 et de TGF- $\beta$ <sup>39-41</sup>. A noter qu'une dose trop élevée de TGF- $\beta$  peut à l'inverse altérer la polarisation en Th17 en favorisant la différenciation en T régulateur induit (iTreg). Enfin, en cas de stress cellulaire le TGF- $\beta$  n'est plus nécessaire à la différenciation Th17 comme le montre les travaux de Verena Brucklacher-Walder *et al*<sup>42</sup>. L'IL-21 produite par les Th17 a également un effet autocrine renforçant le processus de polarisation des Th17 (ce qui montre que le développement des Th17 a une logique similaire à celle des Th1 et Th2)<sup>43</sup>.

A l'homéostasie, les Th17 sont enrichis dans les tissus barrières, notamment le tractus gastro-intestinal, les poumons et la peau. Dans ces tissus, ils assurent une protection contre les bactéries et les champignons pathogènes extracellulaires, tout en régulant la composition et la translocation du microbiote commensal. Ils maintiennent l'équilibre des tissus et sont également impliqués dans la réparation tissulaire. Ils sont capables de participer à la réponse antimicrobienne en induisant l'expression de chemokines et peptides antimicrobiens *via* l'IL-17 et l'IL-22 (impliqués dans la régulation du microbiote)<sup>44</sup>. L'IL-22 promeut également la réparation des tissus (en favorisant la fermeture des voies d'entrée potentielles des micro-organismes). Les Th17 pourraient également exercer une action antimicrobienne directe *via* la sécrétion de granulysin (GNLY), granzyme B (GzB), granzyme A (GzA), perforin et de piège extracellulaire (TET)<sup>5</sup>. Enfin, dans une récente étude d'Enamorado *et al*, il a été montré que les Th17 *via* l'IL-17a peuvent promouvoir la régénération des neurones sensitifs après une blessure avec rupture de la barrière cutanée dans modèle d'infection à *Staphylococcus aureus*<sup>45</sup>.

A l'opposé, dans un contexte d'inflammation sévère (en présence d'IL-23 et d'IL-1 $\beta$ ), ils participent à l'induction de nombreuses MAI spécifiques d'organe (psoriasis, arthrite rhumatoïde, sclérose en plaque, IBD et asthme) : on parle alors de Th17 pathogénique (Th17p)<sup>46</sup>. Cette fonction pathogénique se traduit par l'expression d'IFN $\gamma$  et de « granulocyte

macrophage colony-stimulating factor » (GM-CSF) par les Th17p. Ces Th17p expriment également souvent T-bet et sont donc parfois appelés Th1.17. Le rôle pathologique des Th17 est détaillé dans la partie 1.3.

Concernant le rôle des Th17 dans le cancer, il est débattu et incertain. Chez la souris, l'IL-17 semble important pour la tumorigenèse dans un large éventail d'organes (côlon<sup>47,48</sup>, le pancréas<sup>49</sup>, le poumon<sup>50</sup> et la peau<sup>51</sup>). De plus, l'inhibition de l'IL-17 pourrait améliorer la sensibilité à la chimiothérapie et à la radiothérapie dans des modèles murins<sup>52-54</sup>. Ainsi comme le montre la revue de Zao *et al*, les Th17 via la sécrétion d'IL-17 peuvent avoir un rôle pro-tumoral en jouant sur la mobilisation des cellules myéloïdes immunosuppressives, des fibroblastes associés au cancer (CAF)<sup>55</sup>. A l'inverse, la revue de Vitiello *et al* montre que les Th17 *via* la sécrétion d'IL-17 joueraient un rôle anti-tumoral direct via l'induction d'apoptose des cellules tumorales et l'activation directe des cellules immunitaires antitumorales (NK et macrophages, et recrutement des neutrophiles)<sup>56</sup>. Enfin, ils auraient également un rôle indirect dans la promotion des LT IFN $\gamma$ <sup>+</sup>, le recrutement des T, NK, neutrophiles et DC dans les cancers œsophagiens<sup>57</sup>.

### 1.2e Les T CD4 cytotoxiques

Récemment, des études ont mis en évidence une « nouvelle » sous-population de Teff : les T cytotoxiques. Ces LT expriment des molécules clés associées aux granules cytolytiques tels que les granzymes (GZM) et la perforine (PRF1) et possèdent une cytotoxicité directe jouant un rôle bénéfique dans l'immunité contre les pathogènes et les cellules tumorales. Les LT cytotoxiques peuvent également induire la mort grâce à un deuxième mécanisme distinct, l'expression des récepteurs de mort de surface tels que Fas ligand ou « TNF-related apoptosis-inducing ligand » (TRAIL)<sup>58,59</sup>. La reconnaissance de ces ligands par la cellule cible entraîne la mort cellulaire, *via* l'apoptose à la suite de l'activation des caspases<sup>60,61</sup>. Ainsi, TRAIL et FAS, peuvent induire la mort des cellules cibles tout comme l'exocytose des granules cytolytiques.

A l'origine, ces LT ont été mis en évidence dans le contexte d'infections virales chroniques où ils participent à la clairance du virus, ils ont ensuite été identifiés dans certains cancers<sup>4</sup>. Enfin, ils sont également retrouvés dans de nombreuses MAI (maladie à IgG4<sup>62</sup>, lupus<sup>63</sup>, scléroses<sup>64</sup>, etc) où ils ont un rôle plus délétère. Comme le récapitule la revue de Takeuchi *et al*, ils peuvent se développer à partir de différents sous-groupes de Thelper (Th0, Th1, Th2, Th17 et Treg). Ils semblent cependant être étroitement liés aux Th1 car malgré leur phénotype varié, ils produisent des cytokines associées aux Th1 comme l'IFN $\gamma$ , le TNF $\alpha$  et l'IL-2<sup>65</sup>. Leur différenciation

semble dépendre de l'expression du « class I-restricted T cell-associated molecule » CRTAM. En effet, une petite fraction des LT CD4 activées expriment CRTAM, et cette population exprime de forts niveaux de Granzyme B (GzmB), d'IFN $\gamma$ , et d'Eomes. Ces cellules peuvent présenter une cytotoxicité en culture. De plus, un « knock-in » de CRTAM dans les T *in vivo* (dans un modèle de souris transgénique lck-cre lox) induit une augmentation de la différenciation des T cytotoxiques (Figure 1)<sup>66</sup>.

*In vivo*, dans des modèles murins de cancer, le transfert de LT CD4 possédant un TCR transgénique (reconnaissant l'antigène TRP-1), permet l'élimination des cellules tumorales de façon dépendante du CMH-II *via* le GzmB et la perforine 1 (PRF1), mais indépendamment des voies de Fas ou TRAIL<sup>67</sup>. Tandis que dans un modèle d'infection chronique à LCMV, chez des souris déficientes en  $\beta$ 2-Microglobulin (donc sans CMH de classe I), les LT CD4 cytotoxiques peuvent lyser les cellules cibles infectées par le LCMV par la voie de Fas<sup>59</sup>.

### **1.2f Les Th Folliculaires (Tfh)**

Les Tfh sont une population spécialisée dans l'aide aux lymphocytes B situés dans les structures lymphoïdes. Ces Tfh expriment simultanément les marqueurs de surface CXCR5, ICOS et PD-1. Le facteur de transcription clé pour leur lignage est Bcl6<sup>68,69</sup>. Via la sécrétion d'IL-21 (et d'IL-4) et l'expression de CD40L, les Tfh aident les lymphocytes B à proliférer, survivre et se différencier et donc à supporter la production d'anticorps (aide au switch des isotypes d'Ig)<sup>2,43,70</sup>. Récemment, les Tfh ont fait l'objet d'études approfondies dans le contexte de la réponse anti-tumorale. En effet, les Tfh colocalisés avec des lymphocytes B peuvent être présents dans certains tissus et sont associés à la formation de structures lymphoïdes tertiaires (TLS)<sup>71</sup>. La présence de Tfh est largement corrélée à des résultats cliniques favorables et à des réponses thérapeutiques améliorées dans la majorité des types de tumeurs solides (notamment le cancer du sein<sup>72</sup>, le cancer colorectal<sup>73</sup>, le cancer de la tête et du cou<sup>74</sup>, le mélanome<sup>75</sup> et le cancer des cellules rénales<sup>76</sup>). Cependant, il n'est à l'heure actuelle pas établi que les Tfh et les TLS participent activement à la réponse antitumorale, même si ceci a été récemment suggéré dans des modèles de souris déficients pour Bcl-6<sup>77</sup>.

De même, les Tfh ont été retrouvés en plus grande proportion dans le LCR des patients atteints de MS et pourraient avoir une fonction pathogénique dans cette maladie<sup>78</sup> ainsi que dans l'EAE chez la souris<sup>79</sup>.

## 1.2g Les Treg

Les différents types de Th ont un pouvoir effecteur pléiotropique, et doivent être finement contrôlés pour éviter une réponse immunitaire excessive et maintenir une auto-tolérance. Les Tregs, sont des cellules clés dans ce rétro-contrôle des réponses inappropriées ou excessives.

Le concept de LT 'suppresseurs' existe depuis le début des années 1970, avec leur première description par Gershon<sup>80</sup>. En 1995, une étude majeure de Sakaguchi et ses collègues permet la caractérisation de LT CD4 exprimant CD25 (chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-2) qui peuvent exercer une activité régulatrice<sup>81</sup>. En 2003, un autre bond significatif est fait avec la découverte de Foxp3, régulateur essentiel du développement, de la fonction et de l'homéostasie des Tregs.<sup>82,83</sup> Cette fonction cruciale de Foxp3 a d'abord été mise en évidence par les études chez les patients atteints du syndrome d'auto-immunité systémique Immune dysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X-linked (IPEX), qui sont atteints de mutations dans le gène *foxp3*<sup>84</sup>. Ce phénotype a été confirmé chez la souris Scurfy, un mutant spontané de Foxp3, et chez les souris Foxp3-KO, toutes deux atteintes d'auto-immunité létale 3 semaines après la naissance.<sup>82</sup> D'autres facteurs de transcription participent à la fonction, l'homéostasie et la spécification des Treg. J'ai pu les aborder dans l'article de revue de la littérature « Transcriptional Control of Regulatory T Cells in Cancer : Toward Therapeutic Targeting? » que j'ai écrit au début de ma thèse et qui est disponible en Annexe 1.

Il existe deux types de Treg principalement définis par leur lieu de développement : les tTreg et les pTreg

- Les tTreg se développent dans le thymus. Certains thymocytes CD4 SP portant un TCR de forte affinité pour le complexe CMH II+peptide, échappent à la sélection négative et augmentent leur expression de CD25 et de certains récepteurs au TNF comme GITR. Ces « précurseurs de Treg » (TregP), sous l'action de cytokines possédant une chaîne  $\gamma$  (en particulier l'IL-2 et ou l'IL-15) vont ensuite exprimer Foxp3<sup>85</sup>. Une deuxième voie de développement a récemment émergé, basée sur l'identification d'un autre précurseur Treg exprimant un faible niveau de Foxp3 et dépourvu d'expression de la surface cellulaire CD25 (Foxp3lo TregP).<sup>85</sup>.

- Les pTreg se développent en périphérie à partir de LT CD4 conventionnels naïfs, à la suite d'une stimulation antigénique et en présence de certaines cytokines, en particulier le TGF-b.

- Enfin, les Treg peuvent être induits *in vitro* à partir de LT CD4 naifs, par une stimulation antigénique en présence de TGF- $\beta$  ; on parle alors de iTreg.

La contribution sélective de ces différentes populations de Treg reste mal comprise, en particulier du fait du manque de marqueurs phénotypiques entièrement spécifiques permettant de les différencier *in vivo*. Par exemple, Helios a été proposé comme un facteur de transcription spécifique des pTreg<sup>86</sup>, et la Neuropiline 1 comme marqueur des tTreg<sup>87</sup> ; mais ces données sont très controversées<sup>88</sup>. Certains éléments épigénétiques, comme la déméthylation du promoteur et des CNS de *Foxp3* plus prononcée dans les tTreg, sont intéressants mais difficilement utilisables pour phénotyper les cellules<sup>89,90</sup>.

Néanmoins les Treg sont absolument critiques au rétrocontrôle des réponses immunitaires, et exercent leurs fonctions inhibitrices *via* de nombreux mécanismes (Figure 2) :

- la sécrétion de cytokines immunosuppressives comme le TGF- $\beta$  et l'IL-10<sup>91,92</sup>
- la cytotoxicité directe médiée par la granzyme<sup>93</sup>
- la perturbation métabolique : ils peuvent supprimer l'activité des Tconv par des mécanismes métaboliques, incluant l'apoptose induite par la privation d'IL-2<sup>94</sup>, la génération d'adénosine par CD39 et CD73<sup>95</sup> (l'adénosine va sur le récepteur à l'adénosine A2A des LT activés et inhibe leur prolifération)<sup>95</sup> et le transfert de l'AMP cyclique qui entre dans les LT conventionnelles *via* des jonctions intercellulaires (qui est un second messager inhibiteur de la prolifération et de la synthèse d'IL-2 dans les LT)<sup>96</sup>
- et enfin la modulation de la fonction des cellules présentatrices d'antigènes (APC) *via* l'interaction de molécules de surface telles que CTLA-4<sup>97</sup> et LAG-3 avec CD80/CD86 et MHC de classe II respectivement<sup>98-100</sup>.

Les Treg sont virtuellement impliqués dans chaque type de réponse immunitaire. Bien que leur rôle le plus préminent soit l'inhibition de l'auto-immunité, ils sont impliqués dans la suppression du rejet de greffe, les réponses anti-pathogènes<sup>91,92,101</sup>... Mais ils sont également des acteurs cruciaux de l'immunosuppression des tumeurs, ainsi leur présence est généralement de mauvais pronostic dans ce contexte<sup>102-104</sup>.

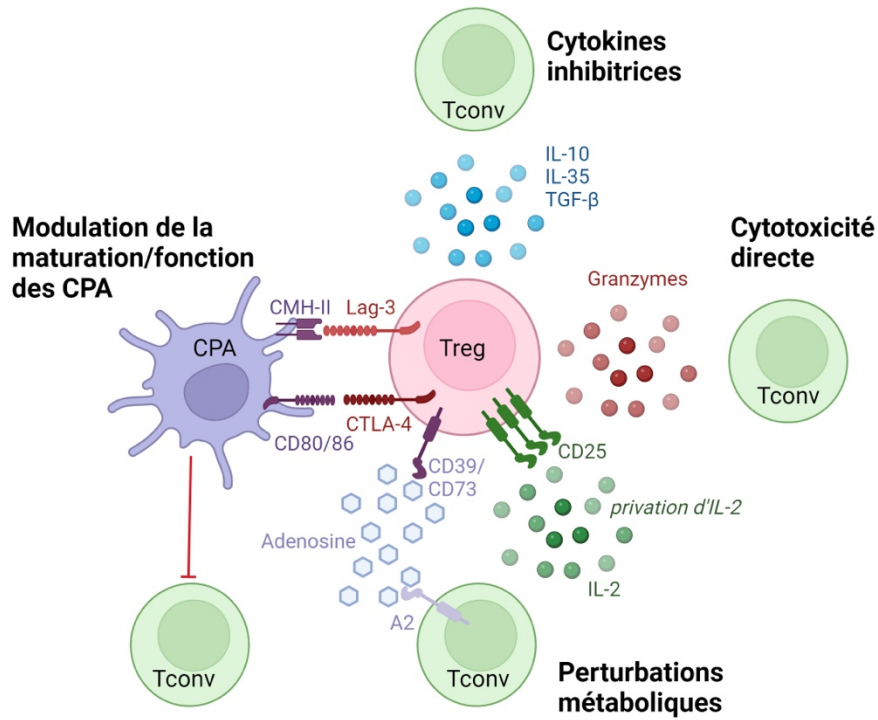


Figure 2 : Mécanismes d'inhibition des Treg, inspiré de Vignali et al<sup>101</sup>

Pour conclure, on pourra noter que les différents types de Thelper et Treg ne sont pas des lignées fixes et sont soumis à une certaine plasticité<sup>14</sup>, comme illustrée en Figure 3.

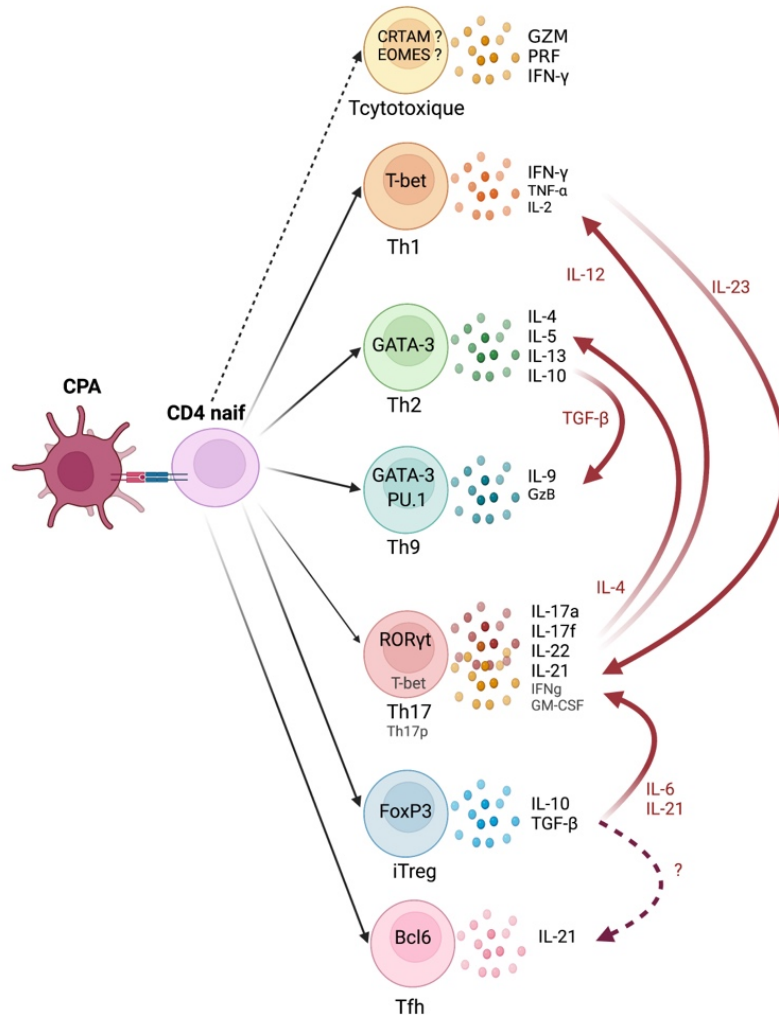


Figure 3 : Plasticité des différents lignages de Th.

Les différentes transdifférenciations de Th sont représentées par des flèches ainsi que les cytokines qui promettent cette plasticité.

### 1.3 Les LT CD4 dans le contexte de l'auto-immunité

#### 1.3a Perturbation de l'équilibre des LT dans les maladies auto-immunes et rupture de la tolérance

La tolérance immunitaire consiste en une série de mécanismes qui permettent au système immunitaire de reconnaître et de ne pas attaquer ses propres tissus. Dans les conditions normales, le système immunitaire est capable de faire la distinction entre les antigènes étrangers, tels que les bactéries ou les virus, et les antigènes du soi. Cependant, dans les MAI, ce processus est perturbé, provoquant une dysrégulation des LT CD4 effecteurs et régulateurs.



Au cours de leur développement thymique, les LT qui reconnaissent les antigènes du soi avec une avidité ou affinité trop haute, subissent un processus de sélection négative dans le thymus, où ils sont éliminés et/ou rendus inactifs. On parle de tolérance centrale. Son altération, par exemple chez les souris ou patients mutants pour le facteur de transcription AIRE, conduit à une auto-immunité systémique, illustrant le rôle majeur de la sélection négative<sup>105,106</sup>. En plus de ce phénomène, une série de mécanismes de tolérance périphérique permettent d'éviter l'inflammation ou l'auto-réactivité incontrôlées, et parmi eux, les Treg qui jouent un rôle crucial. Dans le cas d'un terrain génétique fertile et de facteurs environnementaux multiples (infections, agents toxiques, traumatismes), la tolérance immunitaire peut être rompue. Les mécanismes exacts à l'origine de la perte de tolérance immunitaire restent encore à élucider et sont probablement différents d'une MAI à l'autre, mais cette perturbation conduit souvent à une activation des LT CD4 auto-réactifs, à une expansion incontrôlée et une infiltration dans les tissus cibles. Ainsi, comprendre les mécanismes sous-jacents de cette fonction aberrante des LT effecteurs est crucial et c'est dans ce contexte que s'inscrit mon travail de thèse<sup>7</sup>.

### **1.3b La Sclérose En Plaque (SEP)**

#### Présentation de la maladie :

La SEP est une MAI chronique, démyélinisante et neurodégénérative du système nerveux central (SNC). La caractéristique pathologique de la SEP est l'accumulation de lésions de démyélinisation dans la substance blanche et grise du cerveau et de la moelle épinière. Les manifestations cliniques et l'évolution sont hétérogènes : chez la plupart des patients, les premières phases de la maladie se caractérisent par des épisodes réversibles de déficits neurologiques (appelés poussées) qui durent généralement de quelques jours à quelques semaines (SEP récurrente-rémittente, SEP RR) qui évoluent avec le temps en déficits neurologiques permanents (SEP progressive secondaire, SEP PS). Certains patients peuvent également présenter une évolution progressive de la maladie dès le début, c'est ce qu'on appelle SEP progressive primaire<sup>107</sup>.

#### Traitements :

Le traitement de la SEP RR comprend généralement deux volets : la gestion des poussées et la thérapie à long terme pour ralentir la progression de la maladie<sup>108</sup>. Les poussées de SEP sont souvent traitées par des corticostéroïdes à haute dose, pour réduire l'inflammation et accélérer la récupération. Concernant la thérapie de fond, le but est de ralentir la progression de la SEP RR via différentes approches immunothérapeutiques, notamment :

### **L'immuno-modulation :**

- les interférons bêta : ils ont une action pléiotrope, le mécanisme d'action dans le cadre de la SEP n'est pas bien compris à ce jour mais il peuvent, par exemple, agir en augmentant la production d'IL-10 par les LT CD4<sup>109,110</sup>.
- l'acétate de glatiramère : il s'agit d'un mélange de peptides obtenus par polymérisation d'acides aminés de la « myelin basic protein ». Son mécanisme d'action est une nouvelle fois mal compris mais il semblerait qu'il agisse en perturbant la présentation antigénique et en augmentant la sécrétion de molécules anti-inflammatoire<sup>111,112</sup>.
- l'ocrelizumab : c'est un anticorps monoclonal humanisé recombinant qui cible sélectivement les lymphocytes B exprimant le CD20. Il entraîne une immunomodulation par la réduction du nombre et de la fonction des lymphocytes B<sup>113</sup>.

### **Diminuer le recrutement des lymphocytes :**

- le fingolimod : c'est un modulateur des récepteurs à la sphingosine 1-phosphate (S1P). En agissant comme un antagoniste fonctionnel des récepteurs à la S1P sur les lymphocytes, le fingolimod provoque leur séquestration dans les ganglions, ce qui entraîne une redistribution des lymphocytes, (plutôt qu'une déplétion)<sup>114</sup>.
- et le natalizumab : c'est un inhibiteur sélectif des molécules d'adhésion. Il se fixe sur la sous-unité  $\alpha 4$  des intégrines, fortement exprimée à la surface de tous les leucocytes (à l'exception des neutrophiles). Le natalizumab bloque l'interaction de l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  avec la molécule MadCAM-1 (mucosal addressin cell adhesion molecule-1). L'inhibition de ces interactions moléculaires empêche la migration des leucocytes à travers l'endothélium vers les tissus parenchymateux inflammatoires<sup>115</sup>.

### **L'immunosuppression :**

- le tériflunomide : il inhibe la synthèse de base pyrimidique nécessaire à la synthèse d'ADN et bloque ainsi la prolifération des cellules immunitaires.
- la mitoxantrone : c'est un intercalant de l'ADN. *In vitro*, il s'est avéré inhiber la prolifération des LB, des LT, des macrophages, et réduire la présentation d'antigène, ainsi que la sécrétion de l'IFN $\gamma$  du TNF $\alpha$  et de l'IL-2<sup>116</sup>.

Enfin le diméthyl fumarate est également utilisé. Immunomodulateur/immunosuppresseur, son mécanisme est mal connu mais il pourrait favoriser la sécrétion de molécules anti-inflammatoires, limiter l'infiltration dans le SNC et protéger les cellules du SNC (voie anti-oxydante)<sup>117</sup>.

Ces médicaments ont des mécanismes d'action très différents, mais de façon générale, ils modulent le système immunitaire pour réduire l'inflammation et la destruction de la myéline dans le SNC. Aucun de ces traitements ne permet la guérison complète : ils améliorent la qualité

de vie des patients et ralentissent la progression de la maladie, aussi de nouvelles immunothérapies doivent encore être recherchées afin de traiter plus efficacement la SEP.

#### Physiopathologie :

Depuis la fin du XIX<sup>e</sup> siècle, deux concepts ont été proposés pour tenter d'expliquer l'apparition de la maladie. Le plus communément admis ces 30 dernières années est l'hypothèse d'une intervention causale du système immunitaire en dehors du SNC<sup>118,119</sup>. Ainsi, le système immunitaire une fois activé anormalement "en périphérie" pourrait acquérir des propriétés de reconnaissance de la myéline et entrer dans le SNC pour initier une réaction inflammatoire démyélinisante. Cette hypothèse est appuyée par la localisation des plaques de démyélinisation (près des capillaires et veinules) et font suite à une rupture de la barrière hémato-encéphalique (BHE). La seconde hypothèse est que la SEP est initialement déclenchée par un processus pathologique au sein du SNC, qui induirait secondairement une réponse auto-immune. Ce concept permettrait d'expliquer pourquoi les cellules immunitaires ne s'attaquent qu'au SNC et pas à d'autres organes. Le mécanisme initial responsable de la pathologie reste à ce jour encore à découvrir. Cependant, de récentes études, suggèrent que le virus d'Epstein-Barr (EBV) serait particulièrement impliqué dans la pathogenèse de la SEP. Bjornevik *et al* ont montré dans une cohorte de 10 millions de personnes que le risque de SEP est multiplié par 32 après une infection par l'EBV spécifiquement, et que l'infection précède toujours les premiers signes de la maladie<sup>119</sup>. Mécanistiquement, Lanz *et al* montrent un mimétisme moléculaire entre l'antigène nucléaire 1 de l'EBV (EBNA1) et la molécule d'adhésion des cellules gliales (GlialCAM). Dans un premier temps, ils ont identifié un anticorps provenant du LCR d'un patient atteint de SEP qui est lié à un épitope de EBNA1 et qui présente une réaction croisée avec la GlialCAM. Ensuite, ils ont montré que cet anticorps « croisé » est présent chez 20-25% des patients atteints de SEP. Enfin, l'immunisation de souris EAE avec cet épitope EBNA1 exacerbe la démyélinisation auto-immune. C'est le premier lien mécanique entre l'infection par l'EBV et la sclérose en plaques<sup>118</sup>.

Tous les mécanismes à l'origine de la rupture de la BHE ne sont pas encore élucidés mais nous savons qu'elle est en partie causée par les effets de cytokines et chémokines pro-inflammatoire (comme l'IL-17, l'IL-22, l'IL-1 $\beta$ , L'IL-6 et le TNF $\alpha$ ). Par exemple, les études *in vitro* et *in vivo* de Hania Kebir *et al*, suggèrent que l'IL-17a et l'IL-22 jouent directement un rôle dans l'altération de BHE. En effet, les cellules endothéliales de patients expriment fortement l'IL-17R et l'IL-22R près des lésions de SEP (contrairement aux donneurs sains où il n'y a pas d'expression); de plus l'addition d'IL-17a ou d'IL-22 à des monocouches de cellules endothéliales cérébrales humaines induit une augmentation marquée de la perméabilité de façon

dose dépendante<sup>120</sup>. En parallèle, en périphérie, il a été montré que les cellules myéloïdes avec un profil pro-inflammatoire et sécrétant des cytokines telles que l'IL-23 et l'IL-1 $\beta$ , sont impliquées dans la différenciation des Th17 pathogéniques<sup>121,122</sup>. Ainsi, après leur activation en périphérie, les LT expriment des récepteurs aux chimiokines (tels que le récepteur de chimiokine 6 (CCR6), CCR2 et CCR5) et des molécules d'adhésion, ce qui les aidera à passer la BHE et infiltrer le SNC. Les Th17 pathogéniques vont sécréter du GM-CSF qui permet le recrutement, l'activation et la maturation et activation des monocytes, des macrophages et des cellules gliales<sup>107,123</sup>. Cette augmentation de la migration et activation des cellules immunitaires dans le CNS entraîne une inflammation, une démyélinisation et finalement une perte d'oligodendrocytes, une glie réactive et une dégénérescence neuro-axonale (Figure 4).

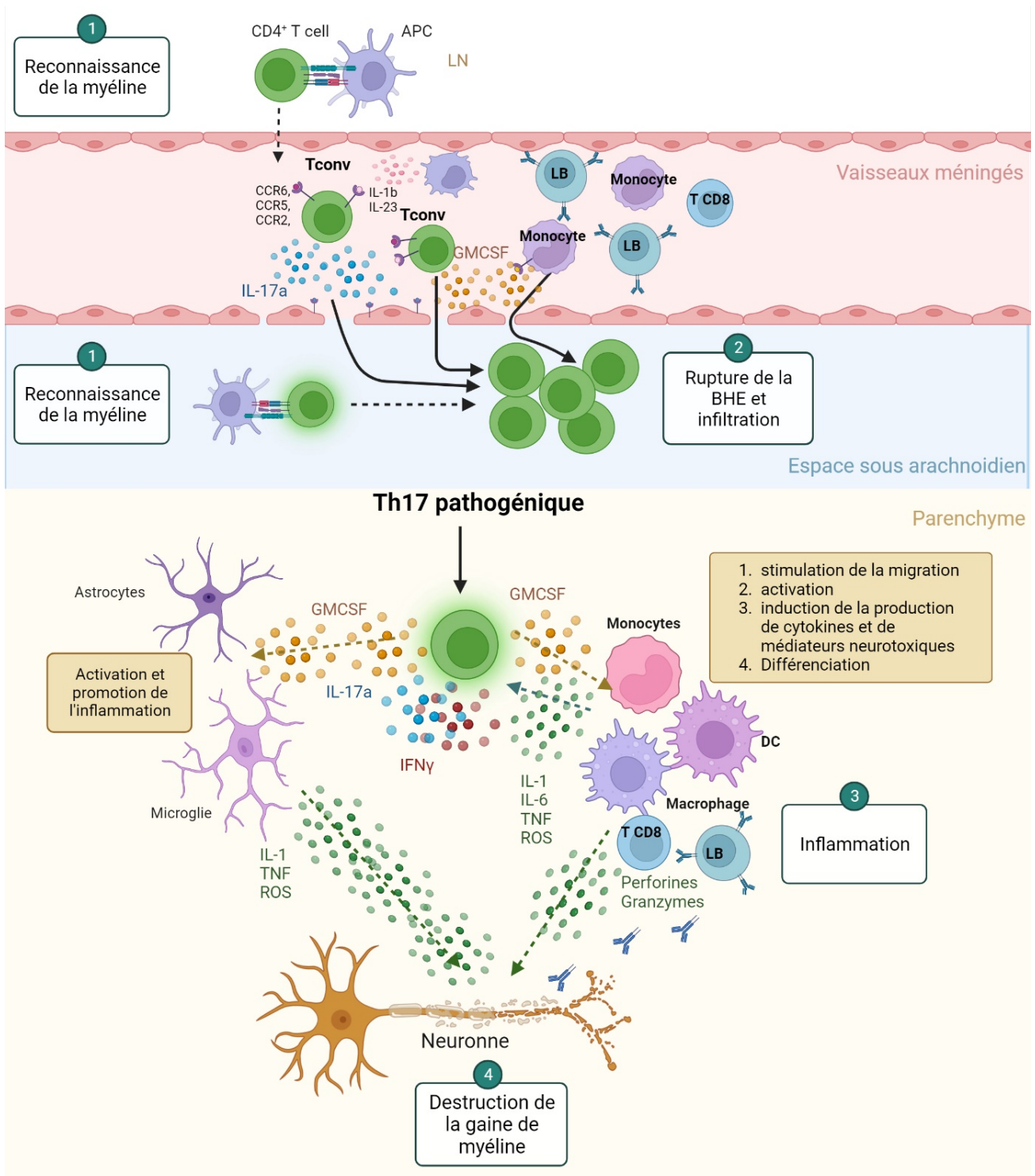


Figure 4 : Mécanisme physiopathologique de la SEP :

Les LT reconnaissent la myéline et sont activées. La BHE est rompue notamment via l'IL-17a, sécrétée par les Th17. Ainsi les cellules immunitaires s'infiltrèrent dans le SNC. Une fois à l'intérieur du SNC, les Th17 libèrent d'importantes concentrations de GM-CSF, activant ainsi les macrophages dérivés de monocytes et la microglie, conférant à ces cellules des fonctions pro-inflammatoires destructrices. La neuro-inflammation entraîne une destruction de la gaine de myéline.

Pour étudier la SEP, des modèles murins ont été développés afin de mieux comprendre les mécanismes cellulaires. L'EAE est le modèle animal le plus couramment utilisé pour étudier la SEP. Bien que l'EAE ne reproduit pas exactement la physiopathologie humaine, de nombreux événements moléculaires et cellulaires identifiés grâce à ce modèle se sont révélés pertinents chez les patients atteints de SEP. Dans le cadre de ma thèse, nous avons utilisé un modèle d'EAE actif qui consiste à immuniser une souris avec un peptide de myéline couplé à un adjuvant, ce qui induit une inflammation du SNC et l'activation et le recrutement de LT spécifiques de la myéline, tout comme on l'observe dans la SEP chez l'homme (Figure 5). Les symptômes de l'EAE sont variés, mais globalement on observe une paralysie progressive qui se propage des membres postérieurs vers les membres antérieurs. Afin d'évaluer la progression de la maladie, des échelles de score cliniques, comme l'échelle de Hooke, sont utilisées pour mesurer la paralysie progressive. Grâce à ce modèle, le rôle clés des T effecteurs dans la pathogénicité a pu être étudié en détails.

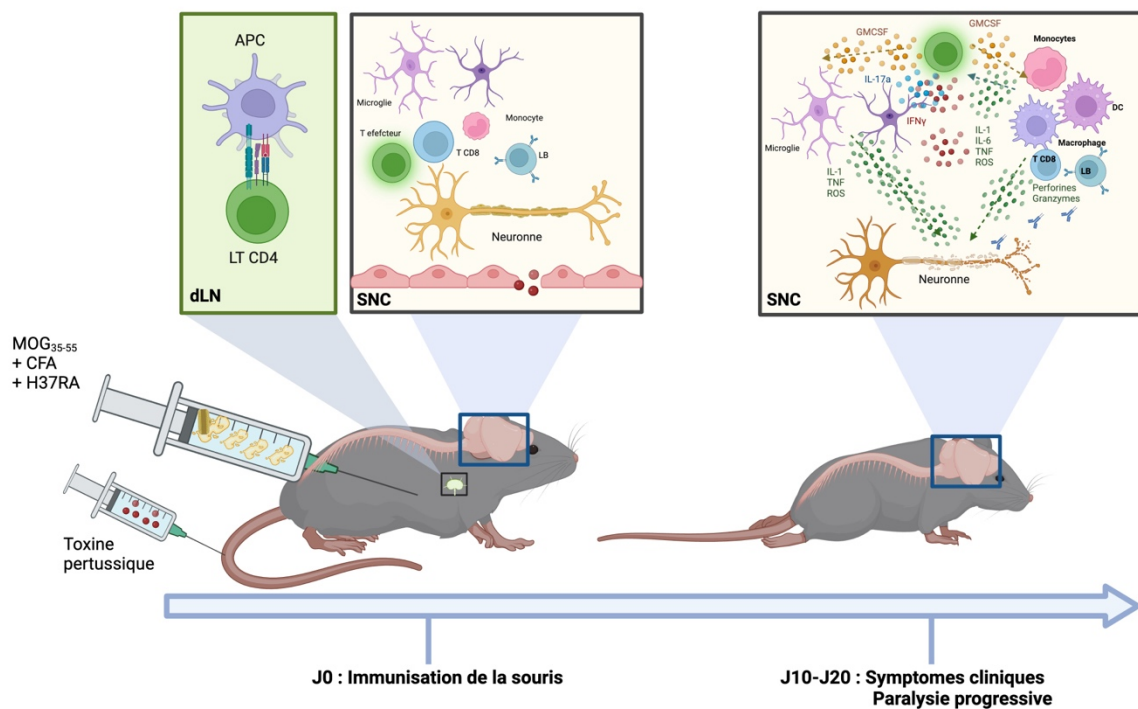


Figure 5 : Modèle de l'EAE :

Les souris sont immunisées avec une émulsion de peptide 35-55 de myéline (MOG<sub>35-55</sub>) et des adjuvants (adjuvant complet de Freund (CFA) et du Mycobacterium tuberculosis (H37RA)). Elles seront également traitées avec la toxine de Bordetella pertussis, pour induire l'EAE. Cette immunisation entraîne une neuro-inflammation et paralysie progressive.

### Les Th17, médiateurs pathogéniques :

Alors qu'initialement les Th1 étaient considérés comme les médiateurs principaux de l'EAE et de la SEP, l'utilisation de souris déficientes pour l'IFN $\gamma$  ou son récepteur, ont montré que ce n'est en fait pas le cas<sup>26,124</sup>. De nos jours, les Th17 sont considérés comme la population pathogénique clé dans l'EAE et la SEP. Chez l'homme, ils sont présents en plus grand nombre dans le Liquide Céphalo Rachidien (LCR), le sang des patients<sup>125</sup> mais également dans le SNC au niveau des lésions actives par rapport aux lésions inactives<sup>126</sup>. De même, une étude menée par Capone et ses collègues a montré que les Th17 des patients atteints de SEP régulent à la hausse l'expression de l'IL-1R et produisent des niveaux plus élevés d'IL-21, d'IL-2 et de TNF $\alpha$ <sup>127</sup>. Chez la souris, la fonction des Th17 a été approchée dans un premier temps par Samoilova *et al* en induisant l'EAE dans des souris *Il6*<sup>-/-</sup>. Les souris sont protégées contre la maladie du fait d'une mauvaise activation des LT<sup>128</sup>. Betteli *et al* montreront ensuite que l'IL-6 est cruciale pour la différenciation en Th17<sup>39</sup>. L'IL-17 en elle-même n'est cependant pas la principale cytokine pathogène. En effet, Haak *et al* ont observé une protection contre l'EAE seulement partielle chez les souris déficientes pour les gènes de l'IL-17 (IL-17a<sup>-/-</sup> ou IL-17f<sup>-/-</sup> ou IL-17f<sup>-/-</sup> +Ac  $\alpha$ IL-17a) et à l'inverse pas d'aggravation de la maladie chez les souris surexprimant l'IL-17a<sup>129</sup>. De même, les souris traitées avec un anticorps antagoniste de l'IL-17a ne sont pas protégées<sup>28,129</sup>. C'est en fait le GM-CSF, également produit par les Th17, qui conduit aux symptômes de l'EAE. Cela a été montré par Codarri *et al* dans un élégant papier publié en 2010. Les auteurs montrent, en effet, que les souris *csf2*<sup>-/-</sup> sont complètement protégées contre l'EAE. De même, dans un modèle d'EAE passive, le transfert de LT CD4 GM-CSF+ induit une maladie plus forte que le transfert de LT CD4 IL-17a+. Du point de vue mécanistique, l'expression ectopique de ROR $\gamma$ t dans des LT CD4 augmente celle du GM-CSF. Toutefois, le rôle de ROR $\gamma$ t dans la production du GM-CSF par les T CD4 est débattu car les LT CD4 *RORc*<sup>-/-</sup> produisent la même quantité de GM-CSF *in vitro* que les LT WT<sup>130</sup>. Enfin, 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 $\gamma$ t<sup>131</sup> et l'IL1 $\beta$  peut également provoquer la sécrétion de GM-CSF dans les Th17 *in vitro*, tandis que l'IL-27, l'IFN $\gamma$  et l'IL-12 s'opposent à la production de GM-CSF<sup>132</sup>. Ces expériences permettent de définir une sous-population responsable de l'EAE, définie par son expression d'une cytokine et son phénotype à la fois Th1 et Th17 : les Th17 pathogéniques.

### Priming des LT :

Au cours de l'EAE, les LT CD4 sont activées dans les organes lymphoïdes secondaires et atteignent le SNC par le sang en passant la BHE. Plus précisément, il a été montré par Ronchi *et al* que lors de l'immunisation des souris et lors de l'injection de la Toxine Pertussique, les cellules myéloïdes CD11b+CCR2+Gr1+ vont être rapidement recrutées dans les ganglions drainant le site d'injection du peptide de myéline. Ces cellules vont produire de l'IL-1 $\beta$  permettant ainsi de primer les Th17 pathogénique<sup>121</sup>. Une fois dans le SNC, les LT sont réactivés par les CPA locales<sup>133</sup>

En plus du priming dans les ganglions drainants, de récentes études suggèrent un priming des LT dans les organes lymphoïdes de l'intestin et cutanés. En effet, grâce à un modèle de souris rapportrice photoconvertible qui permet suivi des LT, Hiltensperger *et al* montrent que les LT inguinaux et mésentériques migrent dans le SNC des souris immunisées. De plus, les LT inguinaux CXCR6+ migrent préférentiellement dans la substance grise alors que les LT mésentérique P2rx7+ infiltrent préférentiellement la substance blanche. Ces données montrent qu'un priming au niveau de l'intestin et de la peau a lieu et que les LT infiltrant le SNC présentent des phénotypes fonctionnels distincts selon leur provenance<sup>134</sup>.

Le priming dans l'intestin est particulièrement important pour la pathogénicité des LT et dépend largement du microbiote. Ainsi, dans des expériences d'EAE, les souris élevées dans un environnement « germ free » ou traitées par des antibiotiques ont des scores cliniques plus faibles que celles ayant un microbiote intact. Cette protection est réversible lors de la réintroduction d'un microbiote normal<sup>135,136</sup>. Ces études soulignent l'importance de prendre en compte le microbiote dans l'EAE.

De même chez l'homme, l'effet du microbiote sur le système immunitaire est important pour le développement et l'évolution de la SEP. Il peut moduler le SI via différents mécanismes comme la production de sérotonine et tryptophane, la promotion des Th17 pathogénique, l'augmentation de la production d'IgA par les LB... et donc impacter la neuro-inflammation<sup>137</sup>.

#### Dérégulation des Treg :

Il a été montré que les Treg sont également altérés dans la SEP et sont un facteur important à prendre en compte dans la pathogénicité de la maladie. Le groupe d'Hafler montre dans un premier temps que, bien que la fréquence des Treg soit inchangée dans le sang de patients atteints de SEP, leur capacité suppressive est diminuée<sup>138</sup>. De plus, Huan *et al* ont ensuite mis en évidence une diminution du niveau d'expression de FoxP3 (PCR et WB) dans les Treg isolés de patients atteints de SEP et une corrélation entre cette diminution et la perte de fonction des Treg (test d'inhibition in vitro)<sup>139</sup>.



Dans un second temps l'équipe de David Hafler, a montré que les patients atteints de SEP-RR non traités présentaient une fréquence accrue de Tregs de type Th1 dans le sang périphérique par rapport aux témoins sains. Ces Tregs de type Th1 (qui produisent de l'IFN $\gamma$ ) contribuent fortement aux dysfonctionnements de Tregs observés chez les patients atteints de SEP-RR. A l'inverse, le blocage de l'IFN $\gamma$  dans les essais de suppression en coculture avec des Tregs dérivés de la SEP-RR permet de rétablir leur capacité suppressive<sup>140</sup>. Finalement, il a montré qu'au cours de la reprogrammation Th1-Treg, la voie PI3K/AKT/Foxo1/3 est activée, déclenchant la sécrétion d'IFN- $\gamma$ <sup>141</sup>. Enfin, la population de Treg CD39+ est particulièrement importante pour la suppression des Th17 et est fonctionnellement altérée chez les patients atteints de SEP<sup>142</sup>. Ce rôle critique des Treg est également observé chez la souris dans des modèles d'EAE. En effet, la déplétion des Treg par l'injection d'un anticorps anti-CD25 aggrave les symptômes d'EAE et empêche la rémission spontanée de la maladie<sup>143</sup>. A l'inverse, l'injection de Treg spécifiques de la myéline diminue significativement les symptômes d'EAE<sup>144</sup>.

#### **1.4 Les LT CD4 dans le contexte du cancer**

##### LT et immunothérapies du cancer

Comme expliqué précédemment, le SI est capable de reconnaître et d'éliminer les cellules tumorales ; il s'agit du concept d'immuno-surveillance<sup>145,146</sup>. Ce concept ancien a été proposé dès 1909 par Paul Ehrlich mais sa vérification empirique ne sera établie qu'au cours des années 60 grâce à l'immunisation de souris contre des greffes syngéniques ou contre des tumeurs induites par des carcinogènes chimiques ou virales. Le concept de surveillance immunitaire suggère que le système immunitaire scanne constamment le corps à la recherche de cellules précancéreuses ou cancéreuses et les élimine avant qu'elles ne deviennent dangereuses<sup>145</sup>. Cette théorie est appuyée par des études qui montrent que les souris ayant subi une immunosuppression expérimentale sont plus susceptibles de développer des tumeurs viro-induites, et présentent une tendance accrue à développer des lymphomes spontanés par rapport aux souris avec un système immunitaire intact. Chez l'homme, les patients immunodéprimés suite à un traitement immunosuppresseur ou atteints du VIH semblent plus susceptibles de développer des cancers<sup>147</sup>. Il semble que la perforine et l'IFN $\gamma$ , produits par le SI, soient nécessaires au phénomène d'immunosurveillance<sup>148,149</sup>. Il est communément établi que la progression tumorale repose sur un concept d'immunoediting séparé en 3 phases :

1) **l'élimination**, consistant en fait en une immunosurveillance efficace. Comme illustré dans la Figure 6, la réponse antitumorale précoce pourrait consister en un recrutement et une

activation de cellules NK, NKT et  $T\gamma\delta$ . La boucle inflammatoire entraîne le recrutement d'un grand nombre de NK et de macrophages sur le site. Les NK et les macrophages infiltrant la tumeur tuent des nombreuses cellules tumorales par des mécanismes impliquant des ligands induisant l'apoptose, la perforine, le granzyme et les intermédiaires réactifs de l'oxygène et de l'azote<sup>145</sup>. La mort cellulaire permet la captation d'antigènes et la maturation des DC, qui vont ensuite se diriger vers les ganglions lymphatiques drainants. Ces DC activent des LT CD4 et CD8 naïfs, qui après prolifération et polarisation, se dirigent vers le site tumoral, où ils participent à la destruction des cellules tumorales<sup>145</sup>. Les LT CD8 cytotoxiques, activés par reconnaissance d'un complexe CMH-I+peptide, sont les cellules cytotoxiques prototypiques. L'engagement du TCR et des molécules de costimulation à la surface des cellules tumorales, conduit en particulier à la sécrétion de granules contenant du granzyme, de la perforine, de la cathepsine C ou de la granulysine, permettent la formation de pores dans la membrane de la cellule cible puis sa mort par apoptose. De même, les ligands de Fas (FASL), exprimés par les LT CD8, activent les domaines de mort (Fas-associated protein with death domains, FADD) de la cellule tumorale, ce qui entraîne l'activation des caspases et des endonucléases puis la fragmentation de l'ADN de la cellule cible et sa mort.

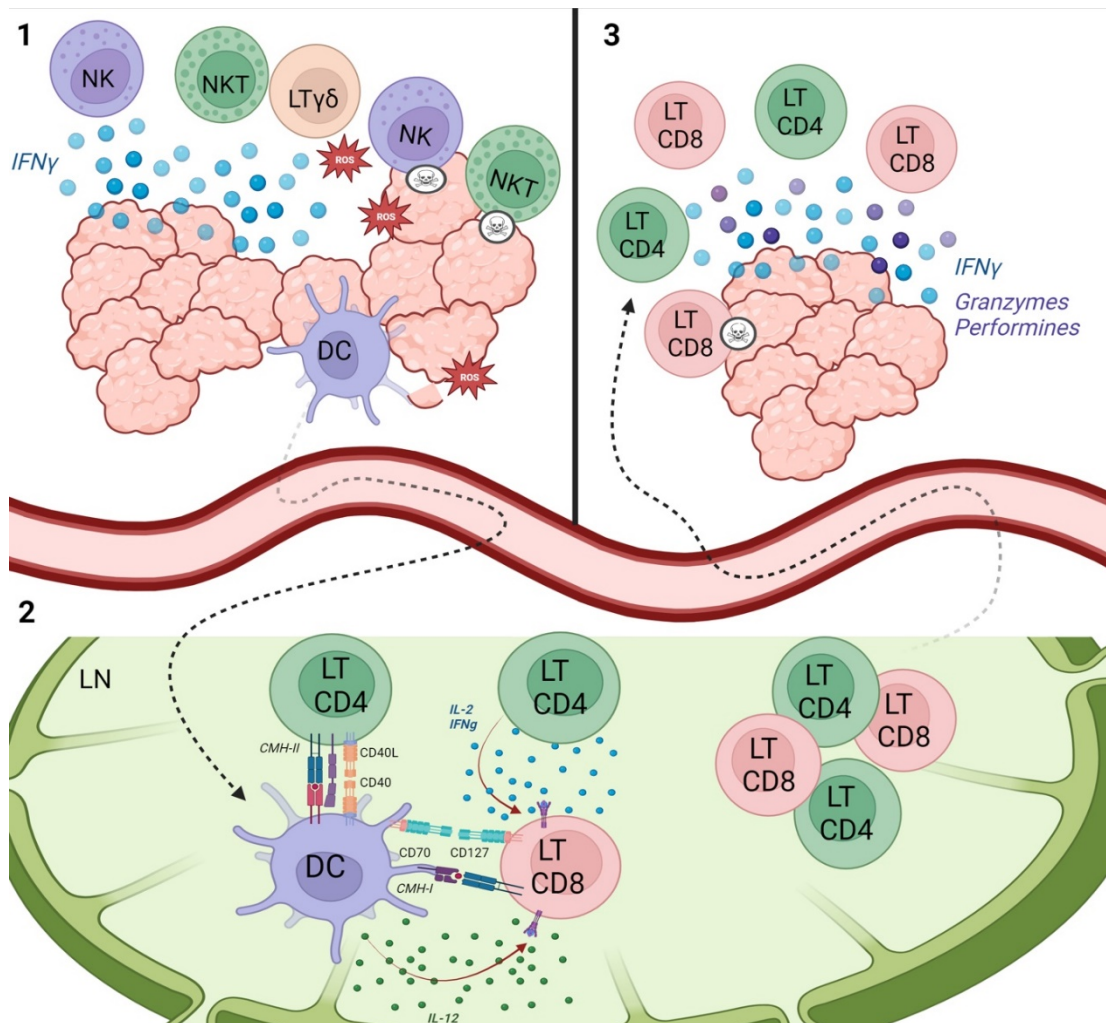


Figure 6 : Immunosurveillance et initiation de la réponse antitumorale.

1. L'initiation de la réponse commence avec les cellules de l'immunité innée (NKT, NK et cellules T  $\gamma\delta$  et DC) qui reconnaissent les cellules tumorales et produisent de l'IFN $\gamma$ . Cette production d'IFN $\gamma$  déclenche une cascade de réactions immunitaires innées dont permettant entre autres la sécrétion de chimiokines angiostatiques, une action antiproliférative de l'IFN- $\gamma$  sur la tumeur et le développement et l'activation de l'activité toxique des NK et macrophages. Ces événements entraînent la mort de certaines cellules tumorales par des mécanismes à la fois immunologiques et non immunologiques. Les cellules tumorales mortes ou les débris cellulaires de la tumeur sont traités par les cellules dendritiques qui migrent vers le ganglion lymphatique drainant. 2. La croissance de la tumeur est gardée sous contrôle par les NK et macrophages activés, tandis que les LT CD4 et LT CD8 spécifiques de la tumeur se développent dans le ganglion lymphatique drainant. 3. Les LT CD4 et CD8 spécifiques de la tumeur migrent vers la tumeur le long d'un gradient de chimiokines, où elles reconnaissent et détruisent les cellules tumorales.

2) Dans le cas d'une élimination partielle, une phase **d'équilibre** peut se mettre en place entre la destruction des cellules tumorales par le SI et leur croissance. Au cours de ce processus, le SI exercerait une puissante pression de sélection sur les cellules tumorales, suffisante pour les contenir, sans toutefois les éteindre complètement, un lit tumoral contenant de nombreuses

cellules génétiquement instables et mutant rapidement pourrait alors se créer. Il est possible qu'au cours de cette période de sélection, un grand nombre des variantes de la cellule tumorale originale soit détruites laissant place à de nouveaux variants plus agressifs entraînant probablement l'échappement immunitaire.

3) Ainsi, les tumeurs peuvent **échapper** au SI, soit à cause de raisons mécaniques (comme les fibroblastes dans le cas du cancer du pancréas, empêchant le contact avec les cellules immunitaires), soit dans le cas de la majorité des tumeurs avancées à cause d'une perte de leur immunogénicité vis-à-vis des LT. Cette baisse d'immunogénicité peut être due à une baisse de l'expression du CMH, voire des mutations dans ces gènes ou la machinerie de présentation antigénique<sup>145,150</sup>. Les cellules tumorales peuvent également créer un microenvironnement tumoral immunosuppresseur, notamment via le recrutement et/ou l'activation de populations immunitaires immunosuppressives telles que les Treg et les MDSCs (cellules suppressives d'origine myéloïde)<sup>145</sup>. De plus, certaines cellules tumorales expriment des protéines inhibitrices à leur surface, qui suppriment directement l'activation des cellules immunitaires. Un exemple typique est la protéine PD-L1 (Programmed death-ligand 1), qui inhibe l'activation des LT par interaction avec son récepteur PD-1 exprimé à la surface des LT activés. L'engagement de PD-1 entraîne le recrutement d'une phosphatase qui permet la déphosphorylation de plusieurs acteurs proximaux du TCR et de CD28 et donc d'antagoniser la cascade d'activation des LT dépendante du TCR<sup>151</sup>.

L'ensemble de ces mécanismes conduisent au dépassement du SI et donc à l'échappement. La découverte de ces phénomènes a conduit au développement des immunothérapies du cancer, visant à moduler le système immunitaire des patients pour détecter, détruire plus efficacement les cellules tumorales.

L'histoire des immunothérapies commence au début du XIX<sup>e</sup> siècle avec William Bradley Coley qui a observé qu'un patient atteint de sarcome a présenté une rémission spontanée après une infection bactérienne à *Streptococcus pyogenes*. Coley décida donc d'injecter des préparations de streptocoques directement dans les tumeurs. Cette approche thérapeutique, considérée comme le point de départ de l'immunothérapie des cancers, bien qu'abandonnée de nos jours, a eu des conséquences majeures : du point de vue conceptuel, Coley a établi l'immunothérapie comme une possibilité à prendre en considération dans le traitement des cancers et sur le plan fondamental, cette approche a permis la découverte du TNF qui peut provoquer la régression de sarcomes et d'autres tumeurs<sup>152</sup>. Depuis le début du XX<sup>e</sup> siècle jusqu'à nos jours, les immunothérapies ont connu un essor croissant, en commençant notamment par les greffes allogéniques. Ces greffes ont été les premières immunothérapies efficaces pour le traitement de certains cancers, tels que les leucémies et les lymphomes. La

première greffe de moelle osseuse a été réalisée par E. Donnall Thomas à New York en 1957, et Georges Mathé a obtenu des succès avec cette technique en 1963 à Villejuif. Aujourd'hui, les approches d'immunothérapies couramment utilisées visent à :

- **Substituer une réponse immunitaire déficiente** : les greffes allogéniques ou les traitements par CAR-T cells en sont un bon exemple. Les CAR-T cells (Chimeric Antigen Receptor T-cells) sont des LT modifiés génétiquement pour exprimer un récepteur chimérique spécifique à un antigène tumoral. Cette modification leur permet de cibler et de tuer les cellules cancéreuses de manière plus efficace. Il existe actuellement 7 médicaments CAR-T cells sur le marché français. Ils sont utilisés dans le traitement de certaines leucémies, lymphomes et myélomes.

- **Stimuler la réponse immunitaire antitumorale** : une autre stratégie consiste à stimuler une réponse anti-tumorale *de novo*. Par exemple, l'injection de cytokines immunostimulatrices comme l'interféron $\alpha$ 2b ou l'IL-2, est utilisée dans le traitement de certaines leucémies, de lymphomes, de myélomes, ou encore de mélanomes<sup>153,154</sup>. Les vaccins thérapeutiques sont également en plein essor, comme le Sipuleucel-T, premier vaccin thérapeutique commercialisé dans le cancer de la prostate aux Etats-Unis<sup>155</sup>. D'autre part, de nombreux essais qui visent à trouver des vaccins peptidiques tumoraux spécifiques de la tumeur d'un patient ou commun au sein d'un groupe de tumeurs<sup>156</sup>.

- **Réactiver une réponse immunitaire déficiente** : l'hypothèse majeure posée dans le cadre du cancer est que la réponse immunitaire (notamment T) est activement inhibée par l'engagement de récepteurs inhibiteurs (« point de contrôles immunitaires »). Dans ce contexte, le blocage de ces molécules pourrait avoir un effet stimulateur sur la réponse antitumorale. De ces travaux ont émergé une série de cibles thérapeutiques, notamment CTLA-4 et PD-1 qui ont révolutionné le traitement de certains cancers. Plusieurs anticorps anti-CTLA-4 et anti-PD(L)-1 sont désormais utilisés en première ligne de traitement dans le mélanome, le cancer du poumon ou le cancer du rein métastatiques<sup>140-143</sup>. A ce jour, des milliers d'essais thérapeutiques sont en cours pour tester l'efficacité du ciblage d'autres points de contrôle des familles CD28 ou TNFRSF. On peut notamment citer les anticorps anti-LAG-3, qui semblent avoir un effet bénéfique en combinaison à l'anti-PD-1, chez les patients atteints de mélanome métastatique<sup>161</sup>.

- **Rendre les cancers plus immunogéniques** : il a été montré notamment par Laurence Zitvogel et Guido Kroemer que certaines chimiothérapies peuvent rendre les cancers plus immunogènes<sup>162</sup>.

Dans le cadre du travail réalisé au laboratoire, comprendre le rôle des sous-unités de NF- $\kappa$ B dans la fonction protectrice des Teff pourrait conduire au développement de nouvelles immunothérapies prometteuses.

## Rôles des lymphocytes T CD4 dans le développement et le maintien de l'immunité anti-tumorale :

Bien que les LT CD8 soient globalement reconnus comme les médiateurs les plus directs de l'immunité antitumorale étant donné leur fonction cytotoxique, les LT CD4 ont également un rôle à jouer. Ils ont d'ailleurs connu un regain d'intérêt à l'ère des immunothérapies. Néanmoins, la variété fonctionnelle des Thelpers résulte en des valeurs pronostiques variables selon la sous population et le cancer associé. Ainsi, alors que la présence de Th1 dans le microenvironnement est systématiquement de bon pronostic, le rôle des Th2 et des Th17 est nettement plus débattu. L'enrichissement en Treg est généralement associé à un mauvais pronostic. Enfin les Tfh, situés notamment dans les TLS, ainsi que les LT CD4 cytotoxiques, semblent être des acteurs anti-tumoraux importants.

*Fonctions de Teff dans l'immunité anti-tumorale (Figure 7) :*

- Help des Lymphocytes T Cytotoxiques (LTC) CD8 : le rôle critique des lymphocytes T CD4 dans le soutien de la fonction effectrice et de la différenciation des lymphocytes T CD8 a été décrit pour la première fois dans les années 1980-90<sup>163,164</sup>. Puis, au début des années 2000, un tournant majeur a eu lieu puisqu'il a été démontré que les LT CD4 étaient nécessaires pour maintenir et entretenir les réponses des LTC CD8 antitumorales grâce à des modèles murins de cancer et de transfert adoptif (B16<sup>165</sup> et lignée neuroendocrine<sup>20</sup>). Ainsi, les LT CD4 peuvent reconnaître certains néo antigènes tumoraux spécifiques et permettre un rejet de la tumeur plus efficace. Par exemple, en 2015, Linnemann *et al.* ont constaté que les mélanomes humains contiennent fréquemment des néoépitopes mutants reconnus par les T CD4<sup>166</sup>. De même Sahin *et al.*, puis Ott *et al.*, ont montré que les vaccins personnalisés à base de néo-antigènes destinés aux patients atteints de mélanome induisent principalement des réponses spécifiques contre la tumeur grâce aux LT CD4 plutôt que T CD8<sup>167,168</sup>. Une autre preuve de la fonction effectrice des LT CD4 dans la lutte contre le cancer provient des études sur la thérapie cellulaire adoptive (en particulier sur les CAR-T) ; où le rapport CD4/CD8 est égal à 1. De même, Cohen *et al* rapporte une meilleure réponse des CAR-T ciblant l'antigène de maturation des cellules B (BCMA) s'ils sont fabriqués avec un produit de leucaphérèse ayant un ratio plus élevé de CD4/CD8<sup>169</sup>.

Un des mécanismes importants par lesquels les LT CD4 "aident" à induire une réponse cytotoxique est l'augmentation des capacités de présentation d'antigènes et de costimulation des Cellules Dendritiques (DC). L'interaction entre le ligand CD40 (CD40L) exprimé par les T CD4 et le CD40 sur la DC permet la maturation fonctionnelle. Cette présentation croisée permet d'activer les LTC CD8 par les

DC<sup>164,170</sup>. Ces signaux induisent fortement des fonctions effectrices antitumorales chez les LTC CD8, telles que l'acquisition de cytotoxicité et la sécrétion de cytokines tumoricides. Ce contact va aussi améliorer le recrutement des T CD8 CCR5+ grâce à la sécrétion de CCL3/4 par les DC sur le site tumoral<sup>171</sup>. Les Th1 peuvent également promouvoir la différenciation des macrophages en type M1 qui sont antitumoraux<sup>172,173</sup>. De même, les Th1 vont interagir directement avec la microglie en favorisant son activation et la phagocytose des cellules tumorales dans un modèle murin de glioblastome traité par anti-CTLA-4. Les Th1 vont activer la microglie et augmenter la présentation antigénique via l'IFN $\gamma$ . De plus, l'IFN $\gamma$  promeut la phagocytose via la signalisation AXL/MER dans la microglie, permettant ainsi d'avoir une meilleure réponse antitumorale<sup>174</sup>.

Les LT CD4 activées sécrètent également diverses molécules qui aide à la réponse antitumorale :

- L'IL-2, elle active directement les LT CD8 en stimulant leur fonction effectrice, leur différenciation et leur prolifération.
- Les cytokines pro-inflammatoires qui peuvent soutenir les réponses immunitaires antitumorales par différents mécanismes. L'IFN $\gamma$  et le TNF $\alpha$  peuvent agir directement sur les cellules tumorales et provoquer leur sénescence<sup>24</sup>, ou indirectement en favorisant la différenciation des LTC effecteurs<sup>20</sup>. La production d'IFN $\gamma$  peut également induire la sécrétion locale de chimiokines et donc favoriser l'entrée des LTC sur le site effecteur. L'IFN $\gamma$  promeut aussi l'expression des complexes CMH-I et CMH-II sur les cellules tumorales<sup>149,175</sup>.
- Help des lymphocytes B à la production des anticorps : les Tfh sont particulièrement impliqués dans ce processus (cf Partie 1 Chapitre 2f).
- Enfin les T CD4 cytotoxiques peuvent avoir une action antitumorale par action cytotoxique directe (cf Partie 1 Chapitre 2eb). De récentes études utilisant le scRNA-seq sur des tumeurs humaines ont montré la présence de LT CD4 cytotoxiques dans divers cancers solides (le cancer du poumon à petites cellules<sup>176</sup>, le cancer colorectal<sup>177</sup>, le carcinome hépatocellulaire<sup>178</sup>, le cancer de la vessie<sup>179</sup>, l'ostéosarcome<sup>180</sup>, le mélanome<sup>181</sup>, etc). Oh *et al* ont mis en évidence la présence de T CD4 cytotoxiques chez des patients atteints de cancer de la vessie. Ils ont également montré que les LT CD4 issus de la tumeur et déplétés en Treg peuvent tuer les cellules tumorales autologues de façon dépendante du CMH II dans des expériences de cocultures<sup>179</sup>. De même, Cachot *et al* met

en évidence la présence de LTC CD4 dans les mélanomes. En effet, grâce à un peptide CMH II multimérique spécifique de la tumeur, ils ont pu isoler des T CD4 spécifiques issues du sang ou des tumeurs et ont montré qu'elles tuent directement les cellules tumorales qui expriment un CMH II. Ils montrent également que l'engagement de SLAMF7 peut déclencher une augmentation modeste mais significative et constante de la capacité lytique des clones T CD4 spécifiques de la tumeur, ce qui plaide en faveur de son potentiel thérapeutique<sup>181</sup>.

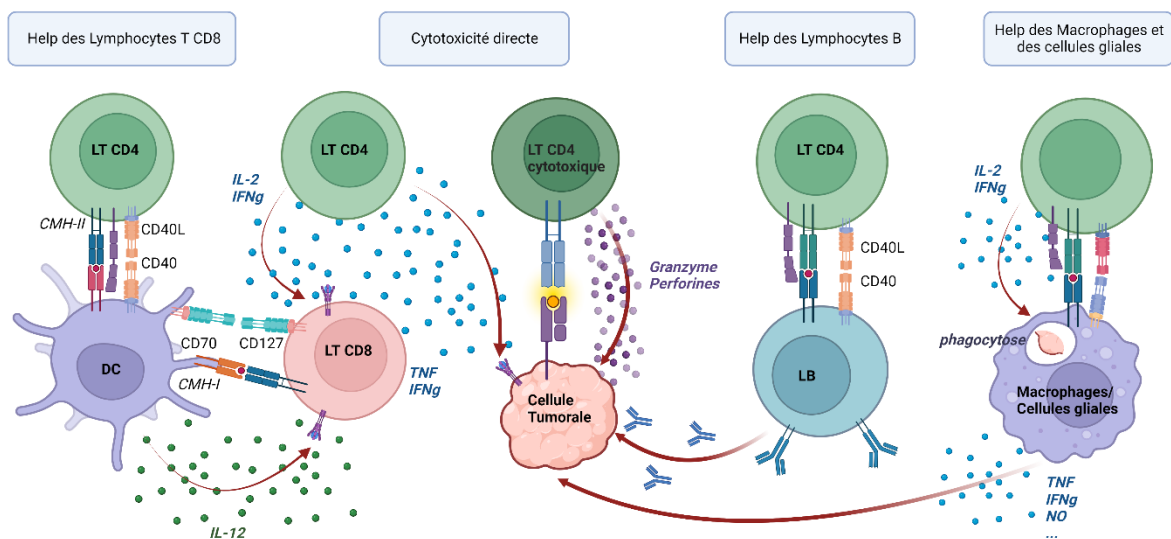


Figure 7 : Rôle des LT CD4 dans l'immunité antitumorale :

Les LT CD4 facilitent la maturation et l'activation des DC permettant ainsi d'activer indirectement les LT CD8. Les LT CD4 vont également produire des cytokines pour promouvoir les fonctions antitumorales des autres cellules immunitaires. Ils vont également exercer une fonction cytotoxique directe via la sécrétion de granzyme et perforine. Ils favorisent la maturation des LB, la commutation de classe des anticorps et la maturation de l'affinité. Une cytotoxicité indirecte peut également être exercée par les LT CD4 à travers l'interaction avec les macrophages M1 et cellules de la microglie.

### 1.5 Mécanismes moléculaires d'activation des LT

L'activation de la cellule, sa survie et sa différenciation dépendent de différents signaux conduisant à l'activation de multiples voies de signalisation. Les principales voies de signalisation, consécutives à l'engagement du TCR et CD28 sont résumées en Figure 8. Les cytokines, quant à elles, activent une autre série de voies, notamment les JAK/STAT. De façon intéressante, NF-κB peut être activé à la fois par le TCR, CD28, différents récepteurs de la superfamille du TNF (TNFRSF) et certaines cytokines (cf Partie 2). Il s'agit donc d'un acteur majeur de l'activation, survie, prolifération et polarisation des LT.



Le fonctionnement des lymphocytes est basé sur l'interconnexion entre ces différentes voies. Comprendre le rôle spécifique de chaque acteur permet non seulement une meilleure compréhension du fonctionnement cellulaire, mais également de développer une approche plus précise dans le ciblage thérapeutique.

Aussi, comprendre les rôles spécifiques de chaque sous-unité de NF- $\kappa$ B apparaît crucial et permettrait une modulation spécifique des fonctions protectives ou pathogéniques des LT dans la réponse antitumorale ou auto-immune respectivement.

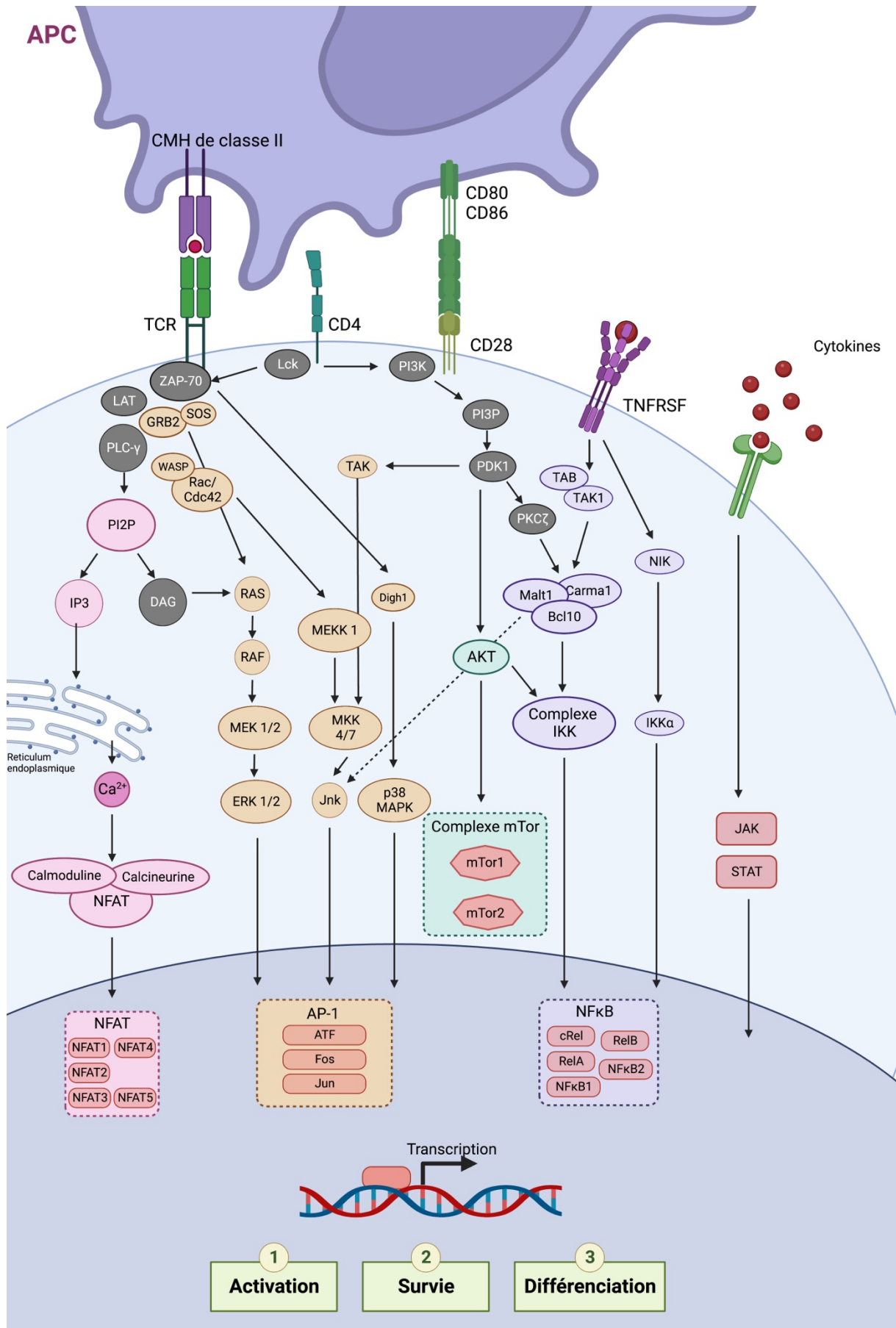


Figure 8 : Principales voies d'activation des LT CD4 :

*La voie de NFAT<sup>182</sup>: lorsque les complexes antigène/CMH se lient aux TCR, les PTK sont activées, entraînant la phosphorylation et l'activation de la phospholipase  $\text{C}\gamma 1$ . Les phospholipides membranaires sont alors hydrolysés, générant de l'inositol triphosphate (IP3) et du diacylglycérol (DAG). L'IP3 fonctionne alors comme un second messenger en se liant à son récepteur sur la membrane du réticulum endoplasmique entraînant la libération de  $\text{Ca}^{2+}$ . Il va se lier à la calmoduline, ce qui active la calcineurine. Les protéines de la famille de NFAT sont déphosphorylées par la calcineurine activée, entraînant leur translocation nucléaire et l'induction de la transcription génique médiée par NFAT. La famille NFAT comprend cinq membres : NFAT1, NFAT2, NFAT3, NFAT4 et NFAT5.*

*La voie des Mitogen-activated protein kinases (MAPK) kinase<sup>183</sup> : à la suite de l'engagement du TCR, RAS, une petite protéine G se lie au GTP à l'état activé et initie la cascade de signalisation intracellulaire. Les protéines RAS peuvent se lier et activer trois protéines kinases RAF (appartenant aux MAPK). Une fois activées, les protéines RAF phosphorylent et activent les kinases MEK1 et MEK2 (appartenant aux MAPKK). MEK1 et MEK2 vont à leur tour phosphoryler les protéines ERK1 et ERK2, (appartenant aux MAPK). L'activation séquentielle de Raf, MEK1/2 et ERK1/2 entraîne la transcription de c-Fos et JunB, qui conduisent à la formation du complexe de transcription AP-1. AP-1 est un facteur de transcription composé d'homodimères ou d'hétérodimères de Jun, Fos et du facteur de transcription activateur (ATF)<sup>184</sup> et comme vu précédemment, il est impliqué dans la différenciation Th17<sup>185,186</sup>. Les autres MAPK, tels que p38 et les protéines de la famille JNK, peuvent également moduler l'activité d'AP-1. p38 s'active à la suite de la signalisation proximale du TCR suite à la phosphorylation de p38 par ZAP-70. L'activation de p38 permet la translocation dans le noyau de cJun. L'activation de JNK est quant à elle probablement médiée par l'activation de PKC $\theta$  et du complexe CBM à la suite de l'activation du TCR et aboutit également à la modulation de l'activité d'AP-1.*

*La voie mTor : l'activation de mTOR est déclenchée par trois types de signaux : les signaux environnementaux, les signaux métaboliques et les signaux immunitaires (engagement sur TCR). C'est un signal classique d'activation de la voie PI3K- AKT, qui régule à son tour l'activité mTOR. En effet, PI3K active la protéine kinase-1 (PDK1). PDK1 active ensuite AKT au niveau de la membrane plasmique. Ensuite, l'activation de mTOR par AKT résulte d'au moins deux mécanismes :  $\alpha$  par phosphorylation directe de mTOR par AKT et par inactivation de TSC1/2, TSC1/2 exerçant sous sa forme phosphorylée une inhibition sur mTOR. Concernant l'activation à la suite d'un signal immunitaire, mTORC1 et mTORC2 sont tous deux activés. La voie Jak-STAT est activée par les cytokines et la voie NF- $\kappa$ B est détaillée dans la partie 2*

## **Partie 2 : La famille NF- $\kappa$ B**

Découvert à l'origine dans les lymphocytes B, le facteur de transcription NF- $\kappa$ B a été initialement identifié comme étant une protéine nucléaire permettant l'expression de la chaîne légère  $\kappa$  des immunoglobulines (d'où son nom « Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of

activated B cells» )<sup>187</sup>. Depuis, il est établi que NF- $\kappa$ B exerce des fonctions cruciales dans la majorité des types de cellules mammifères, avec diverses fonctions dans la croissance cellulaire, la survie, le développement, l'inflammation et l'immunité. La famille des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B comprend cinq sous-unités. Historiquement, elles ont été classées en fonction des voies auxquelles elles appartiennent : RelA, c-Rel et NF- $\kappa$ B1 appartiennent à la voie canonique, tandis que RelB et NF- $\kappa$ B2 sont classées dans la voie non-canonique ou alternative<sup>188</sup>. Dans chacune des voies, les sous-unités peuvent s'homo ou s'hétéro-dimériser pour former des dimères de NF- $\kappa$ B capables de réguler la transcription génique. A l'état basal, les sous-unités de NF- $\kappa$ B sont retenues dans le cytosol par les protéines Inhibiteur de KappaB (I $\kappa$ B), ainsi que par les formes non-processées de NF- $\kappa$ B1 (p105) et NF- $\kappa$ B2 (p100). Suite à l'engagement de divers récepteurs, une cascade de phosphorylations conduit à l'ubiquitination des inhibiteurs, permettant leur dégradation/clivage puis la libération des dimères de NF- $\kappa$ B, qui sont transloqués dans le noyau.

#### Acteurs de la voie de NF- $\kappa$ B :

Le complexe IKK (I- $\kappa$ B-Kinase) : il est formé d'IKK $\alpha$  (codé par *Chuk*), IKK $\beta$  (codé par *Ikkkb*) et IKK $\gamma$  (aussi appelé NEMO et codé par *Ikkkg*). Dans la voie canonique, ces 3 sous-unités forment un trimère où IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  sont des kinases, et IKK $\gamma$  est une protéine de structure. Dans la voie alternative, IKK $\alpha$  agit indépendamment des 2 autres sous-unités. L'activation du complexe IKK requiert la phosphorylation d'au moins une des deux sous-unités kinase<sup>189</sup>. IKK $\alpha$  et IKK $\beta$ , vont à leur tour phosphoryler les I $\kappa$ B et p100/p105. En plus de leur fonction régulatrice de la voie de NF- $\kappa$ B elles ont également d'autres rôles indépendants importants dans la régulation de divers processus cellulaires et voies de signalisation. IKK $\gamma$  par exemple peut interagir avec les MAPK, IRF3 et IRF7 afin d'induire leur activité transcriptionnelle<sup>188</sup>.

Les I $\kappa$ B : les protéines I $\kappa$ B retiennent les sous-unités de NF- $\kappa$ B dans le cytoplasme, régulant ainsi leur activité. Au sein du groupe on distingue les I $\kappa$ B dites classiques, I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  et I $\kappa$ B $\epsilon$ , et de celles dites atypiques, Bcl-3, I $\kappa$ B $\zeta$  et I $\kappa$ BNS. Ces protéines exercent l'inhibition de la translocation de NF- $\kappa$ B grâce à leurs domaines possédant des répétitions d'ankyrine. Ainsi, elles vont se lier au domaine d'homologie Rel (RHD) des sous-unités de NF- $\kappa$ B et masquer leurs domaines de localisation nucléaire<sup>188,190</sup> (figure 10). Les protéines I $\kappa$ B peuvent aussi servir de régulateurs de l'activité NF- $\kappa$ B directement dans le noyau

Les sous-unités p100/p105 (NF- $\kappa$ B2/NF- $\kappa$ B1) : Bien qu'elles fassent partie des sous-unités de NF- $\kappa$ B il est important de noter que p100 et p105 possèdent également une répétition d'ankyrine dans leur partie C-terminale, et agissent donc comme des inhibiteurs avant l'activation. Elles vont être phosphorylées en C-term entraînant une dégradation partielle par le protéasome, ce qui donne les formes actives p50 (pour NF $\kappa$ B1) et p52 (pour NF $\kappa$ B2) <sup>191,192</sup>.

## 2.1 Mécanismes d'activation de NF- $\kappa$ B dans les LT

### 2.1a Voies de signalisation canonique de NF- $\kappa$ B

Dans les LT, l'activation de la voie canonique est classiquement déclenchée par la reconnaissance de l'antigène et la costimulation par le CD28<sup>193</sup>. Elle commence par le recrutement de la protéine kinase C, isoforme Thêta (PKC $\theta$ ) suite à l'engagement du TCR, de CD28 (cf 1.5 Figure 8) ou de certains membres de sa famille tels que l'Inducible COStimulator (ICOS). Une fois recruté, PKC $\theta$  phosphoryle CARMA1 (Caspase recruitment domain-containing membrane-associated guanylate kinase protein-1) qui va pouvoir se lier à Bcl-10 (B-cell lymphoma) et MALT1 (Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1) pour former le complexe CBM<sup>194,195</sup>. Ce complexe recrute et active le complexe IKK, permettant ainsi la translocation nucléaire des sous-unités canoniques de NF- $\kappa$ B. Cette voie canonique peut également être activée par des cytokines ou des signaux de danger telles que l'IL-1 $\beta$ , l'IL-18, le LPS ou le TNF ainsi que d'autres agonistes des récepteurs de costimulation de la famille des TNFR (TNFR1, TNFR2, 4-1BB, OX-40...) <sup>188,196</sup>. Dans ce cas, l'activation du complexe IKK passe par la mobilisation d'autres protéines adaptatrices telles que celles de la famille TRAF et indépendamment du complexe CBM, ou par l'intermédiaire de l'axe PI3K/PDK1/CBM<sup>188</sup>.

Par exemple, dans le cas de l'engagement du récepteur à l'IL-1 et certains TLR comme le TLR4. L'adaptateur MyD88 et ses partenaires de la famille IRAK (IL-1R associated kinase) sont recrutés, permettant l'activation de TRAF6 et l'activation du complexe IKK. Certains TNFR recrutent d'autres TRAF (2,5), qui s'associent aux ubiquitin-ligases cIAP1 et cIAP2 et à la kinase RIP1 pour l'activation de NF- $\kappa$ B<sup>188,197</sup>. L'ensemble de la signalisation de la voie canonique de NF- $\kappa$ B est détaillée dans la Figure 9.

## 2.1b Voies de signalisation alternatives de NF- $\kappa$ B

La voie alternative de NF- $\kappa$ B est préférentiellement activée par certains membres de la familles des TNFSF, tels que la lymphotoxine  $\beta$ , CD40L, ou OX-40L<sup>188,198,199</sup>. A l'état basal, la kinase inductrice de NF- $\kappa$ B (NIK) est constamment dirigée vers la dégradation via une ubiquitination médiée par les protéines cIAP. L'engagement des TNFRSF entraîne le recrutement des protéines TRAF (TNF Receptor-Associated Factor) à la membrane, permettant l'ubiquitination des cIAP, la dégradation de TRAF3 et la stabilisation de NIK. NIK peut ainsi s'accumuler et phosphoryler IKK $\alpha$  ; conduisant ainsi à la phosphorylation et au clivage de p100, ce qui entraîne la libération des dimères RelB/p50 et RelB/p52<sup>196</sup>.

Il est important de noter que la distinction entre les voies canonique et alterne est remise en cause. En effet, l'association des sous-unités canoniques et alternatives a largement été décrite et souligne l'association des 2 voies<sup>200</sup>. De plus, les récepteurs de surface du TNFRSF sont généralement capables de déclencher les deux cascades de signalisation (canonique et alterne), ainsi que de recruter des intermédiaires de signalisation partagés entre les deux voies (cf NIK et IKK $\alpha$ ). D'ailleurs, dans les LT, aucun récepteur n'a été décrit pour activer uniquement la voie alternative (contrairement à BAFF dans les LB par exemple). L'engagement du TNFR2 après liaison du TNF $\alpha$ , induit l'accumulation nucléaire de RelB ; toutefois cette accumulation nucléaire de RelB n'est pas forcément synonyme d'activation car p100 et RelA peuvent inhiber la fixation de RelB à l'ADN<sup>201-204</sup>. En conséquence, il devient de plus en plus évident que la vision simplifiée de deux voies NF- $\kappa$ B séparées doit être révisée en faveur d'une dimérisation et d'une fonction spécifiques des sous-unités<sup>205</sup> (Figure 9).

Par exemple, l'équipe de Roiffman, en travaillant avec des patients porteurs de mutations de RelB, souligne la régulation interconnectée entre les deux voies de signalisation. Il suggère que les manifestations auto-inflammatoires observées chez ses patients proviennent d'une inhibition altérée de l'activité transcriptionnelle pro-inflammatoire de RelA en l'absence de RelB. En effet, il observe une augmentation de la translocation de RelA dans les fibroblastes de patients stimulés avec du TNF<sup>206,207</sup>. A l'inverse, la stimulation de la voie canonique, qui conduit à la formation du complexe CBM, pourrait réguler la voie alternative. Par exemple, la protéase MALT1 est capable de cliver RelB, entraînant sa dégradation par le protéasome<sup>208</sup>. Cette découverte renforce l'hypothèse d'une régulation croisée des voies canonique et alternative de NF- $\kappa$ B dans un modèle humain. Cependant, il n'a pas validé cette hypothèse avec des

expériences mécanistiques et bien qu'il s'intéresse à l'activation des LT les observations ont été faites dans des fibroblastes.

Il est cependant pertinent de chercher à comprendre le rôle de chaque sous-unité et l'éventuel effet de compétition entre elles. Ainsi, Zhao *et al* suggère que dans les lymphocytes B, c-Rel et RelA pourraient être en compétition entraînant la répression de certains gènes dépendants de RelA. En effet, la plupart des sites de liaisons c-Rel à 1 h coïncident avec ceux de RelA, créant une compétition pour la liaison sur ces sites. Au niveau transcriptionnel, les analyses de bulk et scRNA-seq ont révélé que la coexpression nucléaire de c-Rel et RelA était corrélée à une régulation négative de l'expression des gènes dépendant de RelA<sup>209</sup>. Ces travaux vont également dans le sens de ceux de Jesus *et al*, qui proposaient c-Rel comme répresseur de certains gènes liés à l'inflammation via le recrutement de HDAC1 dans les fibroblastes embryonnaires murins (MEF) activés par le TNF<sup>210</sup>. La manière dont chaque dimère est recruté, et la cinétique associée, constituent un autre facteur notable à étudier. Il révèle non seulement les spécificités fonctionnelles des sous-unités, mais aussi l'importance des interactions entre elles. Ainsi Sacconi *et al*, et Zao *et al*, montrent dans les DC et les LB, que les dimères de RelA sont recrutés précocement dans la cellule puis sont remplacés par ceux contenant RelB (pour les DC) ou c-Rel (pour les LB) afin de moduler la transcription génique<sup>209,211</sup>. Enfin, RelA et RelB pourraient être en compétition ou s'inhiber mutuellement. Par exemple, RelA semble séquestrer RelB et inhiber l'expression certains gènes ( par exemple Bcl-xL) dans les MEF traités par du TNF<sup>201</sup>, alors que la surexpression de RelB altère la liaison de RelA à l'ADN<sup>212</sup>.

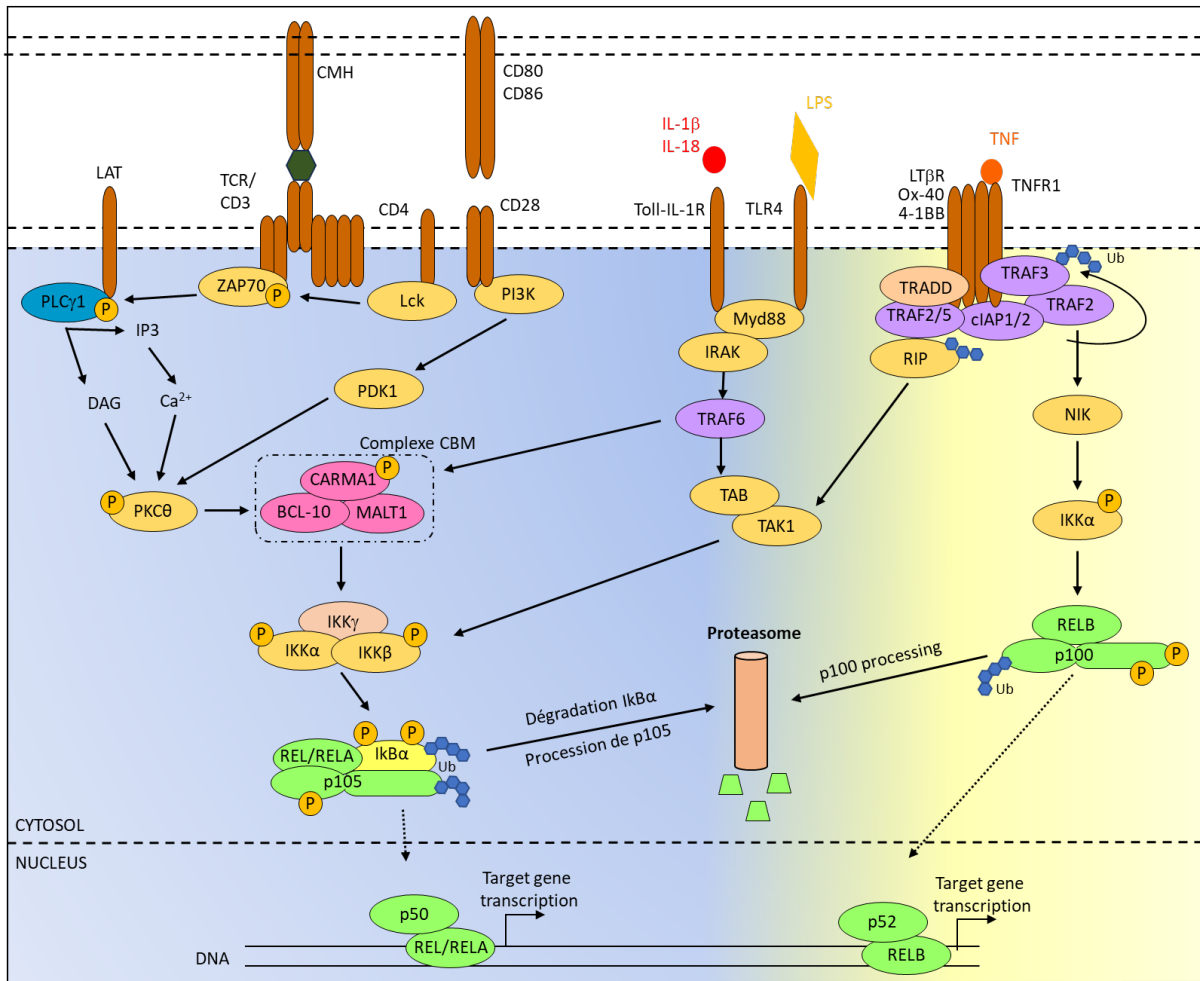


Figure 9 : Voie de signalisation de NF- $\kappa$ B dans les LT :

Cette figure décrit les voies les plus courantes impliquées dans l'activation de NF- $\kappa$ B dans les LT. Il convient de noter qu'un certain nombre d'études ont mis en évidence la formation d'hétérodimères combinant des sous-unités des voies canonique et alternative ; ces hétérodimères ne sont pas représentés ici, car les mécanismes conduisant à leur formation ne sont pas clairs. Figure modifiée à partir de Voisin et al<sup>205</sup>

## 2.2 Présentation des sous-unités de NF $\kappa$ B

### 2.2a Structures des différentes sous-unités

Toutes les sous-unités ont en commun un REL Homology Domain (RHD) dans leur partie N-terminale qui permet leur homo ou hétérodimérisation ainsi que leur liaison à l'ADN. RelA, RelB et c-Rel ont également un domaine d'activation de la transcription (TAD) en partie C-terminal qui leur permet d'initier l'expression de leurs gènes cibles en recrutant la machinerie transcriptionnelle<sup>213</sup> (Figure 10).



Les dimères de NF- $\kappa$ B peuvent se fixer sur une séquence  $\kappa$ B consensus et induire ou inhiber la transcription de gènes. Le premier dimère observé est p50/RelA mais toutes les dimérisations de NF- $\kappa$ B sont en fait possibles, bien que les plus fréquemment observées soient RelA ou c-Rel avec p50 et NF- $\kappa$ B2 avec RelB<sup>188,211</sup>. Enfin, certaines combinaisons de dimères peuvent agir comme des complexes inactifs ou répresseurs, comme l'homodimère p50 et l'homodimère p52<sup>214-217</sup>. Les dimères peuvent également s'autoréguler en induisant la transcription des gènes codant pour les protéines I $\kappa$ B ou d'autres membres de la voie situés en amont<sup>188,190</sup>. Enfin, l'activité transcriptionnelle des sous-unités de NF- $\kappa$ B nécessite des modifications post-transcriptionnelles. Notamment, la phosphorylation des résidus de sérine permettent l'interaction de NF- $\kappa$ B avec des cofacteurs de transcription<sup>192,218-220</sup>.

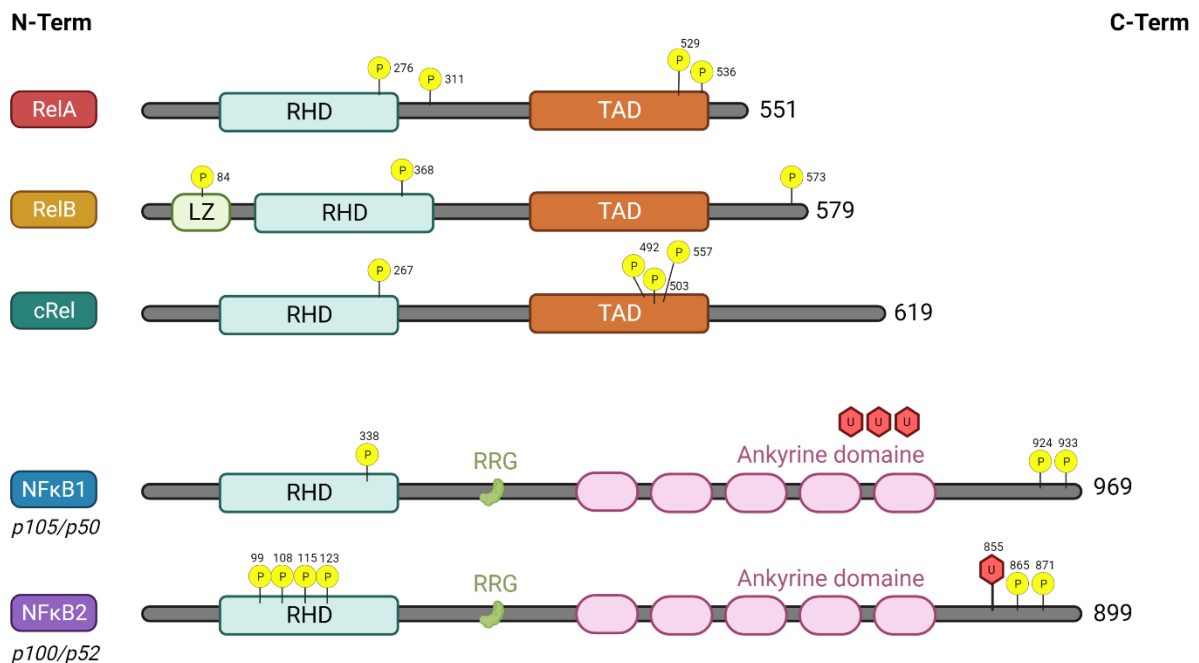


Figure 10 : Structure des sous-unités de la famille de NF- $\kappa$ B :

Représentation schématique des 5 sous unités de NF- $\kappa$ B. Le nombre d'acides aminés de chaque protéine est indiqué à droite. Les sites de phosphorylation et d'ubiquitination sur les sous-unités sont indiqués. (RHD) domaine d'homologie Rel ; (TAD) domaine de transactivation ; (RRG) région riche en glycine. Inspiré de Hayden et al.

Actuellement, l'étude de la fonction spécifique de chaque sous-unité de NF- $\kappa$ B fait l'objet de nombreuses recherches mais reste complexe, en partie à cause du nombre limité d'outils biochimiques à notre disposition, bien que des avancées soient en cours dans ce domaine. Malgré ces défis, des progrès ont été réalisés au cours des dernières années grâce à l'utilisation de modèles de souris knockout (KO) et à l'étude de patients présentant des mutations du NF-

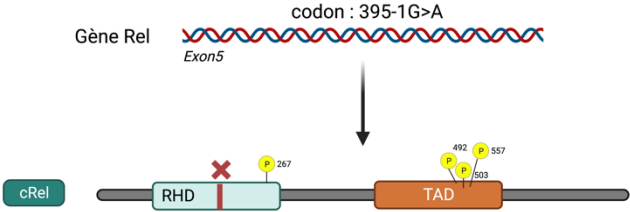
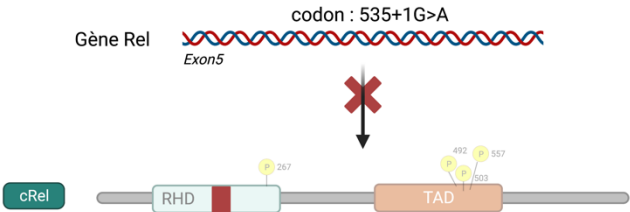
$\kappa$ B. Grâce à ces avancées, notre compréhension des rôles joués par les sous-unités de NF- $\kappa$ B dans les LT s'est considérablement améliorée. Dans cette partie, nous allons passer en revue tous les modèles d'étude disponibles avant d'aborder, les connaissances actuelles sur le rôle des sous-unités canoniques de NF- $\kappa$ B dans la fonction des LT puis dans la réponse anti-cancéreuse et auto-immune.

## **Partie 3 : Fonctions de NF- $\kappa$ B dans les LT CD4**

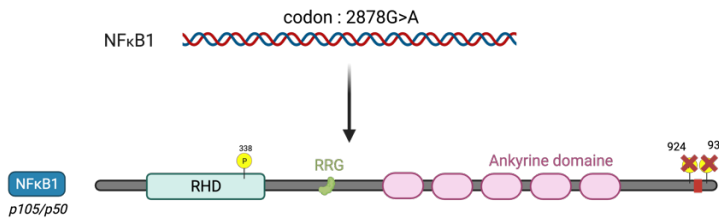
### *Apport de l'étude des humains et souris porteurs de mutations sous-unités de NF- $\kappa$ B*

Comme abordé précédemment, une littérature abondante des trente dernières années décrit les rôles pléiotropiques de NF- $\kappa$ B dans l'inflammation et l'immunité. Une bonne partie des connaissances sur les fonctions spécifiques des sous-unités provient de l'étude de souris et patients mutés pour ces gènes. Alors que des souris porteuses d'ablations germinales pour chacune des sous-unités sont disponibles depuis les années 90, le « catalogue » complet de telles altérations chez l'homme n'a que très récemment été complété. Globalement, l'altération ou la perte d'expression des sous-unités conduit à des immunodéficiences plus ou moins sévères, parfois associées à une auto-immunité ou inflammation variant selon la sous-unité touchée.

Les phénotypes cliniques sont très différents selon les sous-unités mutées, soulignant la fonction spécifique de chacune. De plus, les phénotypes spontanés diffèrent parfois entre homme et souris. L'ensemble des mutations germinales et phénotypes associés sont présentés dans les tableaux 1 et 2.

Sous-unité de NFκB	Description de la Mutation	Phénotype clinique patients	Profil des lymphocytes T	Référence article
<p><b>c-Rel</b></p>	<p><b>Levy et al :</b> 1 patient avec une mutations germinale homozygotes, perte de fonction. Mutation observée :</p>  <p><b>Massaad et al :</b> 1 patient avec une mutation homozygote germinale, perte d'expression de c-Rel Mutation observée :</p>  <p><b>Starczynowski et al :</b> 1 patient avec mutation germinale heterozygote 1 patient avec mutation somatique, de perte de fonction.</p>	<p><b>Levy et al et Massaad et al :</b> Déficit Immunitaire Combiné avec infections opportunistes à répétitions (candidoses, Mycobacterium tuberculosis, Salmonellose enterique et infections fongiques à Cryptosporidium) et infections post-vaccination (BCG-osis)</p> <p><b>Starczynowski et al:</b> Lymphome B</p>	<p><b>Levy et al et Massaad et al :</b> Baisse des LT CD4 mémoires. Baisse des Th1 et Th1* ; Th2 et Th17 circulants. Baisse de la prolifération des LT Les CD4 naïfs polarisés expriment Tbet et RORγt en conditions de polarisation Th1 et Th17 ; ils sécrètent moins d'IFNγ (Th1), d'L17a et d'L17f (Th17), d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 (Th2).</p>	<p>221-223</p>

<b>RelA</b>	<p><b>Pas mutation homozygote à ce jour !</b> 6 reports de cas de mutation hétérozygotes avec un total de 35 patients :</p> <p><b>Badran, et al :</b> 4 patients avec une mutation non-sens hétérozygote (c.559+1G&gt;A) Réduction de 50% de l'ARNm et de la protéine</p> <p><b>Comrie, et al :</b> 1 patient avec une mutation non-sens hétérozygote de novo (c.736C&gt;T, p.Arg246*) Réduction de l'ARNm et de la protéine</p> <p><b>Barnabei, et al :</b> 3 patients, mutation hétérozygote. 2 patients (c.256C&gt;A) Formation d'une protéine modifiée dans le RHD 1 patient mutation non-sens (c.985 C&gt;T) Formation d'une protéine tronquée</p> <p><b>Adeeb, et al :</b> 5patients, mutation hétérozygote (c.1459delC) Production à 50% d'une protéine tronquée dans le TAD</p> <p><b>An, et al :</b> 16 patients avec une mutation hétérozygote 5patients (c.1153C&gt;T) 5 patients (c.1311_1312insA) 3 patients (c.985C&gt;T) 3 patients (c.736C&gt;T)</p> <p><b>Moriya, et al :</b> 6 patients avec mutation hétérozygote Formation d'une protéine tronquée non fonctionnelle 2 patients (c.1165C&gt;T)</p>	<p><b>Badran, et al :</b> Ulcérations mucocutanées dépendantes du TNF avec maladie intestinale inflammatoire, traitables avec un anti-TNF</p> <p><b>Comrie, et al :</b> Syndrome auto-immun lymphoprolifératif avec cytopénie auto-immune (anémie et thrombopénie)</p> <p><b>Barnabei, et al :</b> Ulcérations mucocutanées Lupus systémique érythémateux Polyarthralgie Vascularite</p> <p><b>Adeeb, et al :</b> Maladie de Behcet (Ulcérations mucocutanées, +/- nevrite optique)</p> <p><b>An, et al :</b> Ulcérations mucocutanées +/- syndrome auto-immun inflammatoire</p> <p><b>Moriya, et al :</b> Ulcérations mucocutanées +/- syndrome auto-immun inflammatoire</p>	<p><b>Badran, et al :</b> Les PBMC des patients font moins d'IL-6 après stimulation</p> <p><b>Comrie, et al :</b> Augmentation des LT (CD4 plus prononcé) mais baisse des T CD4 naïfs au profit des effecteurs. Profil Th1 accru avec sécrétion d'FN<math>\gamma</math> augmenté (mais baisse IL-2) CD4 blastique sous PMA-ionomycin Prolifération augmentée des blastes CD4+ (stimulation CD3/28)</p> <p><b>Barnabei, et al :</b> Augmentation de la translocation de RelA dans les LT blastiques Dans PBMC augmentation de la signature IFN</p> <p><b>Adeeb, et al</b> Non décrit</p> <p><b>An, et al :</b> Non décrit</p> <p><b>Moriya, et al :</b> PBMC signature IFN augmentée Réponse des LT blastiques à l'IFN (<math>\alpha</math>2 et</p>	<p>224</p> <p>225</p> <p>226</p> <p>227</p> <p>228</p> <p>229</p> <p>19/11/20</p> <p>23</p> <p>19:52:00</p>
-------------	--	---	--	---

	<p>1 patient (c.985C&gt;T)  1 patient (c.1416dup)  1 patient (c.1034-1G&gt;A)  1 patient (c.1047T&gt;A)</p>		<p>γ) normale</p>	
<b>NF-κB1</b>	<p><b>Mandola, et al</b> : 1 patient avec une mutation homozygote (c.2878G&gt;A)  Formation d'une protéine mutée rendant la phosphorylation en Cterm plus difficile =&gt; baisse p50</p>  <p><b>Patients hétérozygotes</b> : une centaine de cas décrits avec haploinsuffisance dans la majorité des cas  Mutations affectant p50 et p105 ou seulement p105</p>	<p><b>Mutation homozygote</b> :  Déficit immunitaire sévère combiné avec infections opportunistes  Dermatite</p> <p><b>Mutations hétérozygotes</b> :  ≈ 30% asymptomatiques  Déficit Immunitaire Commun Variable avec comorbidités (neurologiques, cancéreuses, Lymphadénopathies, Splénomégalie, Infections, Gastro Intestinales, Infections des voies respiratoires, Infections cutanées, Syndrome auto- immun, hépatite)</p>	<p><b>Mutation homozygote</b> :  Baisse graduelle des LT CD4 mémoires  Augmentation des LT CD8  Baisse de la production d'IFNγ et d'IL-2 pas les LT CD4</p> <p><b>Mutations hétérozygotes</b> :  Num CD4 normale (+/- légère baisse des CD4 mémoire)  Baisse du profil Th17 et Tfh et augmentation du profil Th1.  Num LT CD8 normale (+/- légère baisse des CD8 naïfs)</p>	230-238
<b>RelB</b>	<p><b>Sharfe, et al</b> : 3 patients avec une mutation non-sens homozygote (parents hétérozygotes) (c.1191C&gt;A)  Absence de protéine RelB</p> <p>3 patients avec une mutation homozygote (c.1091T)  Déficiência partielle de RelB</p>	<p><b>Perte totale de protéine</b> :  Déficit Immunitaire Combiné avec infections récurrentes  Dermatite auto-immune  Arthrite Rhumatoïde</p> <p><b>Perte partielle de protéine</b> :  Phénomènes auto-inflammatoire et</p>	<p><b>Perte totale de protéine</b> :  Nombre normal de LT  Nombre élevé de CD4+ mémoire (CD45RO+) et faible de CD4 naïfs (CD45RA+).  Les LT répondent mal à la PHA (faible production d'IFNγ et IL-2) mais normalement au CD3/CD28.</p>	206,207,239

		immunodéficience avec infections opportunistes	L'ajout d'IL-2 restaure la production d'IFN $\gamma$ (mais pas celle d'un CD40L ou d'IL-12)  <b>Perte partielle de protéine :</b> Nombre normal de LT Nombre élevé de CD4+ mémoire (CD45RO+) et faible de CD4 naïfs (CD45RA+). Réponse TLR et LPS normal	
<b>NF-<math>\kappa</math>B2</b>	<b>Mutations hétérozygotes.</b> Principalement protéine p100 non clivables haploinsuffisance de p52 mais aussi quelques formes tronquées p52- like.	Immunodéficiences primaires chez 92% des patients avec hypogammaglobunémie, et endocrinopathies	Baisse des Treg et Tfh (+/- des Th17)	240-243

*Tableau 1 : Mutations germinales de NF- $\kappa$ B chez l'homme*

Sous-unité	Phénotype Clinique	Profil des lymphocytes T	Réf
<b>c-Rel</b>	Non létal Développement normal <b>Dans les MAI :</b> Résistantes à l'EAE Résistantes au CIA Résistante au Psoriasis induit par la bleomycin	Défaut priming des LT par les DC Défaut dans les réponses des LT CD4 et CD8. Défaut de fonctionnalité des Th1 (baisse de la production IL-2 et GM-CSF et IFN $\gamma$ ).	244-252
<b>RelA</b>	Létal in utero (Dépendante du TNF $\alpha$ )	Chimère à partir de précurseurs fœtaux : Réduction du nombre de LT (baisse de la prolifération des LT CD4)	253-259
<b>NF-<math>\kappa</math>B1</b>	Non létal <b>Dans les MAI :</b> Résistantes à l'EAE Résistantes au CIA, Aggravation du Psoriasis induit par la bleomycin	Réponse Th2 altérée Réponse Th1 ? Atteintes des LB (nombre et fonction) Atteinte des Macrophages	260-265
<b>RelB</b>	Létal 6 semaines après la naissance (auto-immunité systémique)	Réduction de la prolifération et de la survie des thymocytes simples positifs. Défaut fonction et différenciation Th1.	204,266-271
<b>NF-<math>\kappa</math>B2</b>	Non létal	LT normaux (prolifération et expression de cytokines)	272-274
<b>c-Rel et RelA</b>	Létal embryonnaire (Chimères hématoïétiques avec cellules souches issues du foie fœtal)	LT blocage du cycle cellulaire au début de G1	275-277

Tableau 2 : Mutations germinales de NF- $\kappa$ B chez la souris

Du fait de ces différents phénotypes, on notera que l'étude des rôles intrinsèques de NF- $\kappa$ B dans chaque type de cellules immunitaires est compliquée. Cette complexité est particulièrement prononcée pour RelA, en raison de l'absence de modèle approprié à disposition. Dans ce contexte, l'émergence des souris KO conditionnelles représente une avancée significative ; mes travaux de thèse s'appuient d'ailleurs essentiellement sur ces

approches. Ma thèse se concentrera spécifiquement sur le rôle de NF- $\kappa$ B dans les LT CD4, ce qui sera abordé dans les sections suivantes.

### 3.1 Rôle des sous-unités de NF $\kappa$ B dans la régulation des T effecteurs

#### 3.1a Rôle des sous-unités de la voie canonique

##### Prolifération :

Les LT déficients en NF- $\kappa$ B1, RelA et c-Rel montrent un défaut de prolifération (Tableau 1 et Tableau 2). Ce défaut de prolifération repose sur différents mécanismes intrinsèques et extrinsèques, dont le cycle cellulaire, la survie et la production de cytokines. Concernant la survie, la voie canonique de NF- $\kappa$ B est cruciale pour l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-x<sub>L</sub> et la régulation négative de l'expression de p73<sup>278-280</sup>. Le défaut de prolifération peut donc être lié à un problème d'apoptose et de mort cellulaire. Néanmoins, l'expression ectopique de Bcl-2 dans les LT c-Rel/RelA double KO (DKO) ne parvient pas à sauver le défaut de croissance des LT<sup>277</sup>. De même, Zheng *et al*, montrent que l'expression ectopique de Bcl-2 dans les LT c-Rel/p50 DKO améliore leur survie mais n'est pas suffisante pour retrouver un phénotype normal<sup>280</sup>.

NF- $\kappa$ B1, RelA et c-Rel sont également nécessaires pour la surexpression de c-Myc suite à une stimulation TCR/CD28 et pour l'augmentation initiale de la taille cellulaire qui s'ensuit<sup>277,278,280</sup>. Ainsi, l'expression ectopique de Myc dans les LT DKO restaure un phénotype normal<sup>277</sup>.

Enfin, c-Rel et NF- $\kappa$ B1(et peut-être RelA) apparaissent nécessaires pour la production d'IL-2 qui est essentielle à la prolifération des LT *in vitro*. Ainsi, le défaut de prolifération des LT c-Rel KO peut être abrogé en ajoutant de l'IL-2 exogène à la culture<sup>222,225,277</sup>. L'IL-2 ne permet cependant pas un sauvetage complet du phénotype dans les LT DKO p50/c-Rel ou lors du blocage de la voie canonique par I $\kappa$ B<sup>278,278</sup>. L'ensemble de ces résultats souligne le rôle crucial de c-Rel et RelA dans la prolifération des LT. Il convient toutefois de nuancer cette conclusion, car les modèles utilisés sont artificiels (chimère de foie fœtal), et dans l'étude de Grossman *et al*, de 2000 aucun défaut de prolifération ni de rôle de c-Rel et/ou RelA dans l'apoptose n'a été observé (culture sans IL-2)<sup>276</sup>.

Outre son rôle dans la survie et la prolifération des LT, l'activation de la voie canonique de NF- $\kappa$ B joue un rôle dans la régulation de l'expression de diverses cytokines et dans la différenciation des différents types de Thelper (Figure 11):



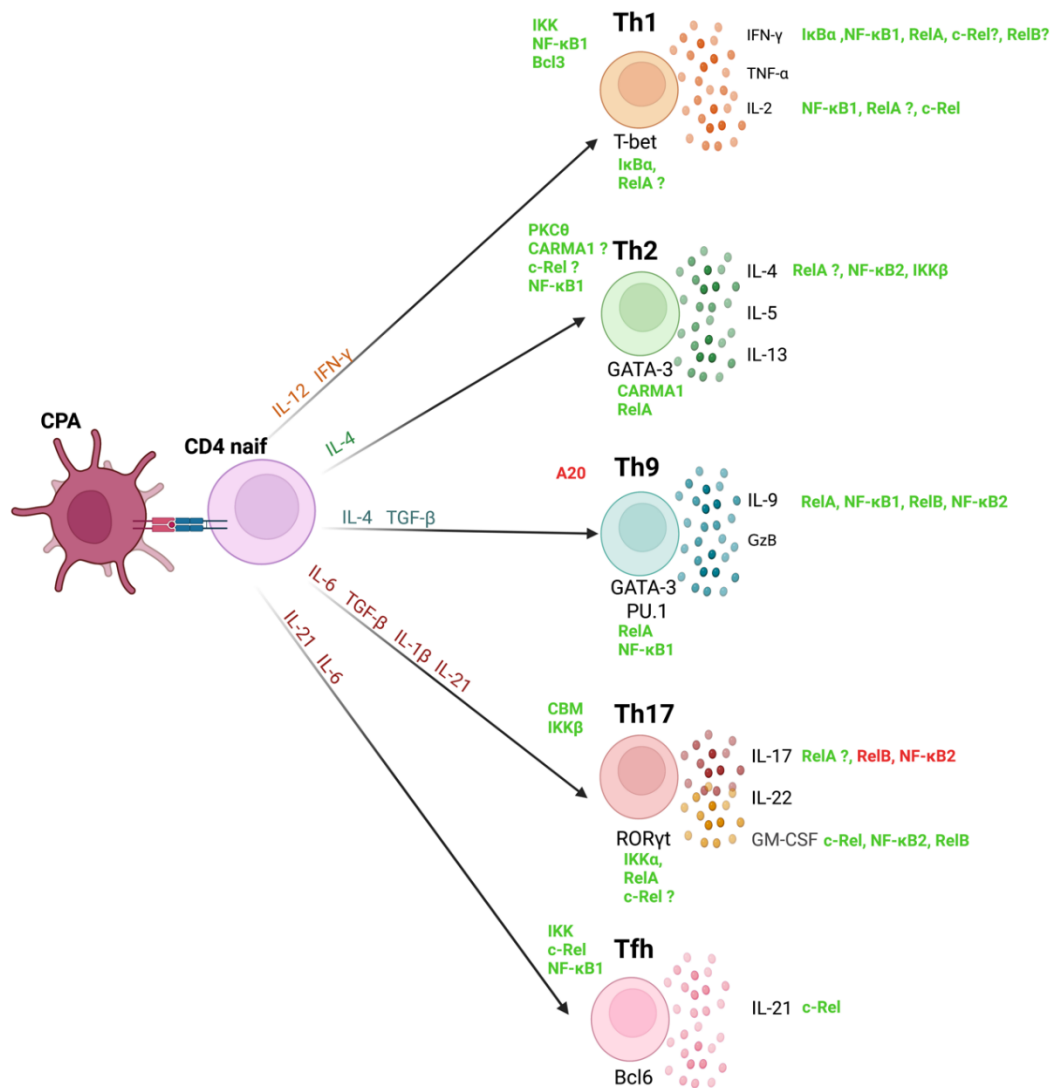


Figure 11 : Fonction de NF-κB dans la polarisation des Th :

Cette figure illustre les rôles connus des membres de la voie NF-κB. Les annotations vertes indiquent les régulateurs positifs, tandis que les protéines rouges sont des inhibiteurs. Les noms des protéines sont placés à côté du sous-ensemble TH lorsque le rôle de NF-κB a été attribué à l'ensemble de la lignée, sans distinction entre le facteur de transcription principal et les cytokines effectrices. Les points d'interrogation indiquent des preuves indirectes ou des rôles controversés pour les protéines.

### Les Th1 :

Le rôle de la voie canonique de NF-κB dans la réponse Th1 a été approché en premier par Aronica *et al*, dès 1999. En réponse à un challenge avec l'antigène OVA, des souris exprimant une forme trans-dominante d'IκBα dans les LT (IκBα(ΔN)), inhibant l'activation de la voie canonique de NF-κB, présentent un défaut de production d'IFNγ<sup>281</sup>. Ce déficit en Th1 (baisse d'IFNγ et de T-bet) a ensuite été confirmé *in vitro* dans le même modèle transgénique et après ajout PDTC (un inhibiteur d'IKK)<sup>282</sup>. De même chez l'homme, le traitement de LT avec du SN50 (inhibiteur de la translocation de p50 par fixation aux domaine NLS) ou un peptide ODN

(bloquant la fixation des SU sur la séquence consensus de NF- $\kappa$ B) peut également affecter l'expression de l'IFN $\gamma$  et T-bet lors de la polarisation Th1<sup>283</sup>.

Il est intéressant de noter que certaines études suggèrent que le complexe PKC $\theta$ /CBM de la voie canonique de NF- $\kappa$ B est superflu pour la génération de Th1. Lors d'une infection par *L. major in vivo*, les souris dépourvues de PKC $\theta$  développent des réponses immunitaires Th1 protectrices et sont résistantes à l'infection de façon similaire que les souris contrôles<sup>284</sup>. De même, lors de la polarisation de LT naïfs déficients en CARMA1 en Th1, l'expression de l'IFN $\gamma$  demeure normale<sup>285</sup> et enfin l'expression de T-bet n'est pas non plus altérée dans les LT naïfs déficients en MALT1 soumis à une polarisation Th1<sup>286</sup>.

Dans une étude utilisant un modèle de délétion conditionnel de RelA (souris CD4<sup>cre</sup> RelA<sup>F/F</sup>), Balasubramani *et al.* ont montré que les LT CD4 naïfs déficients en RelA produisent moins d'IFN $\gamma$  dans des conditions de polarisation Th1 *in vitro*. Mécaniquement, RelA se lie à différentes séquences non codantes conservées (CNS) du locus *Ifng*, initialement rendues accessibles par T-bet et STAT4 permettant ainsi une induction optimale de la transcription du gène codant pour l'IFN $\gamma$  dans les Th1<sup>287,288</sup>.

Le rôle de c-Rel dans la différenciation Th1 reste débattu, les études étant contradictoires. Une première en 2002 a montré que les CD4 isolés de souris c-Rel<sup>-/-</sup> sont incapables de produire de l'IFN $\gamma$  et de l'IL-2 dans des conditions Th1 *in vitro*<sup>247</sup> alors que d'autres ont montré l'inverse<sup>270,289,290</sup>.

Les LT déficients en NF- $\kappa$ B1 présentent une capacité de différenciation Th1 normale<sup>263,265</sup>. L'ensemble de ces résultats suggèrent que RelA joue un rôle unique, non redondant et crucial dans l'expression de l'IFN $\gamma$  lors de la polarisation en Th1, tandis que les autres sous-unités canoniques de NF- $\kappa$ B semblent être soit dispensables, soit avoir des rôles redondants.

Enfin, les travaux de Tang *et al.*, suggèrent que la voie canonique de NF- $\kappa$ B pourrait être impliquée dans la transdifférenciation des Th1 en Th17. Bcl-3 en se liant à p50 et c-Rel au locus RORc, bloquerait la transdifférenciation des Th1 en Th17<sup>291</sup>.

### Les Th2 :

Historiquement, la voie canonique de NF- $\kappa$ B *via* l'axe PKC $\theta$ /CBM est particulièrement importante pour les réponses Th2 *in vivo*. Ainsi, les souris PKC $\theta$ <sup>-/-</sup> sont complètement protégées contre l'« asthme allergique » induit par inhalation d'OVA et à l'inverse sont plus sensibles aux infections à helminthes<sup>284</sup>. CARMA1 semble particulièrement important pour la fonction Th2, car les souris déficientes en CARMA1 ne développent pas d'inflammation dans le modèle murin d'asthme. Elles ont une diminution de l'expression de l'IL-4, IL-5 et l'IL-13 dans leurs poumons. Cette protection est intrinsèque au LT car le transfert de Th2 WT spécifiques de l'OVA dans des souris CARMA1<sup>-/-</sup>, restaure un phénotype normal avec une

inflammation<sup>292</sup>. De même, l'inflammation pulmonaire spontanée à médiation Th2, observée chez les souris ayant reçu des cellules de moelle osseuse qui exprime une forme constitutive active de CARMA1, renforce cette hypothèse<sup>293</sup>. De façon intéressante, les souris portant une délétion conditionnelle de CARMA1 dans les LT activées (OX40<sub>cre</sub>CARMA1<sup>F/F</sup>) ont une réponse allergique normale et la production d'IL-4 est maintenue. Cela suggère un rôle de l'axe CBM/NF-κB pendant les étapes initiales de l'activation, mais pas pendant les phases ultérieures<sup>294</sup>.

De même, une étude de Gregorczyk *et al*, montre que l'utilisation d'un inhibiteur chimique d'IKK (BMS-345541) et de la translocation nucléaire de NF-κB (DHMEQ) entraîne une baisse de la pathogénicité de l'« asthme induit » *via* une diminution du nombre de Th2, soulignant une nouvelle fois l'importance de la voie canonique dans la fonction Th2<sup>295</sup>. Néanmoins et de façon étonnante, l'inhibition complète de la voie canonique dans les souris IκBα-(ΔN)-Tg ne diminue que très peu l'inflammation pulmonaire induite par l'OVA et pas la production d'IL-4 pulmonaire<sup>281</sup>.

*In vitro*, les LT CD4 CARMA1<sup>-/-</sup> (stimulés par l'anti-CD3/CD28 et l'IL-2) sécrètent moins d'IL-4 et d'IL-5 et présentent une expression altérée de GATA3<sup>293</sup> même si de façon étonnante dans des conditions de polarisation Th2, les LT CD4 CARMA1<sup>-/-</sup> naïfs produisent une quantité normale d'IL-4<sup>285</sup>. Enfin, les LT déficients pour IKKβ (CD4<sub>cre</sub>IKK2<sup>FL</sup>) présentent une diminution d'expression de l'IL-4 (mais pas d'IL-5 ou d'IL-13)<sup>296</sup>.

Concernant le rôle spécifique des sous-unités canoniques, dans le modèle « d'asthme induit » l'inflammation pulmonaire est réduite chez les souris c-Rel<sup>-/-</sup>, mais l'étude ne précise pas si cette protection est médiée par les LT<sup>297</sup>. Chez l'homme, la délétion germinale de c-Rel entraîne une baisse du nombre de Th2 circulant et une baisse de la sécrétion des cytokines Th2 lors de la polarisation suggérant un rôle intrinsèque important de c-Rel dans la différenciation Th2<sup>221</sup>. En raison du manque de modèles de souris adéquats, le rôle de RelA n'a pas encore été évalué *in vivo*. Cependant une élégante étude de Henriksson *et al*, en utilisant une approche « clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats » CRISPR-screen » (criblage génomique par CRISPR/cas9 à partir d'une bibliothèque d'ARN guide qui ciblent la majorité des gènes du génome), a étudié sur des cultures de Th2 murines les gènes importants dans la différenciation et ou l'activation des Th2. Pour ce faire, ils ont utilisé des lymphocytes issus de souris avec des rapporteurs fluorescents associés aux protéines IL-4, IL-13, GATA3, IRF4 et Xbp1 et ont regardé l'effet de la perte de chaque gène codant sur la fluorescence des cellules. L'étude a permis de mettre en évidence les rôles de RelA comme régulateur positif de l'expression de GATA3<sup>298</sup>. Étonnamment, RelA ne semble pas réguler l'IL-4 alors qu'il a été montré qu'il pouvait se lier au promoteur Il4 dans les LT humaines et que la surexpression de RelA, mais pas de c-Rel, induit la sécrétion d'IL-4 *in vitro*<sup>299</sup>.

Enfin, les souris déficientes en NF- $\kappa$ B1 sont totalement résistantes à l'inflammation allergique des voies respiratoires et ont moins de cytokines Th2 dans les poumons. Les LT isolées de ces animaux présentent une expression diminuée de GATA-3 et une production réduite d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13<sup>263</sup>.

Dans l'ensemble, ces études suggèrent un rôle important de la voie canonique de NF- $\kappa$ B dans Th2 mais le rôle exact de chaque sous-unité dans la réponse Th2 et la différenciation doit encore être investigué.

### Les Th9 :

Le suivi de la translocation des sous-unités de NF- $\kappa$ B lors d'une expérience de polarisation en Th9 a révélé une translocation importante de toutes les sous-unités et de façon plus prononcée que dans les Th1 et Th17. Cette observation permet de poser l'hypothèse d'un rôle crucial de NF- $\kappa$ B dans le processus de polarisation Th9. NF- $\kappa$ B semble signaler dans les Th9 *via* TRAF6 (les LT déficients en TRAF6 n'ont plus d'hyperactivation de NF- $\kappa$ B)<sup>35</sup>.

Ainsi, il a été montré qu'*in vitro* les sous-unités NF- $\kappa$ B1 et RelA peuvent agir au niveau du promoteur de l'IL-9 et promouvoir l'expression de l'IL-9<sup>300-302</sup>. A l'inverse, l'inhibition de RelA dans des Th9 par un siRNA ou une délétion conditionnelle (CD4<sub>cre</sub>RelA<sup>FLOX/FLOX</sup>) entraîne une baisse de production ou d'expression de l'IL-9<sup>301,303</sup>.

En outre, les sous-unités canoniques NF- $\kappa$ B (notamment le dimère p50/RelA), semblent jouer un rôle direct dans l'expression de PU.1, comme cela a été démontré dans les cellules humaines de leucémie myéloïde aiguë<sup>304</sup>. De même, chez les patients avec une mutation de TNFAIP3 (entraînant une haploinsuffisance d'A20, un inhibiteur de la voie de NF- $\kappa$ B), une augmentation spontanée des Th9 circulantes a été observée, soulignant là encore l'importance de la voie canonique<sup>305</sup>.

Chez la souris, il a été montré que la sécrétion d'IL-9 dans les LT CD4 induit par l'IL-36 $\gamma$  est dépendant de p50 et Myd88, mettant en évidence une fois de plus l'importance de NF- $\kappa$ B dans la fonction des Th9<sup>306</sup>. Enfin, *in vivo*, dans une expérience d'« asthme induit » NF- $\kappa$ B serait impliqué dans la différenciation Th9<sup>307</sup>.

### Les Th17 :

Plusieurs travaux se sont penchés sur le rôle de NF- $\kappa$ B dans la polarisation des Th17 et suggèrent que la voie canonique de NF- $\kappa$ B joue un rôle clé dans ce processus. Au niveau de la signalisation du CBM, les LT naïfs triés provenant de souris déficientes en CARMA1 ou MALT1 montrent une altération profonde de la différenciation Th17, avec une diminution de la sécrétion d'IL-17a, IL-17f et du GM-CSF, et de façon étonnante on ne note aucune baisse d'expression de ROR $\gamma$ t<sup>285,286</sup>. Des résultats similaires ont été obtenus avec des LT I $\kappa$ B $\alpha$ ( $\Delta$ N) et

en utilisant un inhibiteur chimique de l'IKK $\beta$ <sup>285</sup>. *In vivo*, les souris ayant subi une délétion conditionnelle d'IKK $\beta$  au sein des LT sont protégées contre l'EAE, établissant ainsi *in vivo* un rôle de la voie canonique de NF- $\kappa$ B intrinsèque aux LT. Néanmoins, comme le suggèrent les études de Li *et al*, et He *et al*, ce phénotype ne repose pas exclusivement sur les fonctions des sous-unités canoniques de NF- $\kappa$ B. IKK $\alpha$  exerce une fonction indépendante de NF- $\kappa$ B dans la différenciation, il peut phosphoryler directement ROR $\gamma$ t pour potentialiser son activité<sup>308</sup> et pourrait se lier au promoteur de l'IL-17a puis en phosphorylant l'histone H3 moduler sa transcription<sup>309</sup>.

RelA et c-Rel assument néanmoins un rôle crucial dans la différenciation des TH17. Les niveaux d'expression de ROR $\gamma$ t et d'IL-17a sont drastiquement diminués lors de la polarisation en Th17 à partir de LT déficients en c-Rel ou en RelA (obtenues à partir de chimères de foie fœtal)<sup>289,310</sup>. Mécaniquement, la surexpression ectopique de ROR $\gamma$ t dans des LT déficients en c-Rel rétablit complètement la production d'IL-17a ; et c-Rel et RelA peuvent se lier au promoteur de ROR $\gamma$ /ROR $\gamma$ t<sup>289</sup>. Par conséquent, cela montre que RelA et c-Rel pourraient induire l'expression d'IL-17a directement ou *via* l'expression du facteur de transcription ROR $\gamma$ t qui à son tour se lie au promoteur de l'IL-17a et induit son expression. L'ensemble de ces études, tout comme le phénotype des patients *Rel-KO*<sup>221</sup>, mettent en évidence un rôle crucial de c-Rel et RelA dans la différenciation Th17. Toutefois, une étude de Powolny-Budnicka *et al*, suggère que RelA n'est pas cruciale pour la différenciation en Th17. Cette différence semble cependant liée à l'utilisation TNF $\alpha$  dans les cultures entraînant l'activation de NF- $\kappa$ B de manière indépendante du CBM<sup>311</sup>. Enfin, bien que les précédentes études suggèrent que c-Rel est impliqué dans la différenciation Th17, Visekruna *et al*, observent une production similaire d'IL-17 chez les LT déficients en c-Rel et WT<sup>312</sup>. Enfin, c-Rel semble important pour la sécrétion de GM-CSF *in vitro* par les LT<sup>313</sup>.

Contrairement à RelA et c-Rel, NF- $\kappa$ B1 semble être dispensable pour la différenciation Th17, car l'expression d'IL-17a et de ROR $\gamma$ t est normale dans les LT déficients en NF- $\kappa$ B1<sup>314,315</sup>.

L'ensemble de ces études mettent en avant un rôle possible de c-Rel et RelA dans la différenciation Th17, toutefois la contribution exacte de chaque sous-unité n'est pas encore clairement définie. De plus, il y a beaucoup de résultats contradictoires et les études ont été menées avec des modèles artificiels (délétion germinale pour c-Rel et souris reconstituées avec des cellules souches de foie fœtal pour RelA). Par conséquent, le rôle propre de c-Rel et RelA dans la différenciation des Th17 doit encore être étudié en utilisant des modèles plus appropriés, tels que ceux de délétion conditionnelle.

Les Tfh :

Plusieurs études ont souligné que la voie canonique de NF- $\kappa$ B est impliquée dans la différenciation des Tfh à différents niveaux. Ainsi, les patients présentant une mutation perte de fonction de IKK $\gamma$  ou de NF- $\kappa$ B1 présentent un nombre réduit de Tfh circulants, tandis qu'à l'inverse les patients présentant une mutation de gain de fonction d'IKK $\beta$  présentent une augmentation des Tfh (CD4 CXCR5+) circulants<sup>316</sup>

Chez la souris, les LT transgénique OT-II (reconnaissant l'alumOVA) déficient en NF- $\kappa$ B1 (OT-II NF- $\kappa$ B1<sup>-/-</sup>) présentent une altération de l'induction de CXCR5 par l'OVA, conduisant à un défaut de fonction des Tfh et de développement des centres germinaux B. NF- $\kappa$ B1 semble dans crucial pour la fonction des Tfh.

c-Rel est également impliqué dans la fonction des Tfh<sup>317</sup> notamment via la régulation de la sécrétion d'IL-21. Il se lie au promoteur de l'IL-21 et promeut son expression dans les LT<sup>318</sup>. Ainsi, les souris c-Rel<sup>-/-</sup> ont une production et expression altérée d'IL-21 par les LT CD4 et une réduction du développement des Tfh dépendante de l'IL-21 (et compensable par l'administration d'IL-21 exogène)<sup>318</sup>. De même, le miR-155 (un miRNA important pour la génération des Tfh) semble signaler via c-Rel pour promouvoir la fonction et la génération des Tfh<sup>319</sup>

*In vivo*, dans un modèle d'une infection virale à LCMV chez une souris ayant une délétion conditionnelle de RelA (Lck<sub>cre</sub>RelA<sup>Flox/Flox</sup>), RelA semble être dispensable pour la différenciation des Tfh<sup>320</sup>.

Dans l'ensemble, ces résultats soulignent les divers rôles des membres de la famille NF- $\kappa$ B dans la régulation du développement et de la fonction des Tfh. Des études supplémentaires sont nécessaires pour comprendre pleinement la régulation moléculaire et les implications thérapeutiques de ces mécanismes dépendant du NF- $\kappa$ B.

#### Les T CD4 cytotoxiques :

Peu d'études ont été réalisées sur le rôle des sous-unités de NF- $\kappa$ B dans la différenciation et fonctions des LT CD4 cytotoxiques. Il semble cependant que NF- $\kappa$ B1 soit un régulateur négatif des fonctions cytotoxiques. Une étude de Lu *et al*, montre un meilleur contrôle de la pousse tumorale et une augmentation de la proportion de cellules GZB+ dans les souris Nfkb1<sup>-/-</sup>. De même, dans des cellules EL4, NF- $\kappa$ B1 peut se lier au promoteur du GZB. Enfin, son activation est inversement corrélée à l'expression du GZB dans le carcinome colorectal humain<sup>321</sup>. Ainsi l'ensemble de ses résultats suggèrent que NF- $\kappa$ B1 se lie directement au niveau du promoteur Gzmb dans les LT, ce qui entraîne une répression de l'expression du GZB dans LTC et un moins bon contrôle de la réponse tumorale. Le rôle exact et intrinsèque de NF- $\kappa$ B1 dans les LT CD4 cytotoxiques doit encore être investigué ainsi que le rôle des autres sous-unités.

#### Les Treg :

L'implication de la voie de signalisation et des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B dans le développement et la fonction des Treg est bien établie dans la littérature<sup>322-325</sup>.

Historiquement, il a d'abord été montré que c-Rel est nécessaire au développement thymique des Treg. En effet, c-Rel est fortement exprimé dans les cellules thymiques CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> et à l'inverse l'ablation de c-Rel entraîne un défaut de développement des thymocytes CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup><sup>326</sup>. Mécanistiquement, c-Rel induit directement l'expression de *Foxp3* en se liant à son promoteur et aux régions introniques CNS2 et 3<sup>327</sup>. L'ablation conditionnelle de RelA dans les LT réduit également la différenciation thymique des Treg<sup>328</sup>.

D'autre part, les rôles des sous-unités canoniques de NF- $\kappa$ B dans l'homéostasie et la fonction des Treg matures, ont été mis en lumière grâce à l'utilisation de souris porteuses de délétion conditionnelles de gènes liés à NF- $\kappa$ B, dans les Treg grâce au système FoxP3<sub>cre</sub> (cKO). La délétion conditionnelle d'IKK2, ou combinée de c-Rel et RelA dans les Treg matures provoque une baisse importante du nombre de Treg à la périphérie, et conduit à un phénotype similaire à celui des souris *Scurfy*, c'est-à-dire une auto-immunité systémique et létale à partir de 3 semaines après la naissance<sup>323,328</sup>. Les souris RelA-cKO souffrent également d'auto-immunité (elles en meurent à partir de 8 semaines), alors que ce n'est pas le cas des souris c-Rel-cKO<sup>328,329</sup>. RelA a un rôle important dans le maintien de l'identité des Treg et l'activation de leurs fonctions suppressives à l'état basal<sup>320,328,329</sup>. A l'inverse, c-Rel ne semble pas jouer de rôle à l'état basal en périphérie mais est crucial pour la fonction des Treg activés (aTreg) au sein de la tumeur<sup>328,330</sup>. Ainsi, les souris c-Rel-cKO contrairement aux souris RelA-cKO, ont une pousse tumorale fortement diminuée dans des modèles de mélanome transplants. De même, l'administration de Pentoxyfiline, d'IT-603 ou de R96A, des inhibiteurs de c-Rel, ainsi que l'inhibition des complexes CBM ou IKK, 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<sup>330,331</sup>. Ainsi c-Rel et RelA jouent tous les deux des rôles distincts importants, et partiellement redondants, dans la fonction des Tregs.

### **3.1b Rôle des sous-unités de la voie alternative**

Les sous-unités de cette voie ne sont pas au cœur de mon sujet de thèse mais dans le cadre d'un projet secondaire réalisé en collaboration avec un autre doctorant. Nous avons étudié le rôle de RelB dans la fonction des LT (Annexe2). Dans un modèle de délétion conditionnelle de RelB dans les LT (CD4<sub>cre</sub>RelB<sup>Flox/Flox</sup>), nous avons montré que RelB n'est pas nécessaire à la différenciation en Th1, Th2 et Th17 (Annexe2). Il avait été suggéré que RelB était important pour l'expression de T-bet et de l'IFN $\gamma$ <sup>270</sup> mais *in vitro* et *in vivo* (dans un modèle de d'EAE et de colite) il est dispensable (Annexe2). RelB n'est pas impliqué dans la différenciation Th2 mais est très important pour la fonction Th9. En effet, la surexpression de RelB dans des Tconv

naïfs mis en culture avec des conditions de polarisation Th9 classiques (TGF $\beta$  + IL-4) permet d'augmenter la production d'IL-9<sup>302</sup>. Au niveau moléculaire, RelB se lie au gène de l'IL-9 dans des cellules murines Th9 et facilite l'expression de la cytokine<sup>303</sup>. Enfin, RelB n'est pas nécessaire à la polarisation Th17 et serait même un répresseur de l'expression de l'IL-17a<sup>319,332</sup>. Concernant NF- $\kappa$ B2, il ne semble pas impliqué dans la différenciation Th1<sup>333</sup>. Selon le CRISPR screen de Henriksson *et al*, il régule l'expression de l'IL-4<sup>298</sup>. Il est également important pour différenciation des Th9 induits par OX-40<sup>302,303</sup>. Concernant la différenciation Th17, tout comme RelB, NF- $\kappa$ B2 pourrait moduler négativement l'expression de l'IL-17a<sup>332,334</sup>. Enfin, NF- $\kappa$ B2 régule la stabilité des Treg, et sa délétion conditionnelle dans ces cellules entraîne l'expansion de Treg dysfonctionnels, conduisant à un syndrome inflammatoire dans l'intestin des souris âgées. RelB, quant à lui, ne semble pas impliqué dans la biologie de Treg<sup>335,336</sup>.

### 3.2 Rôle des sous-unités de NF- $\kappa$ B dans la régulation de la réponse immunitaire

#### 3.2a Rôle des sous-unités canoniques de NF- $\kappa$ B dans l'auto-immunité

NF- $\kappa$ B est un régulateur pivot de l'auto-immunité. Son importance est particulièrement frappante chez les souris déficientes en RelB qui meurent d'un syndrome auto-immun multifocal quelques semaines seulement après la naissance (Tableau 2). Ce phénotype est lié à un défaut de sélection négative des clones autoréactifs, conduisant à une activation non contrôlée. En effet, RelB est essentiel au bon développement de la médulla thymique, ainsi qu'à l'homéostasie et à la maturation des cellules épithéliales thymiques médullaires (mTECs) et des DCs médullaires<sup>267,268,337</sup>. Ce phénotype n'est pas intrinsèque aux LT mais de nombreuses études ont ensuite montré que NF- $\kappa$ B est un modulateur positif des MAI médiée par les LT. Par exemple, la délétion de l'A20 limitée aux LT matures (maT<sub>cre</sub>A20<sup>FLOX/FLOX</sup>) entraîne une inflammation des poumons et du foie et une augmentation de l'IFN $\gamma$ , l'IL-17 et du TNF circulants<sup>338</sup>. De même, chez l'homme les polymorphismes de TNFAIP3 entraînent une susceptibilité aux MAI et syndromes inflammatoires (notamment le lupus, la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis, la maladie cœliaque)<sup>305,339</sup>. Les souris immunodéficientes reconstituées avec des cellules souches de foie fœtal déficientes en Foxj1 (un inhibiteur NF- $\kappa$ B) ont un syndrome auto-immun systémique et une augmentation de l'activité des Th1<sup>340</sup>. Enfin, l'activation constitutive d'IKK $\beta$  dans les LT (souris CD4<sub>cre</sub>IKK $\beta$ <sup>CA</sup>) entraîne l'augmentation spontanée de l'expression de l'IL-17 et de l'IFN $\gamma$  par les LT et finalement un syndrome inflammatoire systémique<sup>341</sup>. L'ensemble de ces études soulignent le rôle central de la voie canonique de NF- $\kappa$ B dans les processus auto-immun et inflammatoire, avec l'implication de mécanismes à la fois intrinsèques et extrinsèques aux LT.



## Focus sur l'EAE et la SEP :

NF- $\kappa$ B semble jouer un rôle crucial dans la fonction pathogénique des LT dans l'EAE et la MS (Figure 12). Au niveau du CBM, la déficience de CARMA1 ou MALT1 protège les souris contre l'EAE<sup>285,286</sup>. L'ablation conditionnelle d'IKK $\beta$  dans les LT (CD4<sub>cre</sub>IKK2<sup>FL</sup>), ou l'expression d'I $\kappa$ B $\alpha$ -( $\Delta$ N), abolit également les symptômes de la maladie<sup>285,342</sup>. L'ensemble de ces mutations entraîne une altération des fonctions Th17 probablement à l'origine de cette protection.

En accord avec ces résultats, la délétion germinale de NF- $\kappa$ B1 et de c-Rel conduit à un phénotype similaire<sup>247,260,310</sup>. Chen *et al*, suggèrent que cette résistance est liée à la fonction qu'exerce c-Rel dans la différenciation des Th17 pathogéniques<sup>310</sup>. c-Rel est particulièrement important pour la sécrétion du GM-CSF<sup>313</sup>, cytokine clés dans la pathogenèse de l'EAE, cela pourrait donc expliquer pourquoi les souris déficientes en c-Rel sont protégées contre la maladie. Au niveau moléculaire, c-Rel est impliqué dans le remodelage de la chromatine du promoteur de *Csf2* et dans l'expression du gène. Ainsi, on observe une forte corrélation entre la présence de c-Rel dans le noyau et les événements de remodelage de la chromatine et, à l'inverse, son inhibition bloque le remodelage du promoteur du GM-CSF<sup>343</sup>.

L'ensemble de ces études soulignent l'importance de la voie canonique de NF- $\kappa$ B dans fonction pathogénique des LT CD4 mais la fonction spécifique de chaque sous-unité reste à clarifier. Le rôle intrinsèque de c-Rel dans les LT doit notamment encore être étudié à l'aide de modèles de délétion conditionnelles. De même, le rôle de RelA dans l'EAE n'a jamais été étudié en raison du manque de modèle. RelA semble être particulièrement important pour le fonctionnement des Th17 (cf partie 3.1), il pourrait donc être un acteur crucial de la fonction pathogénique des LT. Chez l'homme les polymorphisme dans les gènes de NF- $\kappa$ B1<sup>344</sup>, d'I $\kappa$ BL et d'I $\kappa$ B $\alpha$ <sup>345</sup> sont associés à une prédisposition à la SEP suggérant une fonction importante de NF- $\kappa$ B dans la pathogénicité de la SEP. De même NF- $\kappa$ B est largement présent dans les noyaux de nombreuses cellules du SNC, particulièrement dans les contextes pathologiques<sup>346-348</sup>.

Chez les patients atteints de SEP-RR, les analyses transcriptomiques montrent dans les PBMC une augmentation de l'expression de RelA pendant les phases de rechute par rapport aux phases de rémission<sup>349</sup> et dans les LT une augmentation de l'expression des gènes dépendant de NF- $\kappa$ B<sup>350</sup>. De même au niveau cellulaire, Yan *et al*, observent une augmentation de translocation de RelA dans les PBMC (notamment dans les LT) de patients atteints de SEP<sup>351</sup>. L'ensemble de ces résultats suggèrent que RelA pourrait favoriser la fonction pathogénique des Teff dans la SEP.

La fonction exacte des sous-unités NF- $\kappa$ B dans la pathogénicité des LT humains reste à déterminer, mais ces résultats plaident en faveur d'un rôle important de NF- $\kappa$ B et

particulièrement de RelA au cours de la neuro-inflammation. RelA pourrait donc être une cible thérapeutique intéressante dans la SEP.

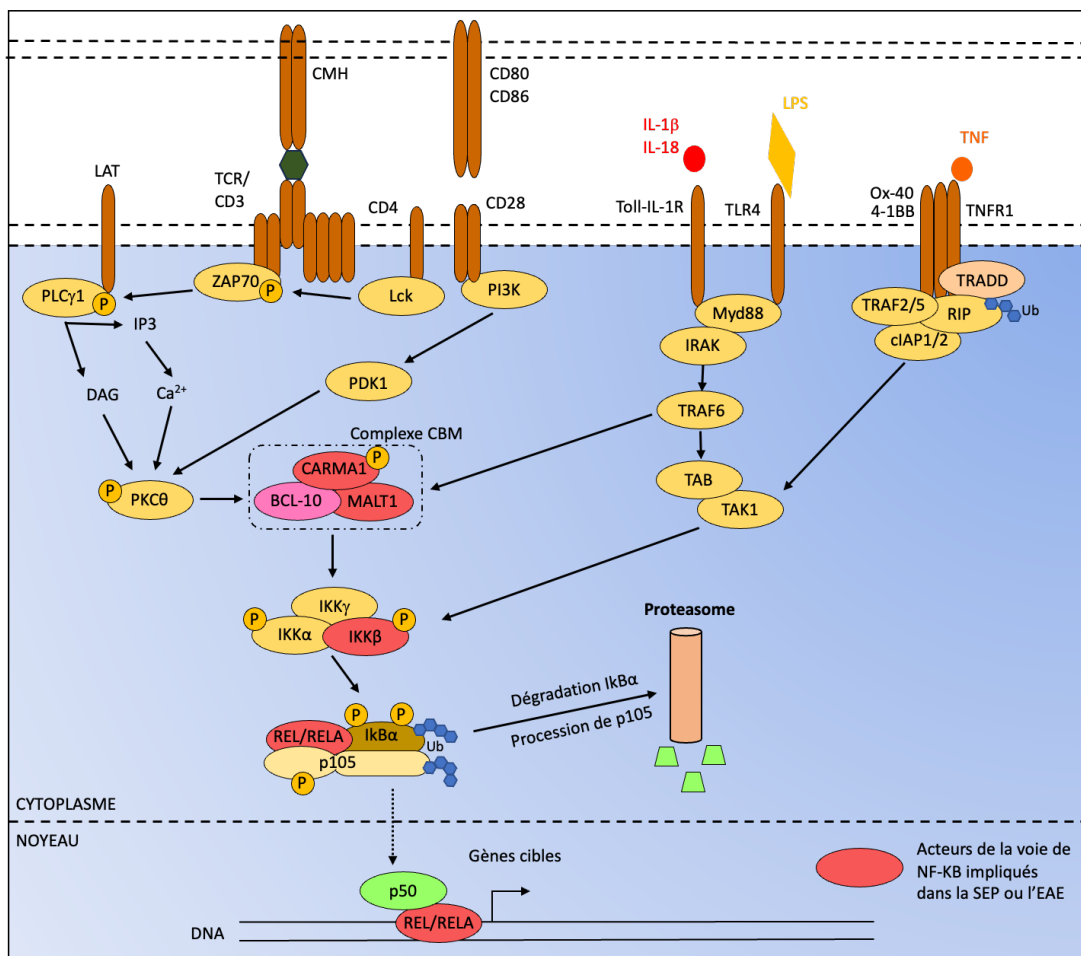


Figure 12 : Protéines de la voie canonique de NF-κB impliquées dans la SEP ou l'EAE  
 Cette figure illustre les rôles connus des membres de la voie NF-κB dans l'EAE ou la SEP. Les annotations rouges indiquent les membres participant probablement à la fonction pathogénique.

Nous avons pu voir que la voie de NF-κB est dérégulée chez les patients atteints de SEP, moduler cette voie est donc une approche thérapeutique intéressante. Certains médicaments sur le marché modulent directement ou indirectement l'activation de NF-κB<sup>346</sup>. C'est par exemple le cas diméthyle fumarate qui diminue l'activation de NF-κB dans certaines cellules immunitaires et peut moduler la réponse immunitaire<sup>352-354</sup>. De même, les corticoïdes utilisés pour traiter les poussées de SEP entraînent une inhibition de RelA en inhibant sa translocation et/ou sa transactivation<sup>355,356</sup>. Ainsi dans le sang des patients atteints de MS et traités par corticoïdes on observe une baisse de liaison de RelA dans les LT et une baisse de son activité<sup>357</sup>. L'inhibition de RelA semble donc être une approche prometteuse, cependant déterminer le rôle de RelA dans les LT demeure crucial pour pouvoir envisager un ciblage spécifique.

La voie canonique de NF- $\kappa$ B est également critique dans d'autres MAI spécifiques d'organes médiée par les LT. Par exemple, des études ont révélé que des modifications génétiques au sein de la voie NF- $\kappa$ B, dans les lymphocytes, sont associées au diabète de type 1 ainsi qu'à la maladie de Crohn<sup>358</sup>. De même, la suppression de PKC $\theta$ , IKK $\alpha$  ou IKK $\beta$  dans les LT abolit leur capacité à induire la colite lorsqu'elles sont transférées à des souris receveuses lymphopéniques<sup>296,359,360</sup>.

### **2.3b Rôle des sous-unités canonique de NF- $\kappa$ B dans la réponse anti-cancéreuse**

Les rôles multiples de la voie de NF- $\kappa$ B dans l'homéostasie et la fonction effectrice des LT suggèrent une implication importante de celle-ci dans l'immunité antitumorale. Ainsi, l'ablation conditionnelle d'IKK $\beta$  dans les LT ou de CARMA1 dans l'ensemble des cellules, conduit à une croissance tumorale accrue dans un modèle de fibrosarcome. On observe dans les deux cas une baisse de la production d'IFN $\gamma$  par les splénocytes<sup>300</sup>. A l'inverse, l'activation constitutive d'IKK $\beta$  dans les LT entraîne un rejet spontané des tumeurs dans un modèle de mélanome. Cette protection semble majoritairement médiée par les LT CD8 mais souligne le rôle important de la voie canonique de NF- $\kappa$ B dans la fonction anti-tumorale des LT<sup>361</sup>. De même, l'ablation d'A20 dans les LT mature améliore fortement leur potentiel antitumoral (baisse de la croissance tumorale, augmentation de la sécrétion d'IFN $\gamma$  et de TNF $\alpha$ ) et son overexpression dans les LT CD8 réduit le control tumoral<sup>338</sup>. Ainsi, la voie canonique de NF- $\kappa$ B joue un rôle critique dans la réponse antitumorale des LT. Néanmoins, on ne sait pas si cet effet est dû à l'influence de NF- $\kappa$ B dans les LT CD4 ou les LT CD8 et quelles sous-unités sont cruciales.

En plus de son importance pour les réponses effectrices des LT, NF- $\kappa$ B peut également être impliqué dans la revigoration des LT. Bien que le phénomène d'épuisement soit largement documenté pour les LT CD8, et très peu pour les LT CD4, la revue de Miggelbrink *et al*, montre une susceptibilité des LT CD4 à l'épuisement<sup>362</sup>. Considérant leur rôle essentiel dans l'immunité anti-tumorale, il est crucial de caractériser avec précision l'épuisement des LT CD4 et de comprendre les mécanismes sous-jacents. Cette démarche est fondamentale pour optimiser les stratégies thérapeutiques anticancéreuses. L'épuisement des LT est caractérisé par une réduction de la capacité proliférative, une décroissance de l'expression des cytokines effectrices, ainsi qu'une altération de leur polyfonctionnalité. À l'instar des LT CD8 épuisés, les LT CD4 épuisés expriment des récepteurs inhibiteurs tels que PD-1, CTLA-4, LAG3, CD39, TIM3 et TIGIT<sup>362</sup>. L'épuisement des LT CD8 est associé à une baisse de la transcription dépendante de NF- $\kappa$ B et à une diminution de la translocation de RelA, dans le noyau<sup>363</sup>. Cette étude suggère un défaut d'activation de la voie canonique de NF- $\kappa$ B lors de l'épuisement des LT, ainsi réactiver NF- $\kappa$ B dans ces LT pourrait améliorer permettre d'améliorer les fonctions antitumorales des Teff. Ainsi, les analyses transcriptomiques montrent une activation accrue des gènes cibles de NF- $\kappa$ B lors de thérapies bloquant les points de contrôle chez la souris et les

cancers humains<sup>364</sup>. Plus directement, l'engagement du récepteur PD-1 inhiberait le "signalosome" du TCR, ce qui plaide en faveur d'un effet sur l'activation de NF- $\kappa$ B<sup>365</sup>, comme cela a déjà été démontré dans des cellules dendritiques intratumorales<sup>366</sup>. De même, le blocage de PD-1 sur des LT humains activés et en contact avec PDL1 entraîne une restauration de la phosphorylation de PDK1 et donc une activation ultérieure de NF- $\kappa$ B<sup>367</sup>.

En contradiction avec cette apparente fonction protectrice du NF- $\kappa$ B dans l'immunité antitumorale, NF- $\kappa$ B joue un rôle majeur dans la fonction pro-tumoral des Treg, soulignant ainsi le rôle complexe de cette voie de signalisation dans le cancer<sup>368</sup>. De même, NF- $\kappa$ B joue un rôle essentiel dans la transformation, la prolifération et le potentiel métastatique des cellules tumorales. Par exemple, l'activation de NF- $\kappa$ B dans les tumeurs promeut la production de différentes cytokines et chimiokines ainsi que l'expression de PD-L1, imposant ainsi un microenvironnement immunosuppresseur<sup>369,370</sup>. Enfin, récemment il a été montré dans les LT CD8 que la signalisation CD137 (4-1BB) promeut l'épuisement par un mécanisme impliquant RelA et c-Rel<sup>371</sup>.

Cette double fonction de la voie canonique de NF- $\kappa$ B dans l'immunité et la tolérance tumorale soulève une question majeure pour l'immunothérapie du cancer : faut-il inhiber ou plutôt stimuler NF- $\kappa$ B *in vivo* ?

Une série d'études suggèrent que l'inhibition de NF- $\kappa$ B pourrait être une stratégie prometteuse pour renforcer l'immunité antitumorale. À l'origine, l'inhibiteur de l'IKK, la curcumine, a été mis en évidence pour son effet antitumoral, seul ou en association avec une thérapie anti-PD-1/anti-PD-L1. Plus récemment, il a été montré que l'inhibition, par des petites molécules inhibitrice, *in vivo*, de Malt1 (Mépazine), d'IKK $\beta$  (KINK-1), ou de c-Rel (pentoxifylline ou R96A), réduit significativement la croissance des mélanomes ou de tumeurs du sein transplantés<sup>322,323,330,331</sup>. L'axe CBM/IKK/c-Rel est donc une cible intéressante pour les thérapies anticancéreuses. Ces inhibitions jouent un rôle bénéfique en inhibant les Treg mais également en inhibant certains mécanismes pro-tumoraux.

Néanmoins l'inhibition de NF- $\kappa$ B a des répercussions négatives sur les fonctions effectrices des lymphocytes T. Par conséquent, une approche alternative pourrait être envisagée consistant à réactiver NF- $\kappa$ B dans les LT effecteurs afin d'amplifier leur capacité antitumorales. La montée en puissance et l'évolution révolutionnaire des immunothérapies, (cf partie 1.4) atteste de la pertinence de cette stratégie. Par exemple, des travaux mettent en avant la possibilité d'améliorer l'efficacité des CAR-T cells grâce à l'insertion de corécepteur stimulation. Parmi 12 récepteurs co-stimulants testé par Zhang *et al*, OX40 a été identifié comme le meilleur amplificateur de la fonction CAR et permet une meilleure activation de NF- $\kappa$ B<sup>372</sup>. De même, les agonistes de l'ICOS, à l'étude dans divers cancers<sup>373,374</sup>, peuvent activer NF- $\kappa$ B après le recrutement de PI3K/PDK1. Enfin les immunothérapies modulant l'activité des TNFRSF induisent ou maintiennent l'activation de NF- $\kappa$ B en complément de la stimulation du TCR<sup>375</sup>.

Dans l'ensemble, les découvertes de ces dernières années sur le rôle de NF- $\kappa$ B dans les LT effecteurs et régulateurs soulignent que la modulation de la signalisation NF- $\kappa$ B est une stratégie d'immunothérapie prometteuse contre le cancer.

L'ensemble de ces données suggèrent des rôles potentiels des différentes sous-unités de NF- $\kappa$ B dans la régulation des LT CD4 à l'état basal et en situation de pathologie. Mon travail de thèse s'est attaché à décrypter ces mécanismes, une attention particulière étant portée aux fonctions spécifiques de RelA et c-Rel.

## Résultats

Nous avons vu que bien que NF- $\kappa$ B soit accepté comme un régulateur majeur de l'immunité et de la fonction des LT, la fonction sélective et intrinsèque de chacune de ses sous-unités dans les Tconv reste largement inconnue. Ceci est notamment dû à l'absence de modèles murins appropriés. Par exemple, les souris porteuses d'une ablation de RelA ou RelB dans la lignée germinale ne sont pas utilisables, du fait d'une létalité embryonnaire ou d'une auto-immunité létale, respectivement. La souris Rel<sup>-/-</sup> a largement été utilisée, mais au vu du rôle de la protéine dans les DC, les macrophages et les LB, il est difficile de conclure sur son rôle spécifique dans les Tconv.

Pour dépasser ce problème, nous utilisons au laboratoire des souris porteuses d'ablation conditionnelle des sous-unités spécifiquement dans les LT (souris CD4<sup>cre</sup>) mais également de délétions conditionnelles inducible dans les LT CD4 (souris CD4<sup>creERT2</sup>) et enfin du CRISPR/Cas9 KO pour déléter c-Rel et RelA dans des LT CD4 primaires humains.

Ce premier projet s'est donc intéressé à détailler les contributions sélectives de RelA et c-Rel dans les Tconv, à l'état basal, mais également dans le contexte de l'auto-immunité et du cancer. Nous avons pu mettre en évidence des rôles spécifiques de ces protéines selon le contexte.

Nous avons ensuite réalisé des analyses fonctionnelles et transcriptomiques qui ont permis de mettre en évidence des rôles différents de RelA et c-Rel dépendant du contexte physiologique.

## **NF- $\kappa$ B transcription factors RelA and c-Rel selectively control CD4<sup>+</sup> T-cell function in multiple sclerosis and cancer.**

*Soumis à Journal of Experimental Medicine le 01/08/2023, sous revues depuis le 29/08/2023*

## **NF- $\kappa$ B transcription factors RelA and c-Rel selectively control CD4<sup>+</sup> T-cell function in multiple sclerosis and cancer.**

### ***Running title : NF- $\kappa$ B subunits in CD4<sup>+</sup> T-cell function***

Guilhem Lalle<sup>1,#</sup>, Raphaëlle Lutraite<sup>1,#</sup>, Khaled Bouherrou<sup>1</sup>, Maud Plaschka<sup>1</sup>, Aurora Pignata<sup>2</sup>, Allison Voisin<sup>1</sup>, Julie Twardowski<sup>1</sup>, Marlène Perrin-Niquet<sup>1</sup>, Pierre Stéphan<sup>1</sup>, Laurie Tonon<sup>1</sup>, Maude Ardin<sup>1</sup>, Cyril Degletagne<sup>1</sup>, Alain Viari<sup>1</sup>, Thomas S. Postler<sup>3</sup>, Jingyao Zhao<sup>3</sup>, Christophe Caux<sup>1</sup>, Julie Caramel<sup>1</sup>, Stéphane Dalle<sup>1</sup>, Philippe Cassier<sup>1</sup>, Ulf Klein<sup>4</sup>, Marc Schmidt-Supprian<sup>5</sup>, Roland Liblau<sup>2</sup>, Sankar Ghosh<sup>3</sup> and Yenkel Grinberg-Bleyer<sup>1,\*</sup>

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

<sup>2</sup> Toulouse Institute for Infectious and Inflammatory Diseases (Infinity), University of Toulouse, CNRS, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), UPS, Toulouse, France.

<sup>3</sup> Department of Microbiology & Immunology, College of Physicians & Surgeons, Columbia University, New York, NY 10032, USA.

<sup>4</sup> Division of Haematology & Immunology, Leeds Institute of Medical Research at St. James's, University of Leeds, Leeds, UK.

<sup>5</sup> Institute of Experimental Hematology, School of Medicine, Technical University of Munich, Munich 81675, Germany; Center for Translational Cancer Research (TranslaTUM), School of Medicine, Technical University of Munich, Munich 81675, Germany; German Cancer Consortium (DKTK) and German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg 69120, Germany

# Equal contribution

\* Corresponding author: [Yenkel.grinberg-bleyer@inserm.fr](mailto:Yenkel.grinberg-bleyer@inserm.fr)

## **Summary**

CD4<sup>+</sup> T cells exhibit pleiotropic roles in autoimmunity and cancer. Lalle et al. demonstrate that their function is selectively controlled by different NF- $\kappa$ B subunits depending on the disease context. This work unravels critical regulators of T-cell function and paves the way toward NF- $\kappa$ B-subunit-targeted immunotherapies.

### **Abstract**

The outcome of cancer and autoimmunity is often dictated by the effector functions of CD4<sup>+</sup> conventional T cells (Tconv). Although activation of the NF- $\kappa$ B signaling pathway has long been implicated in Tconv biology, the cell-autonomous roles of the separate NF- $\kappa$ B transcription-factor subunits are unknown. Here, we dissected the contributions of the canonical NF- $\kappa$ B subunits RelA and c-Rel to Tconv function. RelA, rather than c-Rel, regulated Tconv activation and cytokine production at steady-state, and was required for polarization toward the TH17 lineage *in vitro*. Accordingly, RelA-deficient mice were fully protected against neuro-inflammation in a model of multiple sclerosis, due to defective transition to a pathogenic TH17 gene-expression program. Conversely, Tconv-restricted ablation of c-Rel impaired their function in the microenvironment of transplanted tumors, resulting in enhanced cancer burden. Moreover, Tconv required c-Rel for the response to PD-1-blockade therapy. Our data reveal distinct roles for canonical NF- $\kappa$ B subunits in different disease contexts, paving the way for subunit-targeted immunotherapies.

### **Introduction**

Conventional CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> T cells (Tconv) exhibit pleiotropic functions in immunity. While they are critical for the clearance of a broad spectrum of pathogens, a growing body of literature suggests that Tconv are also potent effectors of anti-tumor responses. Their accumulation and activation are frequently associated with good prognosis in solid cancers, and response to cancer immunotherapies such as checkpoint blockade-based therapies seems to be correlated with proper Tconv function (Borst et al., 2018; Cohen et al., 2022). Conversely, uncontrolled Tconv activation promotes autoimmune manifestations; for instance, they are key players of Crohn's disease, rheumatoid arthritis or multiple sclerosis (MS) (Christophersen et al., 2019). This spectrum of functions relies on a myriad of different Tconv subsets. Indeed, the type of antigenic stimulation and the cytokine microenvironment drive the polarization toward different flavors of T helper (TH) cells that display selective roles in immune responses (Zhu and Paul, 2010). For instance, TH1 and T follicular helper (TFH) cells were shown to orchestrate immune responses to tumors (Borst et al., 2018), whereas Granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF)-producing, pathogenic TH17 cells emerge as the main drivers of MS and its murine



model experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) (Codarri et al., 2011; Croxford et al., 2015).

In addition to specific transcription factors that drive the effector functions of each TH subset, a series of pioneering transcriptional regulators has been proposed to impact the fate of naïve Tconv. Downstream of the T-cell receptor (TCR) and co-stimulation molecules, nuclear factor of activated T-cells (NFAT), Activator protein 1 (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 (Shah et al., 2021). However, whether these proteins selectively dictate the fate of Tconv and TH cells in different diseases, 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 subunits (Oeckinghaus et al., 2011). The involvement of NF-κB in T-cell biology has long been known through the use of mouse models carrying germline or conditional ablation of upstream regulators of the NF-κB pathway (reviewed in (Gerondakis et al., 2014; Voisin and Grinberg-Bleyer, 2021)). NF-κB is constitutively activated in tissues exposed to chronic inflammation, such as the brain of patients with MS, and may even serve as a biomarker for relapse (Mc Guire et al., 2013; Satoh et al., 2008; Yan et al., 2018). In line with this, T-cell restricted ablation of the upstream kinase *IKK2* confers resistance to EAE in mice (Greve et al., 2007). Conversely, impaired activation of NF-κB has been shown in T cells from patients with cancer (Li et al., 1994); moreover, in mice, anergic T cells, that resemble tumor-infiltrating exhausted cells, display decreased NF-κB activity (Clavijo and Frauwirth, 2012). Consistent with this idea, constitutive NF-κB activation in T cells has been shown to drive tumor rejection in mouse models (Barnes et al., 2015b). Furthermore, the efficacy of checkpoint-blockade therapies relies on CD28 signaling in T cells, a cascade which triggers NF-κB activation (Kamphorst et al., 2017). RNA-seq analyses highlighted the enrichment of NF-κB-driven signatures in patients responding to anti-Programmed cell death 1 (PD-1) and anti-CTLA-4 therapies (Grasso et al., 2021).

Nevertheless, the selective contribution of each NF-κB subunit to the activation and differentiation processes of T cells in cancer and autoimmunity remains elusive. Such investigations have so far been prevented by the lack of adequate models: for instance, germline ablation of *Rela* leads to embryonic lethality (Beg et al., 1995), whereas *Relb*-deficiency drives systemic autoimmunity (Weih et al., 1995). Data on the Tconv-autonomous roles of alternative NF-κB subunits are scarce (Lalle et al., 2021a), though

canonical signaling seems to play the most critical role 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 proliferation, IL-2 expression, as well as TH17 differentiation, although this latter parameter remains controversial, the same being true for RelA (Beaussant-Cohen et al., 2019; Hilliard et al., 2002; Levy et al., 2021; Powolny-Budnicka et al., 2011; Ruan et al., 2011; Visekruna et al., 2010). *Rel* and *Nfkb1*-deficient mice are largely resistant to EAE (Chen et al., 2011; Hilliard et al., 2002). Reciprocally, canonical NF- $\kappa$ B activation in all T cells is required to control cancer growth, though this phenotype likely relies on CD8<sup>+</sup> T-cell intrinsic mechanisms (Barnes et al., 2015a). It remains unclear whether the two closely related proteins RelA and c-Rel exhibit distinct contributions to the development and function of T-cell subsets. Our recent studies suggested a context-dependent role for these transcription factors in Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells (Tregs) (Grinberg-Bleyer et al., 2018; Grinberg-Bleyer et al., 2017; Oh et al., 2017), but their putative roles in Tconv are understudied. Here, we used a series of conditional knock-out (KO) mouse models and gene-edited primary human cells to bridge the knowledge gap on the functions of RelA and c-Rel in Tconv at steady-state, in EAE and in cancer.

## Results

### *NF- $\kappa$ B RelA directs Tconv activation at steady-state*

We first aimed at deciphering the distinct roles of RelA and c-Rel in regulating Tconv biology at steady-state. *CD4<sup>cre</sup>* mice were crossed with animals carrying floxed alleles for *Rela* or *Rel* (hereafter named cKO for conditional knock-out mice), resulting in the ablation of these genes in all T-cell subsets accompanied by green fluorescent protein (GFP) expression (Heise et al., 2014). Of note, the relative distribution and cell numbers of T-cell subsets in the thymus were maintained in the absence of either RelA or c-Rel, with the exception of impaired Treg cell development in *Rel*-cKO mice, as we and others previously reported (Oh et al., 2017; Webb et al., 2019)(Supplementary Figure 1A-D). Nevertheless, we detected a slight but significant reduction in the number of Tconv and CD8<sup>+</sup> T cells in the lymph nodes (LN) and spleens of *Rela*-cKO mice (Supplementary Figure 1F-G). To examine Tconv-cell intrinsic functions of NF- $\kappa$ B subunits, we performed mixed bone marrow (BM) transfer experiments of CD45.1<sup>+</sup> cells and control or cKO CD45.2<sup>+</sup> cells (Figure 1A). Flow cytometric analysis of spleen cells 8 weeks after BM transfer, revealed a competitive disadvantage of *Rela*, but not *Rel*, -deficient T cells (Figure 1B). The accumulation of Tregs was strongly impaired in the absence of either RelA or c-Rel (Supplementary Figure 2A). Among CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> Tconv, we detected a reduction of activated CD44<sup>high</sup> (in particular CD44<sup>high</sup>CD62L<sup>low</sup>

effector memory cells) and proliferating Ki67<sup>+</sup> cells in the *Rela*-cKO compartment and to a lesser extent in the *Rel*-cKO BM, compared to controls (Figure 1C and Supplementary Figure 2B). Next, we examined cytokine expression following polyclonal restimulation. We found that RelA played a more prominent role than c-Rel in the expression of classical T cell cytokines IL-2 and IFN $\gamma$ ; in contrast the proportion of TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> cells was not significantly impacted in the absence of NF- $\kappa$ B (Figure 1D). To gain insight into the regulation of gene expression by NF- $\kappa$ B subunits, we then conducted RNA-sequencing analyses on control and mutant Tconv, stimulated with anti-CD3/CD28 and IL-2 for 4 h. Differential gene expression analyses revealed large alterations in the transcriptome of *Rela*-cKO Tconv, with 933 genes being significantly up- or down-regulated. In comparison, *Rel*-cKO Tconv displayed a lower level of transcriptomic modifications, with 199 differentially expressed genes (DEGs), among which only 16 were specific to *Rela*-cKO cells (Figure 1E-F and Supplementary Figure 2C). Among the genes altered in *Rela*-cKO Tconv, many were 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 IFN signaling and IFN-stimulated genes were also down-regulated (e.g., *Mx2*, *Ifit1* and *Irf7*). As shown in other cell types, RelA was also necessary for the optimal expression of NF- $\kappa$ B pathway-related genes (e.g., *Tnfaip3*, *Nfkbia* and even other NF- $\kappa$ B subunits). Gene ontology analyses highlighted altered cytokine/cytokine receptor interactions as well as various inflammation-related signatures and NF- $\kappa$ B signaling as expected, upon *Rela*-ablation (Figure 1H and Supplementary Figure 2D). Thus, RelA, rather than c-Rel seems to be a prime determinant of Tconv activation ex vivo. To gain further insight into the regulation of gene expression by RelA, we used our previously published RelA-ChIP-Seq data from CD3/CD28 stimulated Tconv (Oh et al., 2017) (GSE99319). Intriguingly, out of the 933 DEGs 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 transcription regulators (transcription factors or epigenetic regulators) including the AP-1 members Jun and BATF (Figure 1J and Supplementary Figure 2E-F). Interestingly, by using public ChIP-Seq databases in T cells (Liu et al., 2019), we found that 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 (Betz et al., 2010; Seo et al., 2021). These observations thus provide a mechanistic understanding of gene regulation by NF- $\kappa$ B in Tconv, and highlight a crosstalk between NF- $\kappa$ B and MAPK pathways.

Despite the recent description of few patients carrying loss-of-function *RELA* or *REL* mutations, T-cell-autonomous functions of these subunit in humans are unclear. We developed a CRISPR-Cas9/Ribonucleoprotein electroporation approach to ablate *RELA* or *REL* in *in vitro* stimulated primary human Tconv from healthy donors (Figure 2A). This approach regularly led to over 90% *RELA* and *C-REL* deletion at the protein level (Figure 2B). We first deciphered gene expression patterns in control and mutant cells by RNA-seq after 4 h of re-stimulation with anti-CD3/CD28 and IL-2. Whereas only 12 genes were altered in *REL*-deficient cells, loss of *RELA* caused significant changes in the expression of 378 genes (of those, 6 were common to *REL*<sup>-/-</sup> cells) (Figure 2C-D and Supplementary Figure 3A). As for mouse cells, human *RELA* controlled the expression of genes related to NF-κB and other signaling pathways, of activation markers, as well as of cytokines and chemokines (Figure 2E). 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*<sup>-/-</sup> that had mouse orthologues, 80 were also found significantly downregulated in our mouse data; the correlation was weaker for up-regulated genes (Supplementary Figure 3C). This relatively poor correlation between mouse and human transcriptomes was likely due to the fact that NF-κB ablation in human cells was conducted after a first round of stimulation, thus hindering the possible roles of *RELA* and *c-REL* in the early transcriptional program of Tconv. Nevertheless, KEGG enrichment analyses on common down-regulated genes highlighted once again the involvement of *RELA* in TH17 signature genes (Supplementary Figure 3D). Next, we explored the proliferative capacity of Tconv *in vitro*, and found that *REL* ablation, but not *RELA*, 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 2F-G). In addition, FACS analyses following PMA-ionomycin restimulation showed a reduction of both TNF-α- and IL-2-expressing *RELA*<sup>-/-</sup> cells compared to the control, whereas *REL* deletion only decreased TNF-α (Figure 2G). IFNγ expression was highly variable between donors and was not significantly changed in the absence of *RELA* or *REL*. These results reinforce the role of *RelA* in shaping the transcriptome of Tconv both in mice and humans.

#### *Selective functions of RelA and c-Rel in Thelper cell polarization*

Because our transcriptome analyses suggested cell-autonomous roles for NF-κB subunits in TH differentiation, we next performed *in vitro* culture assays using naïve Tconv from control and cKO mice. We first measured whether canonical NF-κB was involved in the proliferation of naïve cells, and found a minor trend toward reduced

proliferation in the absence of either *Rela* or *Rel*, that could be rescued by exogenous IL-2 in the latter case (Figure 3A). In TH1-polarizing conditions, the proportion of IFN $\gamma$ <sup>+</sup> cells was significantly altered in the absence of RelA, but not c-Rel (Figure 3B), without affecting the expression of the TH1 master transcription factor T-Bet. Consistent with published data (Balasubramani et al., 2010), RelA was bound to the *Ifng* locus in anti-CD3/CD28 stimulated cells, but also to T-Bet (Figure 1J and Supplementary Figure 4A). In TH2 differentiation, GATA-3 expression was slightly decreased, though not significantly, exclusively in *Rela*-cKO cells (Figure 3C). This is in line with a recent report (Henriksson et al., 2019) and was associated with direct RelA binding to an intronic region of the *Gata3* locus (Supplementary Figure 4B). IL-4 or IL-13 could not be detected by FACS or ELISA, probably because the C57Bl/6 genetic background is not prone to TH2 differentiation (Kelso et al., 1991). Finally, we detected a selective contribution of RelA in the differentiation of TH17 cells (Figure 3D). Indeed, the number of ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> and IL-17A<sup>+</sup> cells decreased by approximately 50% in the absence of RelA in ‘classical’ (TGF- $\beta$ +IL-6) culture conditions, whereas *Rel*-deficient cells showed unaltered differentiation. This intriguing phenotype was further confirmed in ‘pathogenic’ (TGF- $\beta$ +IL-6+IL1 $\beta$ +IL-23+anti-IL-2) culture conditions. Mechanistically, RelA bound directly to the *Rorc* locus, even in “TH0” conditions, but not to the *Il17a* locus (Supplementary Figure 4C). To understand whether this general impairment of *Rela*-deficient cells resulted from a role in the initial priming of naïve Tconv rather than a function in TH-lineage specification, we also analyzed the expression of CD44 after 24 h of stimulation, but no difference could be detected between control and *Rela*-deficient Tconv (Supplementary Figure 4D). These data thus illustrate major contributions of RelA to *in vitro* TH subset differentiation.

#### *RelA promotes Tconv pathogenicity in EAE*

Next, we investigated the *in vivo* relevance of these findings in the context of autoimmunity. We used an active EAE model, relying on the activity of GM-CSF-producing Tconv that adopt a pathogenic TH17 phenotype (TH17p cells). Whereas control mice developed a severe EAE, we observed a drastic protection of *Rela*-cKO mice against disease development. Indeed, only ~20% of the animals developed detectable clinical symptoms, and their maximal scores peaked at 1.5 (Figure 4A-C). This protection was substantiated at the histological level, with decreased destruction of myelinated areas in the dorsal horn of the spinal cord (Figure 4D). In addition, whereas active EAE in control mice led to a massive activation of microglia and other myeloid cells in the central nervous system (CNS), this process was abolished in the absence of RelA, as assessed by MHC-II and Iba1 expression by FACS and

immunofluorescence, respectively (Supplementary Figure 5). In contrast, *Rel*-deficiency in T cells did not impact the onset or progression of EAE. Thus, RelA in Tconv has a critical and non-redundant function in promoting neuro-inflammation. Accordingly, the total number of CNS-infiltrating Tconv was dramatically decreased in *Rela*-cKO but not *Rel*-cKO tissues, suggesting defective recruitment, proliferation and/or survival in non-lymphoid tissues; these numbers were not altered in draining lymph nodes (dLN) (Figure 4E).

To understand how RelA and c-Rel differentially shape Tconv function in EAE, we analyzed their transcriptome at the single-cell level by droplet-based scRNA-seq (10X Genomics). A total of 9,912 CD4<sup>+</sup> T cells from dLN and the CNS (pooled brain and spinal cord, S.C.) of control, *Rela*-cKO and *Rel*-cKO mice, 15 days after EAE induction, were successfully sequenced. As expected, Treg cell clusters could be detected in each tissue, which were excluded for further analyses to specifically dissect Tconv identity (Supplementary Figure 6A). In dLN, Seurat clustering led to the identification of 5 clusters (Supplementary Figure 6B). We used top markers and known genes to annotate these populations (Supplementary Figure 6C). Naïve cells were characterized by high *Lef1*, *Ccr7*, *Sell* and low *Cd44* expression and represented the majority of cells. In addition, we found a cluster of naïve cells expressing high levels of IFN-stimulated genes (*Ifit1*, *Ifit3b*, *Isg15*...). An “intermediate” state was defined by the low expression of *Cd44* but high *Tnf* and *Nfkbid*; finally, TEM (*Sell*<sup>low</sup> *Cd44*<sup>high</sup>) and cycling (*Mki67*<sup>+</sup>) cells were identified. The general distribution of these clusters was not different between genotypes, except for the IFN\_signature cluster that was enriched in *Rela*-cKO dLNs (Supplementary Figure 6D). DEG analysis showed that only 27 and 32 genes were statistically altered in *Rela* and *Rel*-cKO cells, respectively (Supplementary Figure 6E). Thus, the ablation of single NF-κB subunits did not drive sizeable perturbations in Tconv distribution, activation and transcriptome in lymph nodes at this time point. In contrast, in the CNS, NF-κB ablation led to dramatic shifts in cell distribution. Overall, 8 clusters could be identified, including naïve-like and IFN\_signature cells similar to those in dLN, but also TH1 cells (*Fas*<sup>+</sup>*Ifng*<sup>+</sup>*Rorc*<sup>-</sup>), classical TH17 (*Rorc*<sup>+</sup>*Il17re*<sup>+</sup>*Csf2*<sup>-</sup>) as well as pathogenic TH17 (*Rorc*<sup>+</sup>*Ifng*<sup>+</sup>*Csf2*<sup>+</sup>*Lta*<sup>+</sup>) populations, but also 2 clusters of proliferating cells (Figure 4F-G). Comparing the distribution of these clusters between genotypes, we found a strong enrichment in naïve-like cells in *Rela*-cKO mice, at the expense of TH17 and TH17p cell clusters (Figure 4H-I), supporting the critical role of RelA in TH17 polarization. Of note, although the proportion of TH17 cells was reduced in *Rel*-cKO mice, the TH17p cluster was maintained, possibly explaining the unaltered disease severity in these mice. In addition, a distinct cluster of cells harboring features of both exhaustion (*Tox*, *Lag3*,

*Pdcd1*, *Havcr2*, *Ccl5*) and cytotoxicity (*Gzmk*, *Gzmb*, *Eomes*, *Klrd1*) with maintained expression of *Ifng* but devoid of *Rorc* or *Csf2*, could be detected solely in *Rel*-cKO tissues, and likely contributed to disease pathogenicity-as suggested in patients with MS (Raveney et al., 2021; Schafflick et al., 2020). Gene set enrichment analyses (GSEA) showed that this cluster also matched a TH17p signature, although *Rorc*, *Csf2* or *Il17a* were not detectable (Figure 4H). Overall, public TH17 signature scores were lower in the absence of RelA, but not c-Rel (Supplementary Figure 6F). Importantly, the proportion of cells undergoing proliferation (S and G2M clusters) was reduced by about 3-fold in *Rela*-deficient, and to a lesser extent in *Rel*-cKO Tconv. This may provide an explanation to the impaired accumulation of Tconv in the CNS of mutant mice, and matched our *in vitro* observations. In sum, the ablation of RelA and c-Rel had distinct effects on the Tconv transcriptome. *Rela*-deficiency had more pronounced effects, with more than 900 DEGs; among those, 128 were shared with *Rel*-deficient cells, including *Cd69* or *Tnf*, but also TH17 hallmarks such as *Rorc*, *Tmem176a/b* and even *Csf2* (Figure 4J-K). However, the impact of *Rela* ablation on the expression of these DEGs was more pronounced than that in *Rel*-deleted Tconv. Of note, the number of DEGs in *Rela*-cKO tissues differed depending on the cell cluster, with strong changes in the naïve, TH1 and TH17p subsets (Figure 4L). In the latter case, we detected a moderate decrease in *Rorc*, *Il17a*, *Csf2* and *Tmem176a* expressing-cells, suggesting that RelA was involved not only in the priming of the TH17 subset, but also in the maintenance of its transcriptional program (Figure 4M).

We then aimed at confirming these data at the protein level, by spectral flow cytometry 20 days after disease induction. As observed at the RNA level, the proportion of CD44<sup>high</sup> effector/memory Tconv in dLN and their expression of cytokines, was similar between strains (Supplementary Figure 6G). In contrast, the proportion of CD44<sup>high</sup> Tconv was reduced in the brain of *Rela*-cKO animals (Figure 4M). In line with this, MOG<sub>33-55</sub> tetramer staining demonstrated a defective accumulation of MOG-specific T cells in the brain of *Rela*-cKO mice. In addition, we detected major alterations in the expression of TH17-related cytokines and transcription factors ROR $\gamma$ t, IL-17A, IL-17F and GM-CSF in *Rela*-cKO Tconv, whereas the profile of *Rel*-cKO was similar to the controls, with the exception of decreased GM-CSF<sup>+</sup> cells. TH1 hallmarks T-Bet, TNF- $\alpha$  and IFN $\gamma$  were identical in all strains (Figure 4N-O). Thus, RelA activity in Tconv is critical for their acquisition of pathogenic features in the CNS.

To investigate whether RelA may also be involved in the initial priming of Tconv prior to infiltration in the CNS and development of clinical signs, we examined the accumulation and activation status of MOG-specific Tconv in dLNs. Their proportion and antigen-experienced phenotype levels were not diminished in *Rela*-cKO mice

compared to controls at D4, D10, and even increased at D20 after immunization (Figure 5A). However, at D4, their expression of inflammatory cytokines IFN $\gamma$  and GM-CSF was lower upon restimulation with MOG<sub>33-55</sub>, suggesting a role for RelA in the early polarization of Tconv toward the TH17/TH17p lineage (Figure 5B). In order to rule out a possible involvement of CD8<sup>+</sup> T cells, we also analyzed the incidence and severity of EAE in *Rela*-floxed mice crossed with the CD8a<sup>cre</sup> (E8I<sup>cre</sup>) background, thereby restricting the ablation of NF- $\kappa$ B to mature peripheral CD8<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> cells (Supplementary Figure 7A).

To better discriminate the putative functions of RelA in the priming and the maintenance of the disease, we crossed *Rela*-floxed mice with the CD4<sup>cre-ERT2</sup> strain (termed icKO for inducible conditional knock-out mice), enabling tamoxifen-inducible acute ablation of the gene in peripheral CD4<sup>+</sup> T cells. Interestingly, we observed that tamoxifen administration induced a recombination, as evidenced by the expression of GFP, which was up to 10-fold higher in Tconv than that in Tregs (Supplementary Figure 7B). Thus, this strategy allowed to spare CD8<sup>+</sup> T cells and the vast majority of Tregs from *Rela*-excision, enabling the Tconv cell-intrinsic study of RelA. When tamoxifen was administered prior to EAE induction, *Rela*-icKO mice were entirely protected against disease signs, confirming the function of RelA in the early pathogenic process (Figure 5C). In contrast, when tamoxifen injections were initiated after the appearance of the first signs (from D7 on), the course of the disease was similar between control and *Rela*-deficient animals, thus demonstrating that Tconv cell-autonomous RelA was required for the initiation of the disease but dispensable for its progression. Collectively, this establishes RelA as a novel and critical regulator of Tconv function in autoimmunity, through the regulation of TH17 differentiation in lymphoid and inflamed tissues.

#### *c-Rel orchestrates the anti-tumor function of Tconv*

In contrast to their deleterious role in autoimmunity, Tconv are currently emerging as critical actors of anti-tumor immunity. Therefore, we wondered whether our findings in the settings of EAE could be mirrored in cancer. To overcome the possible roles of NF- $\kappa$ B in CD8<sup>+</sup> T cells, we used again CD4<sup>cre-ERT2</sup> mice. Control (CD4<sup>cre-ERT2</sup>), *Rela* and *Rel*-icKO mice were transplanted with B16-OVA melanoma cells and treated with tamoxifen from D-1 to D7. Intriguingly, the ablation of c-Rel led to a significant increase in tumor volume and weight, whereas RelA deletion had no impact (Figure 6A-B). We investigated the mechanism underlying enhanced growth by spectral FACS 19 days after tumor transfer. First, we observed that the total numbers of Tconv in the dLN and



tumors were similar between strains (Figure 6C). Nevertheless, their phenotype was different in the absence of NF- $\kappa$ B. Indeed, in dLN, ablation of either *Rel* or *Rela* led to a modest but significant increase in the proportion of naïve T cells, but left the proportion of cytokine-producing cells following PMA-ionomycin restimulation unaltered (Figure 6D-E). Although impaired Tconv activation was observed in both *Rel*-icKO and *Rela*-icKO mice, only the *Rel*-icKO animals displayed enhanced tumor burden., suggesting that this limited phenotype is not at the origin of the enhanced tumor burden. In tumor tissues, however, the increase in the proportion of naïve-like Tconv was limited to *Rel*-icKO mice and was at the expense of CD44<sup>high</sup>CD62L<sup>low</sup> TEM cells (Figure 6F). This was accompanied by a significant decrease in IFN $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$  and GzmB expression, highlighting defective Tconv function *in situ* (Figure 6G). In addition, we detected a trend toward a lower proportion of cytokine-expressing CD8<sup>+</sup> T cells in tumor tissues of *Rel*-icKO mice, suggesting an impaired CD4<sup>+</sup>>CD8 help (Supplementary Figure 8A). Thus, c-Rel rather than RelA, was critical for the control of tumor growth by impacting CD4<sup>+</sup> Tconv both in dLN and tumor tissues.

To dissect the effects of c-Rel on the Tconv transcriptome, we performed scRNA-seq analysis of Tconv from control and *Rel*-icKO mice, 15 days after B16-OVA implantation. A total of 16,571 cell from tumors and dLN were successfully sequenced. As for EAE analyses, we first excluded Treg and non-T cell populations and re-clustered cells according to the tissue (Supplementary Figure 8B-C). In dLN, 4 main subsets were identified, with the vast majority of cells harboring a naïve-like phenotype (Supplementary Figure 8D-E). As expected based on FACS analyses, *Rel*-icKO mice had slightly higher proportions of naïve Tconv, at the expense of the TH1 cell cluster. This resulted in only 27 DEGs between the 2 genotypes (Supplementary Figure 8 F-H). Among tumor-infiltrating Tconv, 7 clusters were identified, including a low-quality (mtDNA<sup>high</sup>) cluster that was excluded from further analyses (Figure 6H). The naïve-like cluster (*Ccr7*, *Sell*, *S1pr1*, *Ly6c1*) was largely enriched (17% vs 5%) in *Rel*-deleted cells. In contrast subsets composed of TH1 and cytotoxic cells (*Ifng*, *Tbx21*, *Nkg7*, *Gzmb*) and of TFH and/or exhausted cells (*Pdcd1*, *Tox*, *Rgs16*, *Cd200*, *Lag3* with low expression of *Bcl6* and *Il21*) were largely impaired in the absence of c-Rel (Figure 6I-L). To understand whether this loss of differentiated cells resulted from increased apoptosis and/or decreased proliferation of *Rel*-deficient Tconv, we compared the enrichment of gene signatures related to these mechanisms in control and mutant cells, but found not differences in these parameters between genotypes (Supplementary Figure 8I). Taken together, this showed that c-Rel, rather than RelA, controlled the priming of TH1 and cytotoxic CD4<sup>+</sup> T cells required for tumor control *in vivo*, despite minimal involvement *in vitro*. To unequivocally demonstrate that

increased tumor growth in *Rel*-iKO animals relied on a Tconv-cell intrinsic role of c-Rel, we next applied a cell-transfer approach. *Rag2*-deficient mice were reconstituted with WT CD8<sup>+</sup> T cells, Tregs and B cells, as well as control or *Rel*-cKO CD4<sup>+</sup> Tconv, and subsequently transplanted with MC38 colon adenocarcinoma cells. Again, we observed a dramatic acceleration of tumor growth in animals grafted with *Rel*-deficient Tconv (Figure 6M). This was again associated with an impaired cytokine expression by Tconv in the tumor (data not shown).

As Tconv are involved in the response to checkpoint-blockade therapies, we next investigated whether c-Rel might be involved in their function in this context. Female control and *Rel*-iKO mice were transplanted with MC38 cells and subsequently treated with anti-PD-1 mAb. As for the B16-OVA model, *Rel*-ablation drove enhanced tumor growth compared to controls treated with an isotype mAb (Figure 7A). Whereas PD-1-blockade drove a dramatic reduction in tumor growth in control animals, this therapeutic effect was abolished in *Rel*-iKO mice. These experiments revealed not only that intact CD4<sup>+</sup> Tconv responses were integral to the response to anti-PD-1 mAbs, but also that c-Rel activity is a crucial factor for this beneficial effect. We therefore examined the relevance of this observation in patients with cancer. Based on our scRNA-seq data (Figure 6L) we extracted a signature of 9 genes down-regulated in *Rel*-deficient tumor Tconv possessing human orthologs (Figure 7B). Using the iATLAS database ([cri-iatlas.org](http://cri-iatlas.org)), we investigated the expression of this signature using ssGSEA in cohorts of patients prior to treatment with PD-1-blocking agents, and its impact on the clinical response. In patients with metastatic cutaneous melanoma, bladder cancer and stomach cancer, we found a statistical enrichment in the *Rel*-dependent signature in responders compared to non-responders (Figure 7C), which was associated with improved overall survival. Altogether, our data suggest that NF-κB, in particular through its c-Rel subunit, is a prime determinant of anti-tumor immunity through its role in Tconv.

## 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 those of RelA, which is ubiquitously expressed and widely accepted as a major orchestrator of gene expression profiles following immune cell stimulation. RelA was proposed to drive both *Ifng* and *Rorc* expression in mouse T cells (Balasubramani et al., 2010; Ruan et al., 2011), and recent CRISPR screening approaches unveiled its role in human Tconv

proliferation and *Il2* expression (Schmidt et al., 2022; Shifrut et al., 2018). In this study, by employing two widely used animal models of autoimmunity and cancer, we demonstrate that RelA and c-Rel have distinct functions in Tconv depending on the disease context, further advocating for studies revisiting the paradigm whereby NF- $\kappa$ B is as single entity with many roles, and instead comprises a family of transcription factors with a restricted set of functions.

These conclusions were drawn following the use of conditional KO mouse models, which, unlike germline ablations, allowed cell type-restricted ablation of each gene. This was particularly important in the context of immune responses, as NF- $\kappa$ B subunits have been identified to exert critical roles in both innate and adaptive immunity. The results presented herein question 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 cell-autonomous pathogenic TH17 profile and for the development of EAE. This result was surprising given previous literature implicating c-Rel in TH17 development and EAE pathogenesis. In vitro, both RelA and c-Rel can bind the *Rorc* promoter (Supplementary Figure 4C and (Ruan et al., 2011)), but our data suggest that RelA is in fact the prominent subunit required for its expression. Our results also imply that protection of EAE in mice with germline ablation of *Rel*, may rely on a Tconv-cell extrinsic mechanisms, such as dendritic cells or macrophages (Hilliard et al., 2002; Zhang et al., 2017).

At steady-state and in autoimmunity, RelA appeared to have a more prominent role than c-Rel in shaping the transcriptome of Tconv. This function was achieved both through direct binding to target genes and through the induction of other transcription factors such as AP-1 family members. This establishes RelA as an apex regulator of gene expression in Tconv. However, c-Rel, but not RelA, was required for the anti-tumor function of Tconv. This critical observation not only reinforces the role of CD4<sup>+</sup> T cells in cancer immunity, but also unravels a selective molecular mechanism orchestrating their accumulation and function in the tumor bed. Many different roles have been attributed to Tconv in limiting tumor growth, most notably the expression of inflammatory cytokines such as IFN $\gamma$ , a help to CD8<sup>+</sup> T cells, and a direct cytotoxicity against tumor cells through the secretion of perforin and granzymes. Strikingly, c-Rel seems to be involved in all these mechanisms and thus could be proposed as a multi-factorial regulator of anti-tumor immunity. Because Tconv 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 will be interesting to investigate the role of c-Rel in the clinical efficacy of these drugs. Our analyses of public

transcriptomic data, suggest that c-Rel activity associates with good prognosis for the overall survival of cancer 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 activation in a similar manner, i.e., by controlling the transition from naïve/early activated to effector (TH1, TH17 or Tc) T cells in both dLN and 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, demonstrated by us and others (Levy et al., 2021; Oh et al., 2017), resulted from ChIP-Seq experiments conducted *in vitro*, which prevent drawing definitive conclusions *in vivo*. Moreover, systematic analyses of NF- $\kappa$ B subunits binding in lymphoma cells lines revealed similar consensus binding sequences (de Oliveira et al., 2016; Zhao et al., 2014). Thus, it is unlikely that a simple separation of DNA binding by RelA and c-Rel could explain this phenotypic discrepancy, although there is still a rationale for additional investigation *in vivo*. Moreover, it remains possible that the dimer composition and/or their association to other transcriptional regulators, could impact the preferred binding motif, as shown in tumor cell lines (Wong et al., 2011). Another possibility could be the selective activation of RelA and c-Rel in the CNS and tumor-infiltrating Tconv, respectively. This would rely on differential types, duration and strength of stimulation of surface receptors (TCR, CD28, TNFR superfamily members and other cytokine receptors) that would drive the preferential translocation and DNA-binding of a given subunit, or the association with other transcription factors. This concept of ‘activation modules’ has been elegantly approached by Hoffmann and colleagues, who showed, in primary macrophages, that RelA activation and expression of target genes were dependent on such dynamic features (Adelaja et al., 2021; Cheng et al., 2021). Added to the complexity of dimer composition and affinity for target genes (Brignall et al., 2019), the specificity of NF- $\kappa$ B subunits in inflammation likely relies on a series of different parameters. Such analyses conducted in Tconv, concomitantly for RelA and c-Rel, would undoubtedly provide mechanistic insights into the distinct regulation of disease outcomes by NF- $\kappa$ B subunits.

In addition to these biological insights, our observations have strong therapeutic implications. Extensive literature highlighting the deleterious roles of (canonical) NF- $\kappa$ B in autoimmunity and cancer, has led to the development of inhibitors of upstream kinases of the pathway, in particular IKK inhibitors (Gilmore and Herscovitch, 2006; Lalle et al., 2021b). Nevertheless, despite promising pre-clinical results in murine

models of EAE and transplanted melanoma among others, very few compounds progressed to advanced clinical trials, because of lack of efficacy and/or high toxicity (Baud and Karin, 2009). One may reason that these failures may in part be due to the absence of selective targeting of specific NF- $\kappa$ B subunits. Our data may thus pave the way toward more potent agents. In autoimmunity, the time-controlled inhibition of RelA appears as a promising solution, at least in the early stages of the disease or in remitting phases of relapsing/remitting MS. Although only a few chemical inhibitors have so far been described, other approaches such a siRNA targeting *Rela*, may be effective (Yan et al., 2016). 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 restricts tumor growth in mouse models, by targeting the activity of Treg cells and/or myeloid derived suppressor cells (Grinberg-Bleyer et al., 2017; Li et al., 2020). Our results suggest an alternative therapeutic approach consisting in *activating* c-Rel in Tconv. This could for instance be achieved by using gene-editing cellular products. A proof-of-concept approach using TCR-transgenic CD8<sup>+</sup> T cells expressing constitutively active IKK $\beta$ , or deficient for A20, in murine cancer, provided a rationale for such strategies (Evaristo et al., 2016; Giordano et al., 2014). Similarly, a gain-of-function screening approach recently highlighted that ectopic expression of lymphotoxin-beta receptor in CAR-T cells improved tumor control in an NF- $\kappa$ B-dependent manner (Legut et al., 2022). It would therefore be 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 (Seo et al., 2021).

## Material and methods

### Mice

*Rel*- and *Rela*-Floxed mice were previously described (Heise et al., 2014). CD4<sup>cre</sup> (Tg(CD4-cre)<sup>1Cw1</sup>) and CD4<sup>cre-ERT2</sup> (B6(129X1)-Tg(Cd4-cre/ERT2)<sup>11Gnri/J</sup>) were purchased from the Jackson Laboratory and backcrossed to C57Bl/6J at least 10 times. *Rag2*<sup>-/-</sup> and C57Bl/6 CD45.1 (*Ptprca*<sup>a</sup> *Pepcb*<sup>b</sup> /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 Ethics Evaluation Committee (committee C2A15)

(Protocols CLB-2018052217411370 and CLB-2019061914498113). The authors complied with the ARRIVE guidelines.

### **Human subjects**

Blood samples from healthy volunteers were obtained through the Etablissement Français du Sang (EFS). Clinical and RNA-seq data from cancer patients were publicly available (*cri-iatlas.org*)

### **Cell lines, transplantation and immunotherapy.**

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) in B16F10 cells (American Tissue Culture Collection (ATCC)), followed by selection in medium containing 500µg/mL Neomycin (Sigma) and validation by PCR and functional assays. Cell lines were maintained in DMEM (Thermo Fisher)+10% Fetal Bovine Serum (FBS, Thermo Fisher).  $2 \times 10^5$  MC38 or  $3.5 \times 10^5$  B16F10-OVA cells diluted in 50 µL 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:  $\text{Width}^2 \times \text{Length}$ . Anti-PD-1 (RMP1-14) and rat isotype control mAbs were obtained from BioXCell. Mice received intraperitoneal injections of 200 µg of mAb diluted in PBS1X.

### **EAE**

Mice were injected subcutaneously in each flank with 50 µg of MOG<sub>35-55</sub> peptide (Smart Biosciences SB023) emulsified in 100 µL of complete Freund adjuvant (Sigma-Aldrich) supplemented with 243 µg 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.

### **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<sup>cre</sup>, CD4<sup>cre</sup> *Rela*<sup>flox/flox</sup> or CD4<sup>cre</sup> *Rela*<sup>flox/flox</sup>). Recipient mice were sublethally irradiated (7 Gy) and transplanted intravenously (retro orbital sinus) with  $10 \times 10^6$  bone marrow cells. Mice

were given Neomycin (200 ng/mL) in drinking water for ten days. Tissues were harvested 8 weeks after reconstitution for subsequent analyses.

### **T/B-cell reconstitution of *Rag2*<sup>-/-</sup> 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<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit, mouse (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's protocol together with Anti CD25-biotin antibody (7D4, BD) to deplete Treg cells.

Tregs and B cells were isolated through positive selection, by labeling with anti CD25-biotin Ab and anti-CD19-biotin Ab, respectively, followed by incubation with anti-biotin microbeads (Miltenyi Biotec). CD8<sup>+</sup> T cells were isolated using the MojoSort™ Mouse CD8 T Cell Isolation Kit (Biolegend) according to the manufacturer's protocol. 2.5x10<sup>6</sup> Tconv, 0.6x10<sup>6</sup> Treg, 2x10<sup>6</sup> CD8<sup>+</sup> T cells and 2.5x10<sup>6</sup> B cells were injected intravenously to anesthetized *Rag2*<sup>-/-</sup> mice. MC-38 cells were transplanted 7 days later.

### **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.

For EAE experiments, 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. 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 2,500 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 2,500 rpm for 20 min at RT. Mononuclear cells were collected from the interface of the 44:67% Percoll gradient, washed in complete RPMI and enumerated.

### **NF- $\kappa$ B 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<sup>+</sup> T cells were isolated using the EasySep Human Naive CD4 T cell Isolation kit II (Stemcell) according to the manufacturer protocol. Cells were enumerated and resuspended at 1x10<sup>6</sup> cells/mL in complete RPMI 1640 W/HEPES W/GLUTAMAX-I (Thermo Fisher, Supplemented with 10% FBS; Penicillin/Streptomycin; Non-Essential Amino Acids; Sodium Pyruvate and  $\beta$ -Mercaptoethanol) with human IL-2 (Miltenyi, 25U/mL) and Dynabeads CD3/CD28 (Thermo Fisher, 1 bead:4 T cells). Cells were cultured for 3 days. Ribonucleoprotein (RNP) complexes were prepared by mixing crRNA (IDT), ATTO550-tracrRNA (IDT), CAS9 (Truecut v2 cas9, Thermo Fisher) and electroporation enhancers (IDT) at equimolar ratio in a final solution at 7.5 nmol/mL. crRNA and tracrRNA were incubated 5 min at 95°C then 15 min at 37°C. Then CAS9 was added and solutions were incubated for 15 min at 37°C. Finally, electroporation enhancer was added to the mix. Dynabeads were removed, and cells were washed and resuspended at 14x10<sup>6</sup> cells/mL in Buffer T (Neon transfection system, Thermo Fisher). Cells and RNP complexes were mixed so that 1.3x10<sup>6</sup> cells could be electroporated in a 100  $\mu$ L 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 (20 U/mL) and Dynabeads CD3/CD28 (1 bead:10 T cells). Cells were cultured for 3 days, washed and stained with DAPI in FACS Buffer. DAPI<sup>-</sup> ATTO550<sup>+</sup> cells were sorted on a FACS ARIA II system and used for subsequent assays.

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

Naïve CD4<sup>+</sup> T cells were negatively isolated using the Naïve CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec). Cells were labeled using the CellTrace Violet Cell Proliferation Kit (CTV; Thermo Fisher Scientific). 3.10<sup>4</sup> cells were stimulated with 6.10<sup>4</sup> T cell-depleted mitomycin C-treated Ly5.1 splenocytes, 2  $\mu$ g/mL soluble anti-CD3 $\epsilon$  (clone 145-2C11, BioXcell), in complete IMDM (Thermo Fisher, 10% FBS, 25,000 U Penicillin/Streptomycin, 10 mM sodium pyruvate, non-essential amino acids and 50  $\mu$ M 2-Mercaptoethanol). The culture medium was supplemented as follows: TH1: 20 ng/mL mL-12 (Peprotech), 10 ng/mL mL-2 (Miltenyi), 2  $\mu$ g/mL anti-mouse IL-4 (clone 11B11 BD Biosciences); TH2: 30 ng/mL mL-4 (Peprotech), 2  $\mu$ g/mL anti-mouse IFN $\gamma$  (clone XMG1.2 BD Biosciences), 2  $\mu$ g/mL anti-mouse IL-12 (clone C17.8 BD Biosciences);



10 ng/mL mL-2; TH17: 1 ng/mL hTGF- $\beta$ , 20 ng/mL mL-6 (Peprotech), 2  $\mu$ g/mL anti-mouse IFN $\gamma$ , 2  $\mu$ g/mL anti-mouse IL-4, ; pathogenic TH17 : same as TH17 with 5 ng/mL mL-1 $\beta$  (Peprotech); 5 ng/mL hIL-23 (Peprotech) and 2  $\mu$ g/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.

### **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  $\mu$ g/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  $\mu$ L 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 GFP fluorescence was analyzed, after cell surface labeling, cells were fixed by using 2% paraformaldehyde (MPbio) for 30 min (instead of the eBioscience Foxp3/ Transcription Factor Staining Buffer Set) and then washed twice with wash buffer from the eBioscience Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set. Then for intracellular labeling, 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 labeling or wash buffer if intracellular labeling).

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 (Cytek). Data were analyzed with FlowJO software V10.7.2 (Tree Star, [www.flowjo.com](http://www.flowjo.com)).

### **Immunofluorescence assay and data analysis**

Mice were perfused with 20mL PBS1X, then with 10% formalin. Spinal cords were fixed in 4% formalin for 24h and then kept in 70% EtOH. 25 $\mu$ m-thick slices from the thoracic-lumbar spinal cords were generated using a sliding microtome with a 100 $\mu$ m interval between each section.

Slices were first incubated for 40min at RT with a blocking solution made of PBS-Triton 0.1% (X100 Sigma-Aldrich), 5% BSA (A3294 Sigma-Aldrich), 5% goat serum (S-1000-20 Vector Laboratories), 3% mouse serum. Subsequently, the slices were incubated overnight at 4°C under mild agitation with the primary chick anti-mouse Iba1 antibody (234 006 Synaptic System) diluted 1:300 in PBS-Triton 0.01%-0.5% NGS-0.3% mouse serum-0.5% BSA. The next day, slices were washed (3 times for 5min) with PBS-Triton 0.1% and incubated for 2h at RT under mild agitation with the secondary antibody Alexa488 goat anti-chicken IgG (A11039 Invitrogen) diluted 1:500 in PBS-Triton 0.01%. Slices were then washed and incubated for 20min at RT under mild agitation with Fluoromyelin (F34652 Invitrogen) diluted 1:300 in PBS-Triton 0.01%. After washing, slices were incubated with DAPI (28718-90-3 Merk) diluted 1:2000 in PBS and mounted in Fluoromount medium (00-4958-02) on microscope slides.

7-20 spinal cord slices per mouse were acquired using a 3DHistec Panoramic 250 slide scanner (3DHistec Ltd). Quantification of Iba1 and Fluoromyelin staining was performed using the QuPath v0.4.3 software. Cross section perimeters were first outlined basing on the DAPI signal to obtain the total areas for each section. Then, for Iba1 staining, the same threshold for positive signal detection was applied to all the slides. The threshold was set with a moderate resolution (2.60  $\mu\text{m}/\text{px}$ ), using a gaussian prefilter in order to calculate the surface occupied by Iba1<sup>+</sup> signal for each slice. A similar procedure was performed to calculate Fluoromyelin staining.

### **Bulk RNA-sequencing and analyses**

RNA from 1-2M Tconv 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 (GSE132476) 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 occurrences of a target gene and extract target gene names without duplicate.

### **Single-cell RNA-sequencing and analyses**

CD4<sup>+</sup> T cells were FACS-sorted (BD ARIA 3) from tumors, brains and draining lymph nodes. 3,000-4,000 cells/experimental group, pooled from independent mice, were

encapsulated using the Chromium iX (10x Genomics, Pleasanton, CA) on Chip G according to manufacturer instructions. Libraries were prepared using the Chromium Single Cell 3' Library v3.1 kit following 10X Genomics recommendations and sequenced on an Illumina NovaSeq 6000. Reads were demultiplexed and aligned with Cell Ranger software (10X Genomics). Expression data were computed from fastq files with Cell Ranger (v6.1.1 for CNS samples and v7.0.0 for TIL samples). Each time the mouse reference genome was used (refdata-gex-mm10-2020-A). Data were loaded into a Seurat object by keeping cells with more than 100 detected genes and genes found in more than 2 cells. Cells with less than 200 or more than 5,000 (cancer) or 6,000 (EAE) detected genes, or less than 5% (EAE) or 10% (cancer) of reads from mitochondrial genes were filtered out. For the TIL samples we removed cells with less than 200 and more than 5,000 expressed genes and less than 5% of reads from mitochondrial genes. Data were then normalized with the *LogNormalize* function from Seurat and scaled. We selected the top 1,000 most variable genes using the *FindVariableFeatures* function and the *vst* option. All cells were annotated with the ProjectTILS package (v3.0.0) and the *make\_projection* function. We removed Tregs as cells annotated as such by ProjectTILS and presenting a *Foxp3* expression >0. Next, dimensionality reduction was performed using PCA, retaining 10 axes for EAE data and 40 for cancer data. Each dataset was then clustered using the Leiden algorithm with a resolution of 0.8 for EAE and 0.5 for cancer. Marker genes were extracted with the *FindAllMarkers* function from Seurat, keeping only positive genes with a minimum fraction of expressing cells of 0.5. Enriched pathways were computed with either the *EnrichR* or the *UCell* packages. Differentially expressed genes (DEGs) between groups were identified using the *FindMarkers* function from Seurat, employing the MAST algorithm. For creating the c-Rel-dependent Tconv gene signature, only down-regulated genes (positively regulated by c-Rel) were considered. Genes were sorted in descending order of adjusted p-values and the first top 10 genes were used in the signature (excluding *Rel* itself). Mouse genes symbols were converted to human symbols using R package *biomartR* (v 2.52.0). Immune Checkpoint Inhibitors (ICI) studies with RNAseq data were retrieved from CRI iAtlas portal (<https://isb-cgc.shinyapps.io/iatlas/>) for several cancer types. In order to evaluate the prognosis potential of our homemade signature, a single-sample Gene Set Enrichment Analyses (ssGSEA) score was calculated using *in house* function. For survival analyses, patients were stratified in groups based on median ssGSEA score. Kaplan-Meier curves were created using R package *survival* (v 3.4-0).

## Western blot

Total lysates were extracted using RIPA buffer and protease inhibitors (Sigma) with SDS. Protein concentration was quantified using BCA assay (Thermo Fisher). 20 µg protein extracts were ran in 10% polyacrylamide gels (BioRad) and transferred onto PVDF membranes using a TransBlot Turbo apparatus (BioRad). Membranes were first blocked with TBS-T + milk 5% for 45 min at room temperature, then incubated overnight at 4°C with the antibodies of interest diluted in TBS-T + milk 2.5%. The next morning, membranes were washed 3 times with TBS-T for 10 min and incubated with secondary antibodies diluted in TBS-T + milk 2.5% for 1 h at room temperature. Finally, membranes were washed 4 times with TBS-T for 10 min, soaked in Luminata Forte or Luminata Classico (Merck Millipore) buffer for 1 min 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/>). For FACS data and tumor weights, two-tailed Mann–Whitney (when 2 groups) and Kruskal-Wallis (when 3 groups) tests were used to calculate statistical significance, unless mentioned otherwise. For tumor volumes and EAE score analyses, 2-way ANOVA followed by Bonferroni post-test (when more than 2 groups), and two-tailed Mann-Whitney test (when only 2 groups) were used.

### **Data Availability**

Sequencing data have been deposited to the Gene Expression Omnibus Database (GSE239704). All other raw data are available upon reasonable request addressed to [yenkel.grinberg-bleyer@inserm.fr](mailto:yenkel.grinberg-bleyer@inserm.fr)

### **Acknowledgements**

We are grateful to all members of the team for their technical help and constructive discussions; 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 (ANR-10-LABX-0061) and the ARSEP Foundation, to Y.G.B.. A.V. was supported by a postdoctoral fellowship from the ARC Foundation. The authors declare no competing financial interests.

### **Figure legends**

**Figure 1. Mouse Tconv homeostasis and transcriptome are predominantly controlled by NF-κB RelA.** (A) Schematic representation of the experimental 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<sup>high</sup> and Ki67<sup>+</sup> in CD45.2<sup>+</sup>TCRb<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>Foxp3<sup>-</sup> Tconv. (D) Spleen cells were restimulated with PMA-ionomycin; proportions of cytokine expression by CD45.2<sup>+</sup> Tconv are shown. (E-H) RNA-seq analysis of CD45.2<sup>+</sup> Tconv sorted from spleen and LN and stimulated for 4 hours with anti-CD3/CD28 and IL-2. (E) Volcano Plot of DEGs (log<sub>2</sub> fold change >0.58, p < 0.005) (F) Venn partition diagram showing the overlap between RelA and c-Rel-regulated DEGs. (G) Heatmaps of selected DEGs. (H) KEGG enrichment analysis of *Rela*-cKO DEGs. (I-J) RelA DNA-binding analysis in WT Tconv (Ref Oh et al. 2017) stimulated or not with anti-CD3/CD28 for 4 hours (I) Heatmap of DEGs 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 compared to publicly available ChIP-seq data of BATF and c-Jun. The heatmap represents DEG in *Rela*-cKO cells that might be regulated by these proteins. FACS data are shown as mean ± SEM of 2 experiments; each dot represents a mouse; Kruskal-Wallis tests were used. RNA-seq data are from 4 independent samples.

**Figure 2: Separate roles of RELA and c-REL in human Tconv.** (A) Experimental protocol (B) Western blot validation of gene editing efficacy after ATTO550<sup>+</sup> live cell sorting (C-E) RNA-seq analysis following a 4 h stimulation with anti CD3/CD28 and IL-2. (C) Heatmap showing expression of all 384 DEGs (log<sub>2</sub> fold change >0.58, p < 0.005). (D) Volcano Plot of DEGs for *REL* gene-edited vs. control (top) and *RELA* gene-edited vs. control (bottom). (E) Heatmaps of selected DEGs. (F-G) Gene-edited Tconv 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 (F) and cumulative data from 3-4 donors (G) are shown. Each KO sample is normalized against control sample from the same donor. Multiple paired T-tests were used. Western blot shows 1 representative of 2 experiments. RNA-seq data are from 4 independent donors.

**Figure 3: The roles of RelA and c-Rel in Thelper polarization *in vitro*.** Naïve Tconv from control, *Rela*-cKO and *Rel*-cKO were isolated and cultured with or without IL-2 (A), or under Th1 (B), Th2 (C), or Th17 (D) for 4 days as detailed in the Methods, and their phenotype was analyzed by FACS after PMA-ionomycin restimulation. Representative (left panels) and mean +/- SEM of >3 experiments is shown; multiple paired t-tests were used.

**Figure 4. RelA but not c-Rel, is required for Tconv pathogenic function in EAE.** EAE was induced in control, *Rela*-cKO and *Rel*-cKO mice in an SOPF animal facility (CRCL, Lyon, France). (A) Disease score curves (n = 14-28 mice/group). (B) Disease

incidence. **(C)** Maximal clinical score. **(D)** Sections of spinal cords at D15, stained for Fluoromyelin. Representative images (left) and proportion of myelin loss in the dorsal horn from 35 to 59 cross sections (right) are shown. **(E)** Enumeration of CD45<sup>+</sup>TCR- $\beta$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> cells at D15 in draining LN (dLN), brain and spinal cord (S.C.) **(F-L)** CD4<sup>+</sup> T cells were sorted from the CNS at D15 and analyzed by scRNA-seq. **(F)** UMAP representation of Seurat clusters (top), cluster identification and expression of selected cluster-defining genes (bottom) in Tconv. **(G)** Cell distribution between genotypes (top) and expression of selected markers projected on UMAP (bottom). **(H)** TH17p signature projection on UMAP. **(I)** Distribution of the 8 clusters in each genotype. **(J)** Volcano Plot representation of DEGs (blue: down-regulated, red: up-regulated, p-adj cutoff<0.05). **(K)** Venn diagram showing overlap of DEGs. **(L)** Number of DEGs in each cluster. **(M)** Bubble plot showing expression of selected genes in all Tconv and in the TH17p cluster. **(N-O)** CNS-infiltrating Tconv were analyzed by FACS 20 days after disease induction, directly *ex vivo* (N) or after PMA-ionomycin restimulation (O). EAE scores and FACS data are shown as mean +/- SEM of at least 3 independent experiments; each dot represents a mouse. scRNA-seq was done once with 4 pooled mice/sample. 2-way ANOVA followed by Bonferroni's post-test (disease scores), Log-rank (Mantel-Cox) (disease incidence) and Kruskal-Wallis tests (maximal scores and FACS data) were used.

**Figure 5. RelA controls the priming phase but not the progression of EAE. (A-C)** EAE was induced in control, *Rela*-cKO and *Rel*-cKO mice. **(A)** Proportion of MOG<sub>33-55</sub>-specific Tconv (left) and their expression of CD44 in dLN over time. **(C)** dLN cells were restimulated for 24 h with the MOG<sup>33-55</sup> peptide and their expression of IL-17A and GM-CSF was assessed by FACS. Representative dot plots (left) and cumulative data (right) are shown. **(C)** EAE was induced in control and *Rela*-cKO mice treated with tamoxifen from D-18 to D-12 (left, gray box) or from D7 to D13 (right). Clinical scores are shown (n = 7-13 mice/group). Data are shown as mean +/- SEM of 2 experiments; each dot represents a mouse. Mann-Whitney tests (FACS data) and 2-way ANOVA followed by Bonferroni's post-test (clinical scores) were used.

**Figure 6. c-Rel orchestrates Tconv function in the tumor microenvironment. (A-M).** Ctrl, *Rela*-icKO and *Rel*-icKO mice were treated with tamoxifen from D-1 to D7 (gray box) and transplanted with B16-OVA melanoma cells. **(A)** Tumor volume over time (n = 7-19/group). **(B)** Tumor weight at D19. **(C-G)** FACS analysis at D19 in dLN (C-E) and tumors (C, F-G) without (C, D, F) or with (E, G) PMA-ionomycin restimulation. The proportion of CD45<sup>+</sup>TCR $\beta$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>Foxp3<sup>-</sup> Tconv among total live cells and their expression of indicated markers are shown. **(H-L)** CD4<sup>+</sup> T cells were

sorted from the tumor at D15 and analyzed by scRNA-seq. **(H)** UMAP representation of Seurat clusters (top), cluster identification and expression of selected cluster-defining genes in Tconv (bottom). **(I)** Cell distribution between genotypes projected on UMAP. **(J)** Distribution of the 8 clusters in each genotype. **(K)** Volcano Plot representation of DEGs (blue: down-regulated, red: up-regulated, p-adj cutoff<0.05). **(L)** Bubble plot showing expression of selected genes in all Tconv. **(M)** *Rag2*<sup>-/-</sup> mice were reconstituted with T and B cells and transplanted with MC-38 cells. Tumor growth (n = 7/group) is shown. Tumor growth and FACS data are shown as mean±SEM from 2-4 independent experiments; each dot represents a mouse. scRNA-seq was done once with 5 pooled mice/sample. 2-way ANOVA followed by Bonferroni's post-test (tumor volumes), and Kruskal-Wallis tests (tumor weight and FACS data) were used.

**Figure 7. c-Rel is required for the response to anti-PD-1 therapy.** **(A)** Ctrl and *Rel*-iKO mice were treated with tamoxifen as indicated (gray box), transplanted with MC38 colon adenocarcinoma cells and treated with anti-PD1 at D7,9 and 11. Tumor volume over time (mean ± SEM from 3 experiments with 7-9 mice/group) is shown. **(B)** Identification of a *Rel*-dependent gene signature as described in the Methods. **(C)** ssGSEA scores (left panels) and Kaplan-Meier overall survival (OS) curves with the number of patients at risk shown below (right panels) in cohorts of patients with cutaneous melanoma (SKCM), bladder carcinoma (BLCA) and stomach adenocarcinoma (STAD). 2-way ANOVA followed by Bonferroni's post-test (tumor volumes), Mann-Whitney tests (ssGSEA scores) and Log-rank tests (survival curves) were used.

**Supplementary Figure 1: Single NF-κB subunit ablation does not impact Tconv 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<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. **(C)** Quantification of live Tregs **(D)** Quantification of DN, DP and SP CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> T cells among total live cells. **(G)** **(H)** Numbers of live CD45.2<sup>+</sup>TCR-β<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg cells. FACS data are shown as mean ± SEM of 2 experiments; each dot represents a mouse; Kruskal-Wallis tests were used.

**Supplementary Figure 2: Mouse Tconv homeostasis and transcriptome are predominantly controlled by NF-κB RelA.** **(A-B)** FACS analysis of mixed bone-marrow chimera mice from Figure 1. **(A)** Proportion of FoxP3<sup>+</sup> Treg among CD45.2<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> cells in secondary lymphoid organs. **(B)** Proportion of naive (CD44<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>)

TCM: T Central Memory (CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) and TEM: T Effector Memory (CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>) among CD45.2<sup>+</sup> Tconv in spleen. Data are shown as mean ± SEM of 2 experiments; each dot represents a mouse; Kruskal-Wallis tests were used. **(C-E)** Analysis of RNA-seq data from Figure 1. **(C)** Correspondence analysis of mRNA counts of all the genes of WT (blue points), *Rel-cKO* (orange squares) and *RelA-KO* (pink triangles) murine CD4<sup>+</sup> Tconv before differential expression analysis. **(D)** GSEA Enrichment plot in *Rela-cKO* dataset showing decreased expression of known NF-κB-dependent genes. **(E)** Strategy for the identification of indirect transcriptional regulators. **(F)** Expression of the 34 master regulator candidates.

**Supplementary Figure 3: RNA-seq analysis of human gene-edited Tconv.** **(A)** Venn partition diagram showing the overlap between *RelA* and *c-Rel*-regulated DEGs. (log<sub>2</sub> fold change >0.58, p < 0.005) **(B)** KEGG enrichment analysis of *RELA-KO* DEGs. **(C)** Expression of the 378 human *RELA-KO* DEGs in the mouse dataset. **(D)** KEGG enrichment analysis of the 80 common downregulated genes in mouse and human *RELA-KO* Tconv.

**Supplementary Figure 4: RelA binding to Thelper signature loci.** **(A-C)** *RelA* ChIP-Seq data from Oh et al. 2017, were visualized using Integrative Genome Viewer. **(D)** Naïve Tconv from control and *Rela-cKO* mice were isolated and cultured without (Unstim) or with stimulation, under no cytokines (No CK) or TH polarization conditions for 24 h. The proportion of CD44<sup>hi</sup> cells was assessed by FACS. Mean±/− SEM is shown, each dot represents an individual experiment. Multiple Mann-Whitney tests were used; *n.s.* = non-significant

**Supplementary Figure 5: RelA-ablation prevents myeloid cell activation in EAE.** EAE was induced in control, *Rela-cKO* and *Rel-cKO* mice. **(A-D)** At D21, MHC-II expression was measured by FACS in myeloid cells. **(A)** CD45<sup>int</sup>CD11b<sup>+</sup> microglia cells, **(B)** CD45<sup>high</sup>TCRβ<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup> dendritic cells, **(C)** CD45<sup>high</sup>TCRβ<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup>Ly6C<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup> monocytes and **(D)** CD45<sup>high</sup>TCRβ<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> macrophages. Mean±/− SEM are shown, each dot represents an individual mouse from 2 independent experiments. **(E)** Sections of spinal cords at D15, stained for Iba-1. Representative images (left) and cumulative proportion of Iba-1<sup>+</sup> areas from 35 to 59 cross sections (right) are shown as box and whiskers plot (min to max). Kruskal-Wallis (FACS) and one-way ANOVA test (IF) were used.



**Supplementary Figure 6: Minor impact of RelA ablation on dLN- Tconv at the peak of EAE.** EAE was induced in control, *Rela*-cKO and *Rel*-cKO mice. **(A-F)** dLN and CNS-sorted CD4<sup>+</sup> T cells were analyzed by scRNA-seq as in Figure 4. **(A)** UMAP projection of total CD4<sup>+</sup> T cells in each tissue. **(B)** UMAP projection and Seurat clustering of dLN-Tconv upon removal of Treg cells. **(C)** Expression of selected cluster-defining markers in dLN **(D)** Distribution of the 8 clusters in each genotype in dLN. **(E)** Volcano Plot representation of DEGs in dLN (blue: down-regulated, red: up-regulated, p-adj cutoff<0.05). **(F)** Expression of different TH17 GSEA signatures in CNS-infiltrating Tconv. **(G)** dLN- Tconv were analyzed by FACS 20 days after disease induction, after PMA-ionomycin restimulation. Data are shown as mean +/- SEM of at least 3 independent experiments; each dot represents a mouse. Kruskal-Wallis tests were used.

**Supplementary Figure 7: The role of RelA in Tconv pathogenicity.** **(A)** EAE was induced in control and CD8<sup>cre</sup>*Rela*<sup>F/F</sup> mice; clinical scores are shown as mean +/- SEM of 1 experiment with >4 mice/group. Data shown as mean +/- SEM, are from 1 out of 2 experiments. Mann-Whitney tests were used. **(B)** Tamoxifen was administered to control and *Rela*-iKO mice as in Figure 5C; GFP expression in LN Tconv and Treg cells was analyzed by FACS 7 days after tamoxifen termination.

**Supplementary Figure 8: scRNA-seq analysis of Tconv in dLN and tumors.** Ctrl, *Rela*-iKO and *Rel*-iKO mice were treated with tamoxifen from D1 to D7 and transplanted with B16-OVA melanoma cells as in Figure 6. **(A)** FACS analysis of tumor-infiltrating CD8<sup>+</sup> T cells as D19 following PMA-ionomycin stimulation. Data are shown as mean ± SEM of 2 experiments; each dot represents a mouse; Kruskal-Wallis tests were used. **(B-I)** scRNAseq analysis of dLN and tumor CD4<sup>+</sup> T cells. **(B, C)** UMAP projection of total CD4<sup>+</sup> T cells in each tissue. **(D)** UMAP projection and Seurat clustering of dLN-Tconv upon removal of Treg cells. **(E)** Expression of selected cluster-defining markers in dLN **(F)** Global distribution of Ctrl and *Rel*-deficient dLN-Tconv on UMAP. **(G)** Distribution of the 4 clusters in each genotype in dLN. **(H)** Volcano Plot representation of DEGs in dLN (blue: down-regulated, red: up-regulated, p-adj cutoff<0.05). **(I)** Expression of different GSEA signatures related to apoptosis and proliferation, in tumor-infiltrating Tconv.

**Supplementary Table 1: List of FACS (top) and WB antibodies used in this study**

*Contibution : Guilhem Lalle a majoritairement fait la partie état basal et cancer et j'ai fait la partie auto-immunité et differenciation des Thelper*

- Adelaja, A., B. Taylor, K.M. Sheu, Y. Liu, S. Luecke, and A. Hoffmann. 2021. Six distinct NFkappaB signaling codons convey discrete information to distinguish stimuli and enable appropriate macrophage responses. *Immunity* 54:916-930 e917.
- Balasubramani, A., Y. Shibata, G.E. Crawford, A.S. Baldwin, R.D. Hatton, and C.T. Weaver. 2010. Modular Utilization of Distal cis-Regulatory Elements Controls Ifng Gene Expression in T Cells Activated by Distinct Stimuli. *Immunity* 33:35-47.
- Barnes, S.E., Y. Wang, L. Chen, L.L. Molinero, T.F. Gajewski, C. Evaristo, and M.-L. Alegre. 2015a. T cell-NF- $\kappa$ B activation is required for tumor control in vivo. *Journal for immunotherapy of cancer* 3:1.
- Barnes, S.E., Y. Wang, L. Chen, L.L. Molinero, T.F. Gajewski, C. Evaristo, and M.L. Alegre. 2015b. T cell-NF-kappaB activation is required for tumor control in vivo. *Journal for immunotherapy of cancer* 3:1.
- Baud, V., and M. Karin. 2009. Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nature reviews. Drug discovery* 8:33-40.
- Beaussant-Cohen, S., F. Jaber, M.J. Massaad, S. Weeks, J. Jones, M.F. Alosaimi, J. Wallace, W. Al-Herz, R.S. Geha, and J. Chou. 2019. Combined immunodeficiency in a patient with c-Rel deficiency. *The Journal of allergy and clinical immunology* 144:606-608.e604.
- Beg, A.A., W.C. Sha, R.T. Bronson, S. Ghosh, and D. Baltimore. 1995. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature* 376:167-170.
- Betz, B.C., K.L. Jordan-Williams, C. Wang, S.G. Kang, J. Liao, M.R. Logan, C.H. Kim, and E.J. Taparowsky. 2010. Batf coordinates multiple aspects of B and T cell function required for normal antibody responses. *The Journal of experimental medicine* 207:933-942.
- Borst, J., T. Ahrends, N. Babala, C.J.M. Melief, and W. Kastenmuller. 2018. CD4(+) T cell help in cancer immunology and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 18:635-647.
- Brignall, R., A.T. Moody, S. Mathew, and S. Gaudet. 2019. Considering Abundance, Affinity, and Binding Site Availability in the NF-kappaB Target Selection Puzzle. *Front Immunol* 10:609.
- Chen, G., K. Hardy, E. Pagler, L. Ma, S. Lee, S. Gerondakis, S. Daley, and M.F. Shannon. 2011. The NF- $\kappa$ B Transcription Factor c-Rel Is Required for Th17 Effector Cell Development in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Immunology* 187:4483-4491.
- Cheng, Q.J., S. Ohta, K.M. Sheu, R. Spreafico, A. Adelaja, B. Taylor, and A. Hoffmann. 2021. NF-kappaB dynamics determine the stimulus specificity of epigenomic reprogramming in macrophages. *Science* 372:1349-1353.
- Christophersen, A., E.G. Lund, O. Snir, E. Sola, C. Kanduri, S. Dahal-Koirala, S. Zuhlke, O. Molberg, P.J. Utz, M. Rohani-Pichavant, J.F. Simard, C.L. Dekker, K.E.A. Lundin, L.M. Sollid, and M.M. Davis.

2019. Distinct phenotype of CD4(+) T cells driving celiac disease identified in multiple autoimmune conditions. *Nature medicine* 25:734-737.
- Clavijo, P.E., and K.A. Frauwirth. 2012. Anergic CD8+ T Lymphocytes Have Impaired NF- $\kappa$ B Activation with Defects in p65 Phosphorylation and Acetylation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 188:1213-1221.
- Codarri, L., G. Gyulveszi, V. Tosevski, L. Hesske, A. Fontana, L. Magnenat, T. Suter, and B. Becher. 2011. ROR $\gamma$  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.
- Cohen, M., A. Giladi, O. Barboy, P. Hamon, B. Li, M. Zada, A. Gurevich-Shapiro, C.G. Beccaria, E. David, B.B. Maier, M. Buckup, I. Kamer, A. Deczkowska, J. Le Berichel, J. Bar, M. Iannacone, A. Tanay, M. Merad, and I. Amit. 2022. The interaction of CD4(+) helper T cells with dendritic cells shapes the tumor microenvironment and immune checkpoint blockade response. *Nat Cancer* 3:303-317.
- Croxford, A.L., M. Lanzinger, F.J. Hartmann, B. Schreiner, F. Mair, P. Pelczar, B.E. Clausen, S. Jung, M. Greter, and B. Becher. 2015. The Cytokine GM-CSF Drives the Inflammatory Signature of CCR2+ Monocytes and Licenses Autoimmunity. *Immunity* 43:502-514.
- de Oliveira, K.A., E. Kaergel, M. Heinig, J.F. Fontaine, G. Patone, E.M. Muro, S. Mathas, M. Hummel, M.A. Andrade-Navarro, N. Hubner, and C. Scheidereit. 2016. A roadmap of constitutive NF- $\kappa$ B activity in Hodgkin lymphoma: Dominant roles of p50 and p52 revealed by genome-wide analyses. *Genome Med* 8:28.
- Evaristo, C., S. Spranger, S.E. Barnes, M.L. Miller, L.L. Molinero, F.L. Locke, T.F. Gajewski, and M.-L. Alegre. 2016. Cutting Edge: Engineering Active IKK $\beta$  in T Cells Drives Tumor Rejection. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 196:2933-2938.
- Gerondakis, S., T.S. Fulford, N.L. Messina, and R.J. Grumont. 2014. NF- $\kappa$ B control of T cell development. *Nature Immunology* 15:15-25.
- Gilmore, T.D., and M. Herscovitch. 2006. Inhibitors of NF- $\kappa$ B signaling: 785 and counting. *Oncogene* 25:6887-6899.
- Giordano, M., R. Roncagalli, P. Bourdely, L. Chasson, M. Buferne, S. Yamasaki, R. Beyaert, G. van Loo, N. Auphan-Anezin, A.-M. Schmitt-Verhulst, and G. Verdeil. 2014. 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.
- Grasso, C.S., J. Tsoi, M. Onyshchenko, G. Abril-Rodriguez, P. Ross-Macdonald, M. Wind-Rotolo, A. Champhekar, E. Medina, D.Y. Torrejon, D.S. Shin, P. Tran, Y.J. Kim, C. Puig-Saus, K. Campbell, A. Vega-Crespo, M. Quist, C. Martignier, J.J. Luke, J.D. Wolchok, D.B. Johnson, B. Chmielowski, F.S. Hodi, S. Bhatia, W. Sharfman, W.J. Urba, C.L. Slingluff, Jr., A. Diab, J. Haanen, S.M. Algarra, D.M. Pardoll, V. Anagnostou, S.L. Topalian, V.E. Velculescu, D.E. Speiser, A. Kalbasi, and A.

- Ribas. 2021. Conserved Interferon-gamma Signaling Drives Clinical Response to Immune Checkpoint Blockade Therapy in Melanoma. *Cancer cell* 39:122.
- Greve, B., R. Weissert, N. Hamdi, E. Bettelli, R.A. Sobel, A. Coyle, V.K. Kuchroo, K. Rajewsky, and M. Schmidt-Supprian. 2007. 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.
- Grinberg-Bleyer, Y., R. Caron, J.J. Seeley, N.S. De Silva, C.W. Schindler, M.S. Hayden, U. Klein, and S. Ghosh. 2018. The Alternative NF- $\kappa$ B Pathway in Regulatory T Cell Homeostasis and Suppressive Function. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 200:2362-2371.
- Grinberg-Bleyer, Y., H. Oh, A. Desrichard, D.M. Bhatt, R. Caron, T.A. Chan, R.M. Schmid, U. Klein, M.S. Hayden, and S. Ghosh. 2017. NF- $\kappa$ B c-Rel Is Crucial for the Regulatory T Cell Immune Checkpoint in Cancer. *Cell* 170:1096-1108.e1013.
- Heise, N., N.S. De Silva, K. Silva, A. Carette, G. Simonetti, M. Pasparakis, and U. Klein. 2014. Germinal center B cell maintenance and differentiation are controlled by distinct NF- $\kappa$ B transcription factor subunits. *The Journal of experimental medicine* 211:2103-2118.
- Henriksson, J., X. Chen, T. Gomes, U. Ullah, K.B. Meyer, R. Miragaia, G. Duddy, J. Pramanik, K. Yusa, R. Lahesmaa, and S.A. Teichmann. 2019. Genome-wide CRISPR Screens in T Helper Cells Reveal Pervasive Crosstalk between Activation and Differentiation. *Cell* 176:882-896.e818.
- Hilliard, B.A., N. Mason, L. Xu, J. Sun, S.-E. Lamhamedi-Cherradi, H.-C. Liou, C. Hunter, and Y.H. Chen. 2002. Critical roles of c-Rel in autoimmune inflammation and helper T cell differentiation. *The Journal of clinical investigation* 110:843-850.
- Kamphorst, A.O., A. Wieland, T. Nasti, S. Yang, R. Zhang, D.L. Barber, B.T. Konieczny, C.Z. Daugherty, L. Koenig, K. Yu, G.L. Sica, A.H. Sharpe, G.J. Freeman, B.R. Blazar, L.A. Turka, T.K. Owonikoko, R.N. Pillai, S.S. Ramalingam, K. Araki, and R. Ahmed. 2017. Rescue of exhausted CD8 T cells by PD-1-targeted therapies is CD28-dependent. *Science* 355:1423-1427.
- Kelso, A., A.B. Truitt, E. Maraskovsky, N.M. Gough, L. Morris, M.H. Pech, and J.A. Thomson. 1991. Heterogeneity in lymphokine profiles of CD4+ and CD8+ T cells and clones activated in vivo and in vitro. *Immunological reviews* 123:85-114.
- Lalle, G., R. Lutraite, A. Voisin, J. Twardowski, P. Stephan, M. Perrin-Niquet, R. Igalouzene, S.M. Soudja, J.C. Marie, M. Vocanson, N. De Silva, U. Klein, S. Ghosh, and Y. Grinberg-Bleyer. 2021a. A T cell-intrinsic function for NF-kappaB RelB in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Scientific reports* 11:19674.
- Lalle, G., J. Twardowski, and Y. Grinberg-Bleyer. 2021b. NF-kappaB in Cancer Immunity: Friend or Foe? *Cells* 10:
- Legut, M., Z. Gajic, M. Guarino, Z. Daniloski, J.A. Rahman, X. Xue, C. Lu, L. Lu, E.P. Mimitou, S. Hao, T. Davoli, C. Diefenbach, P. Smibert, and N.E. Sanjana. 2022. A genome-scale screen for synthetic drivers of T cell proliferation. *Nature* 603:728-735.

- Levy, R., D. Langlais, V. Beziat, F. Rapaport, G. Rao, T. Lazarov, M. Bourgey, Y.J. Zhou, C. Briand, K. Moriya, F. Ailal, D.T. Avery, J. Markle, A.I. Lim, M. Ogishi, R. Yang, S. Pelham, M. Emam, M. Migaud, C. Deswarte, T. Habib, L.R. Saraiva, E.A. Moussa, A. Guennoun, B. Boisson, S. Belkaya, R. Martinez-Barricarte, J. Rosain, A. Belkadi, S. Breton, K. Payne, I. Benhsaien, A. Plebani, V. Lougaris, J.P. Di Santo, B. Neven, L. Abel, C.S. Ma, A.A. Bousfiha, N. Marr, J. Bustamante, K. Liu, P. Gros, F. Geissmann, S.G. Tangye, J.L. Casanova, and A. Puel. 2021. Inherited human c-Rel deficiency disrupts myeloid and lymphoid immunity to multiple infectious agents. *The Journal of clinical investigation* 131:
- Li, T., X. Li, A. Zamani, W. Wang, C.N. Lee, M. Li, G. Luo, E. Eller, H. Sun, S. Ghosh, J. Jin, R. Murali, Q. Ruan, W. Shi, and Y.H. Chen. 2020. c-Rel is a myeloid checkpoint for cancer immunotherapy. *Nature Cancer* 1:507–517.
- Li, X., J. Liu, J.K. Park, T.A. Hamilton, P. Rayman, E. Klein, M. Edinger, R. Tubbs, R. Bukowski, and J. Finke. 1994. 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.
- Liu, X., Y. Wang, H. Lu, J. Li, X. Yan, M. Xiao, J. Hao, A. Alekseev, H. Khong, T. Chen, R. Huang, J. Wu, Q. Zhao, Q. Wu, S. Xu, X. Wang, W. Jin, S. Yu, Y. Wang, L. Wei, A. Wang, B. Zhong, L. Ni, X. Liu, R. Nurieva, L. Ye, Q. Tian, X.W. Bian, and C. Dong. 2019. Genome-wide analysis identifies NR4A1 as a key mediator of T cell dysfunction. *Nature* 567:525-529.
- Mc Guire, C., M. Prinz, R. Beyaert, and G. van Loo. 2013. Nuclear factor kappa B (NF-kappaB) in multiple sclerosis pathology. *Trends Mol Med* 19:604-613.
- Oeckinghaus, A., M.S. Hayden, and S. Ghosh. 2011. Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways. *Nat Immunol* 12:695-708.
- Oh, H., Y. Grinberg-Bleyer, W. Liao, D. Maloney, P. Wang, Z. Wu, J. Wang, D.M. Bhatt, N. Heise, R.M. Schmid, M.S. Hayden, U. Klein, R. Rabadan, and S. Ghosh. 2017. An NF- $\kappa$ B Transcription-Factor-Dependent Lineage-Specific Transcriptional Program Promotes Regulatory T Cell Identity and Function. *Immunity* 47:450-465.e455.
- Powolny-Budnicka, I., M. Riemann, S. Tänzer, Roland M. Schmid, T. Hehlhans, and F. Weih. 2011. RelA and RelB Transcription Factors in Distinct Thymocyte Populations Control Lymphotoxin-Dependent Interleukin-17 Production in  $\gamma\delta$  T Cells. *Immunity* 34:364-374.
- Raveney, B.J.E., W. Sato, D. Takewaki, C. Zhang, T. Kanazawa, Y. Lin, T. Okamoto, M. Araki, Y. Kimura, N. Sato, T. Sano, Y. Saito, S. Oki, and T. Yamamura. 2021. Involvement of cytotoxic Eomes-expressing CD4(+) T cells in secondary progressive multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118:
- Ruan, Q., V. Kameswaran, Y. Zhang, S. Zheng, J. Sun, J. Wang, J. DeVirgiliis, H.-C. Liou, A.A. Beg, and Y.H. Chen. 2011. The Th17 immune response is controlled by the Rel-ROR $\gamma$ -ROR $\gamma$  T transcriptional axis. *The Journal of experimental medicine* 208:2321-2333.

- Satoh, J., T. Misawa, H. Tabunoki, and T. Yamamura. 2008. 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.
- Schafflick, D., C.A. Xu, M. Hartlehnert, M. Cole, A. Schulte-Mecklenbeck, T. Lautwein, J. Wolbert, M. Heming, S.G. Meuth, T. Kuhlmann, C.C. Gross, H. Wiendl, N. Yosef, and G. Meyer Zu Horste. 2020. Integrated single cell analysis of blood and cerebrospinal fluid leukocytes in multiple sclerosis. *Nature communications* 11:247.
- Schmidt, R., Z. Steinhart, M. Layeghi, J.W. Freimer, R. Bueno, V.Q. Nguyen, F. Blaeschke, C.J. Ye, and A. Marson. 2022. CRISPR activation and interference screens decode stimulation responses in primary human T cells. *Science* 375:eabj4008.
- Seo, H., E. Gonzalez-Avalos, W. Zhang, P. Ramchandani, C. Yang, C.J. Lio, A. Rao, and P.G. Hogan. 2021. BATF and IRF4 cooperate to counter exhaustion in tumor-infiltrating CAR T cells. *Nat Immunol* 22:983-995.
- Shah, K., A. Al-Haidari, J. Sun, and J.U. Kazi. 2021. T cell receptor (TCR) signaling in health and disease. *Signal Transduct Target Ther* 6:412.
- Shifrut, E., J. Carnevale, V. Tobin, T.L. Roth, J.M. Woo, C.T. Bui, P.J. Li, M.E. Diolaiti, A. Ashworth, and A. Marson. 2018. Genome-wide CRISPR Screens in Primary Human T Cells Reveal Key Regulators of Immune Function. *Cell* 175:1958-1971.e1915.
- Visekruna, A., M. Huber, A. Hellhund, E. Bothur, K. Reinhard, N. Bollig, N. Schmidt, T. Joeris, M. Lohoff, and U. Steinhoff. 2010. c-Rel is crucial for the induction of Foxp3<sup>+</sup> regulatory CD4<sup>+</sup> T cells but not T<sub>H</sub> 17 cells. *European journal of immunology* 40:671-676.
- Voisin, A., and Y. Grinberg-Bleyer. 2021. The many-sided contributions of NF-kappaB to T-cell biology in health and disease. *Int Rev Cell Mol Biol* 361:245-300.
- Webb, L.V., A. Barbarulo, J. Huysentruyt, T. Vanden Berghe, N. Takahashi, S. Ley, P. Vandenabeele, and B. Seddon. 2019. Survival of Single Positive Thymocytes Depends upon Developmental Control of RIPK1 Kinase Signaling by the IKK Complex Independent of NF-κB. *Immunity* 50:348-361.e344.
- Weih, F., D. Carrasco, S.K. Durham, D.S. Barton, C.A. Rizzo, R.P. Ryseck, S.A. Lira, and R. Bravo. 1995. 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.
- Wong, D., A. Teixeira, S. Oikonomopoulos, P. Humburg, I.N. Lone, D. Saliba, T. Siggers, M. Bulyk, D. Angelov, S. Dimitrov, I.A. Udalova, and J. Ragoussis. 2011. Extensive characterization of NF-kappaB binding uncovers non-canonical motifs and advances the interpretation of genetic functional traits. *Genome Biol* 12:R70.
- Yan, H., X. Duan, H. Pan, N. Holguin, M.F. Raj, A. Akk, L.E. Springer, S.A. Wickline, L.J. Sandell, and C.T. Pham. 2016. 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.

- Yan, J., C.M. Winterford, V.S. Catts, B.K. Pat, M.P. Pender, P.A. McCombe, and J.M. Greer. 2018. Increased constitutive activation of NF-kappaB p65 (RelA) in peripheral blood cells of patients with progressive multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 320:111-116.
- Zhang, H., J. Bi, H. Yi, T. Fan, Q. Ruan, L. Cai, Y.H. Chen, and X. Wan. 2017. 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.
- Zhao, B., L.A. Barrera, I. Ersing, B. Willox, S.C. Schmidt, H. Greenfeld, H. Zhou, S.B. Mollo, T.T. Shi, K. Takasaki, S. Jiang, E. Cahir-McFarland, M. Kellis, M.L. Bulyk, E. Kieff, and B.E. Gewurz. 2014. The NF-kappaB genomic landscape in lymphoblastoid B cells. *Cell reports* 8:1595-1606.
- Zhu, J., and W.E. Paul. 2010. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell research* 20:4-12.

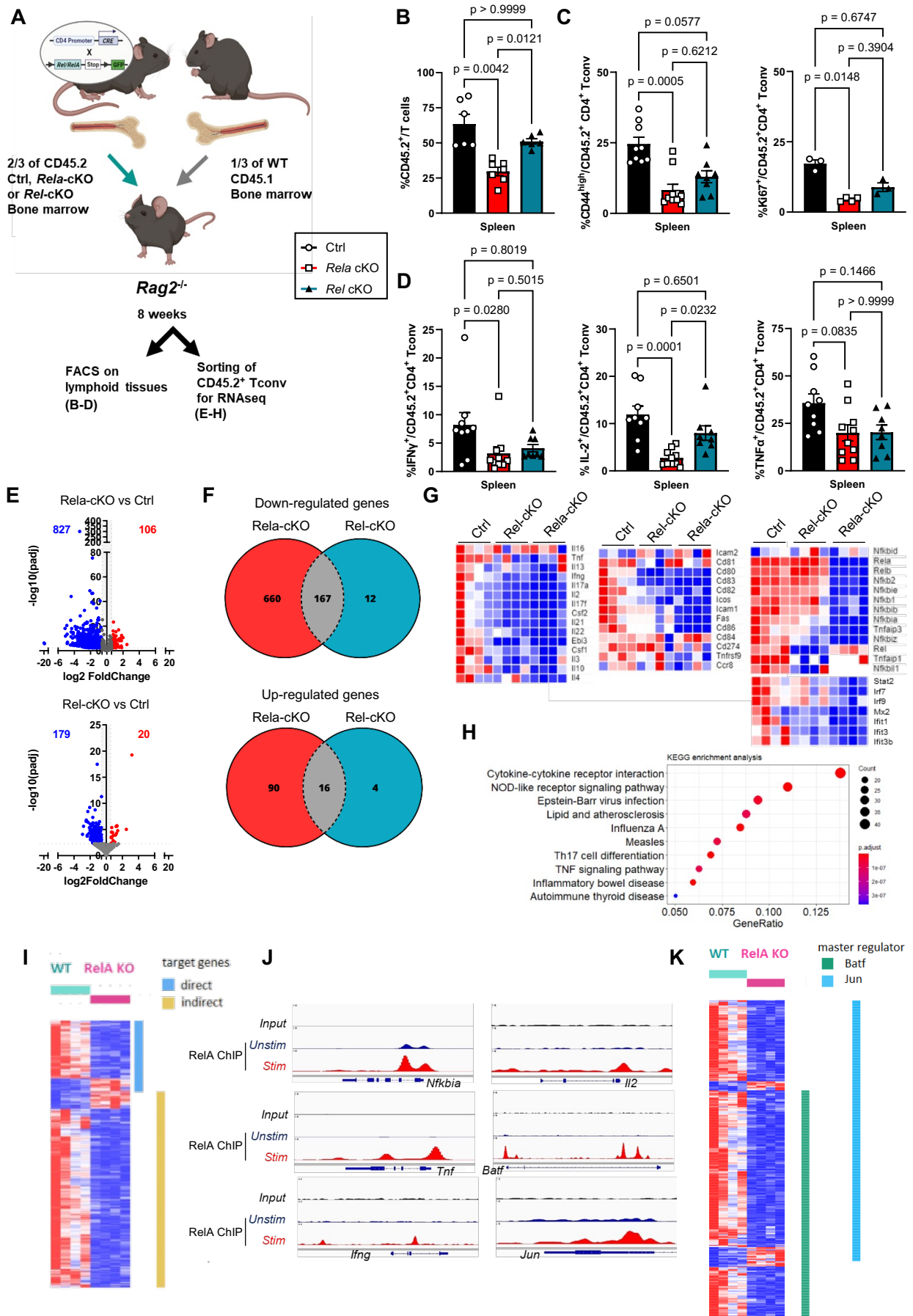


Figure 1



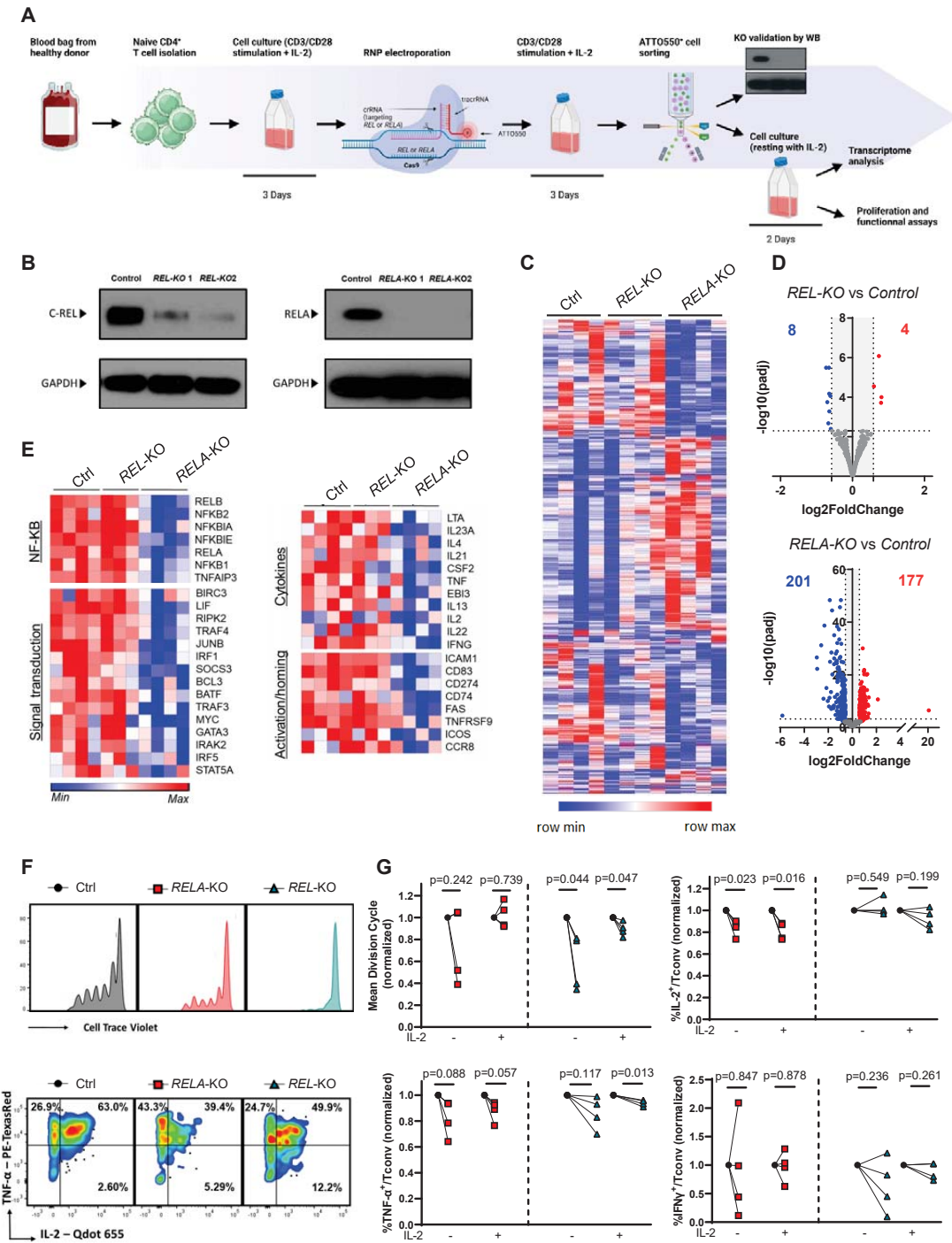
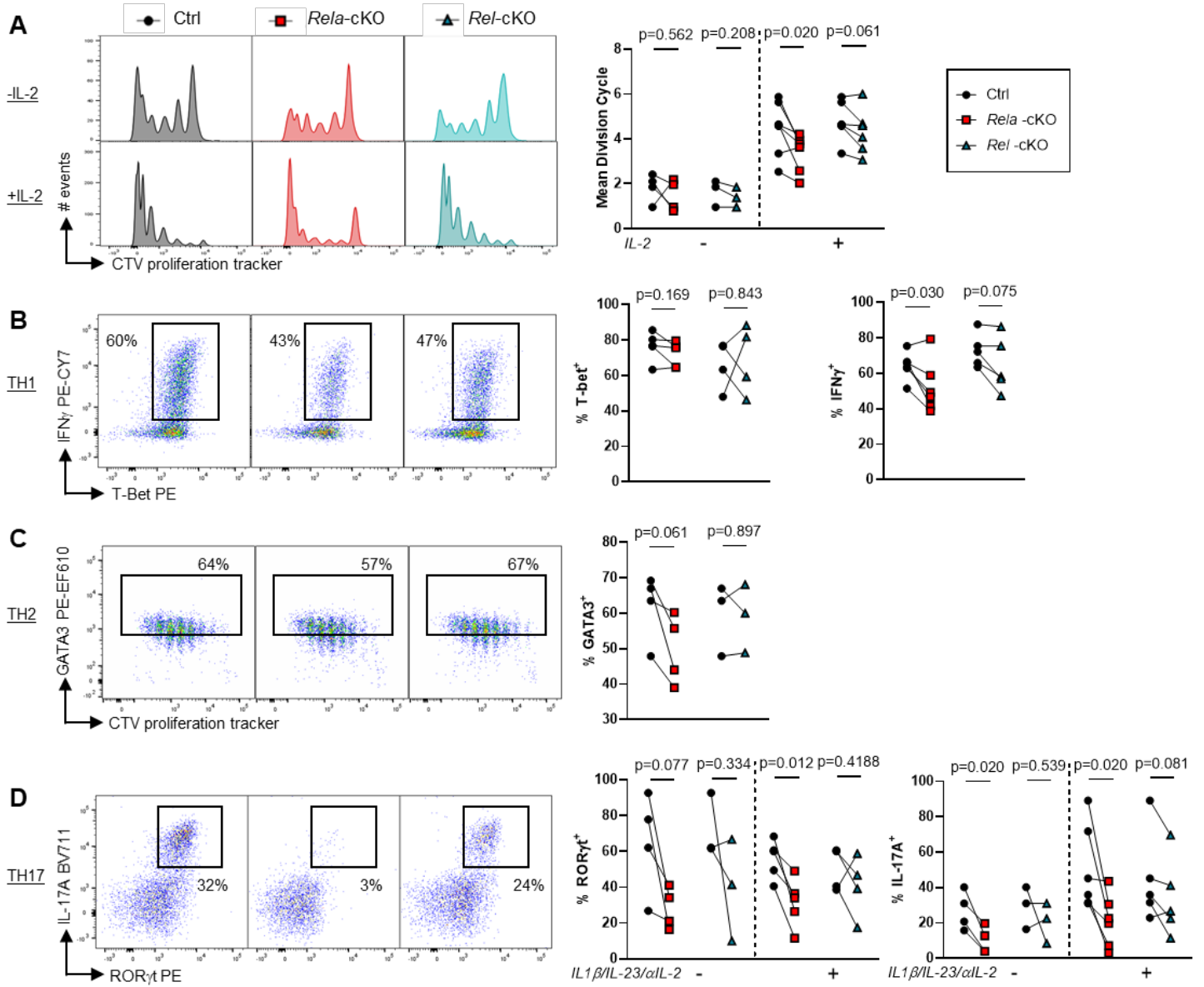


Figure 2



**Figure 3**

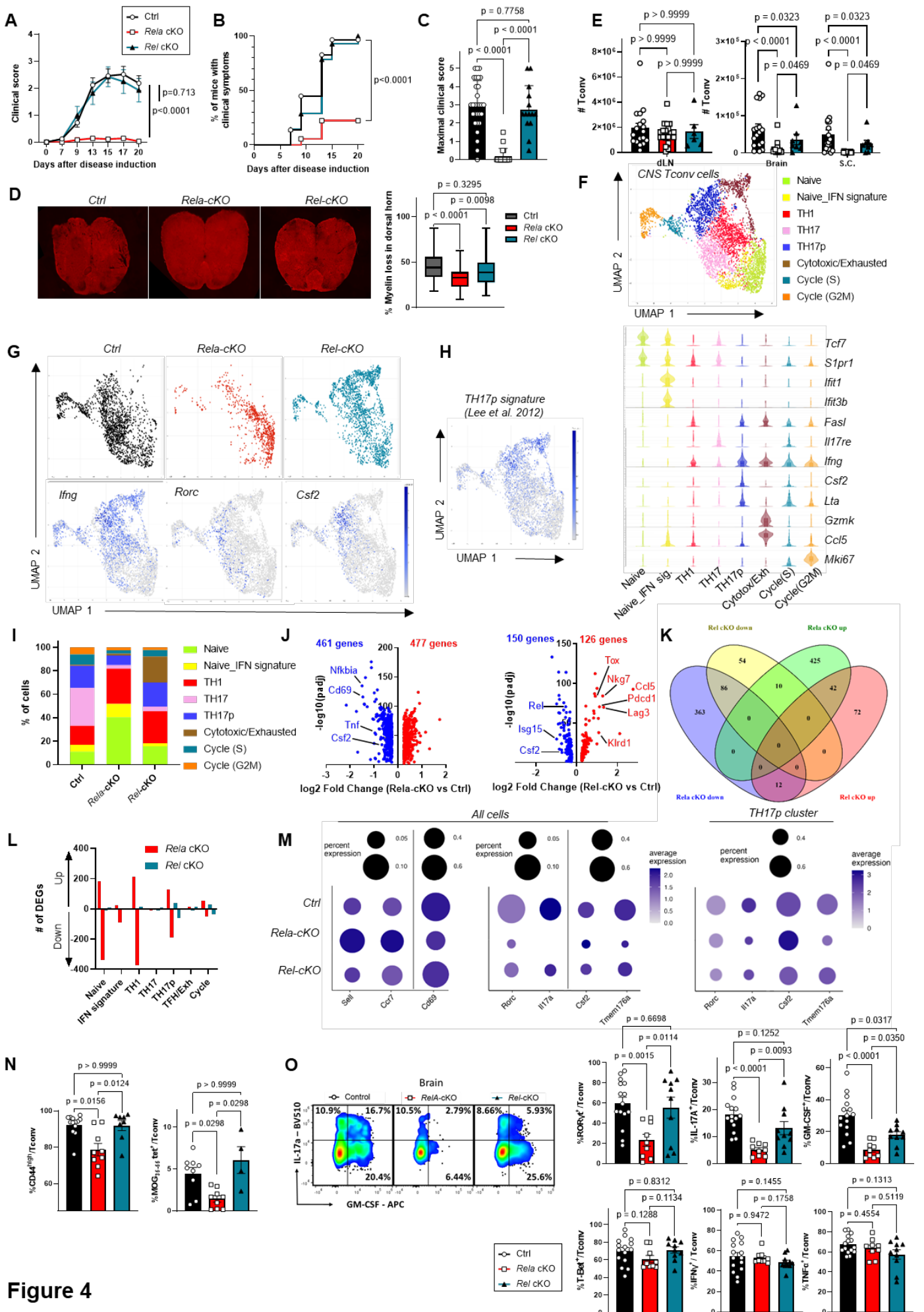
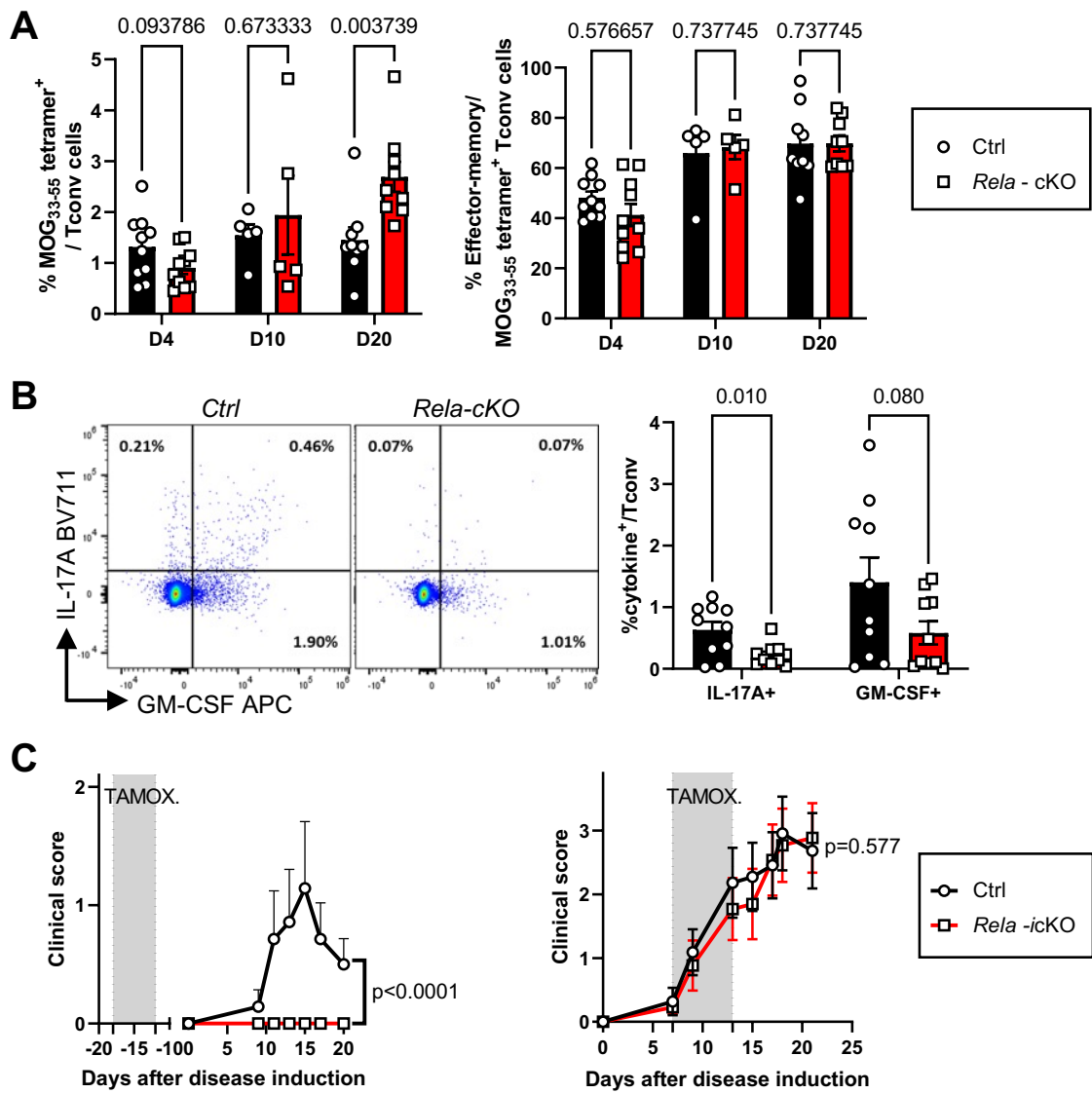


Figure 4



**Figure 5**

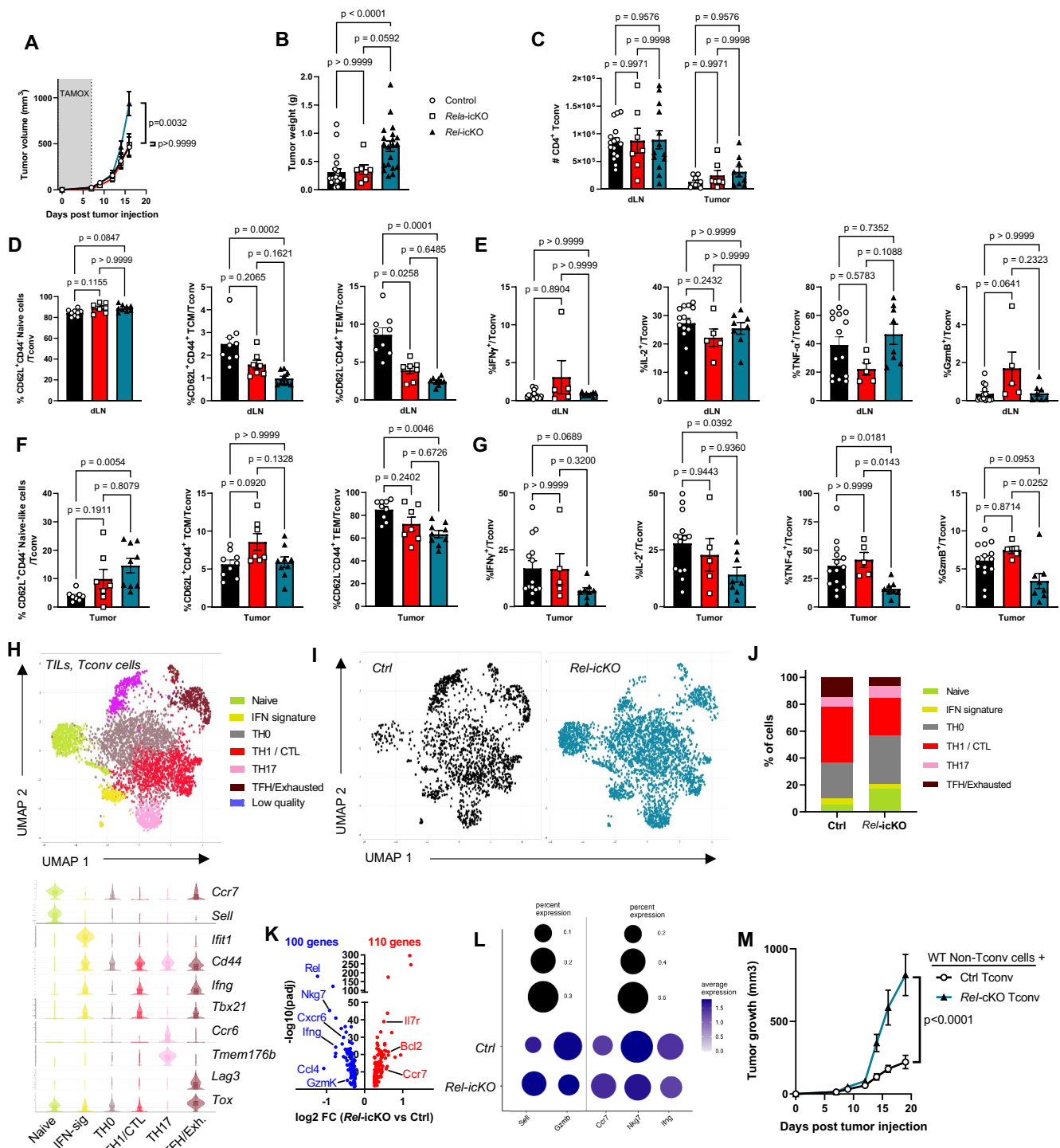
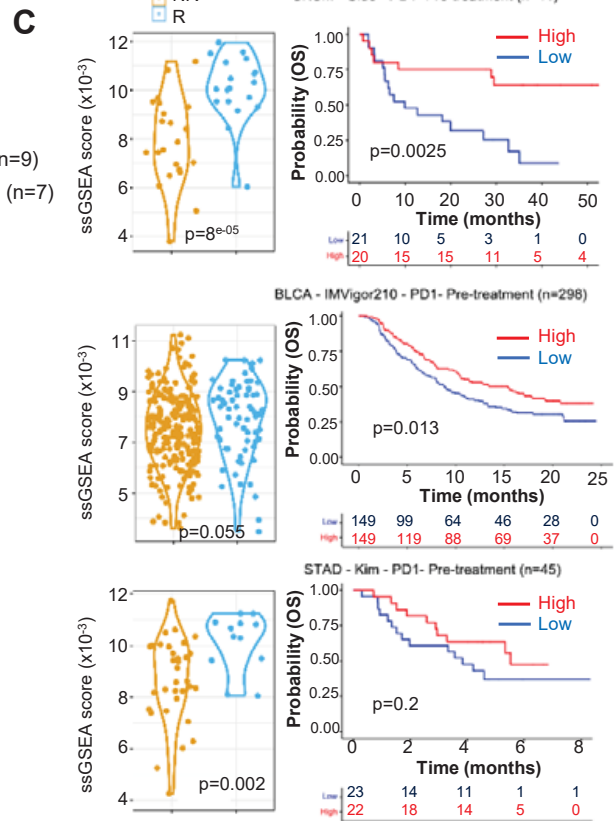
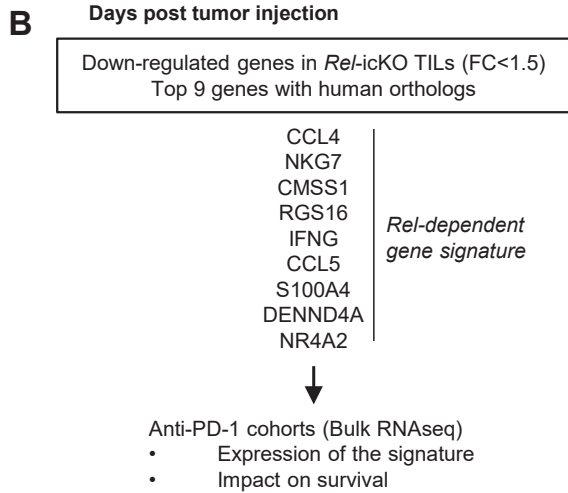
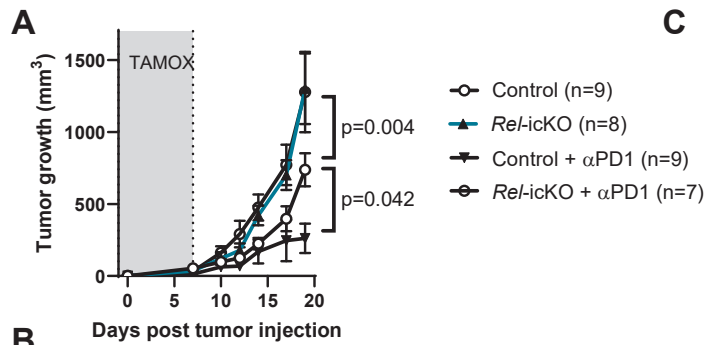
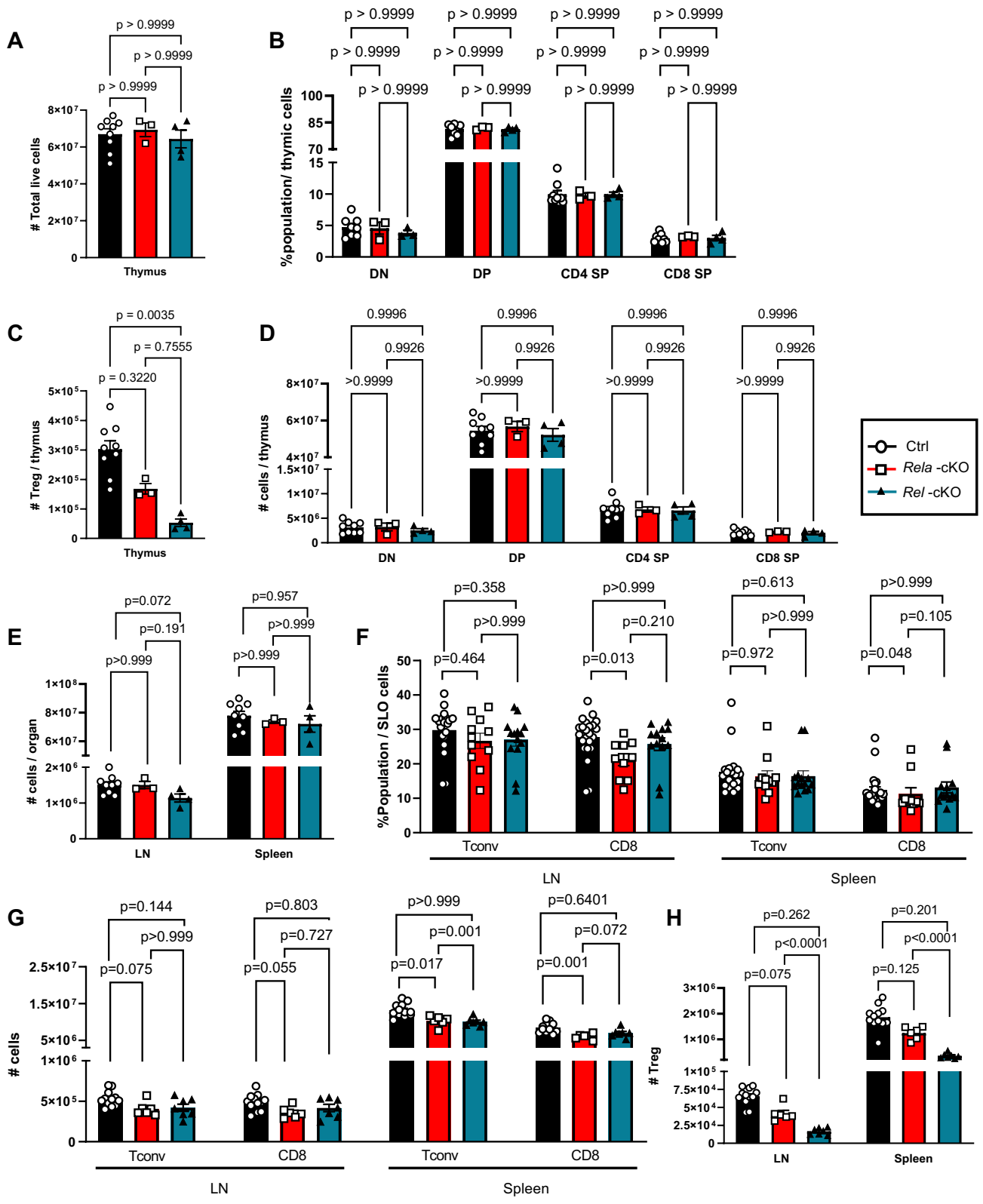


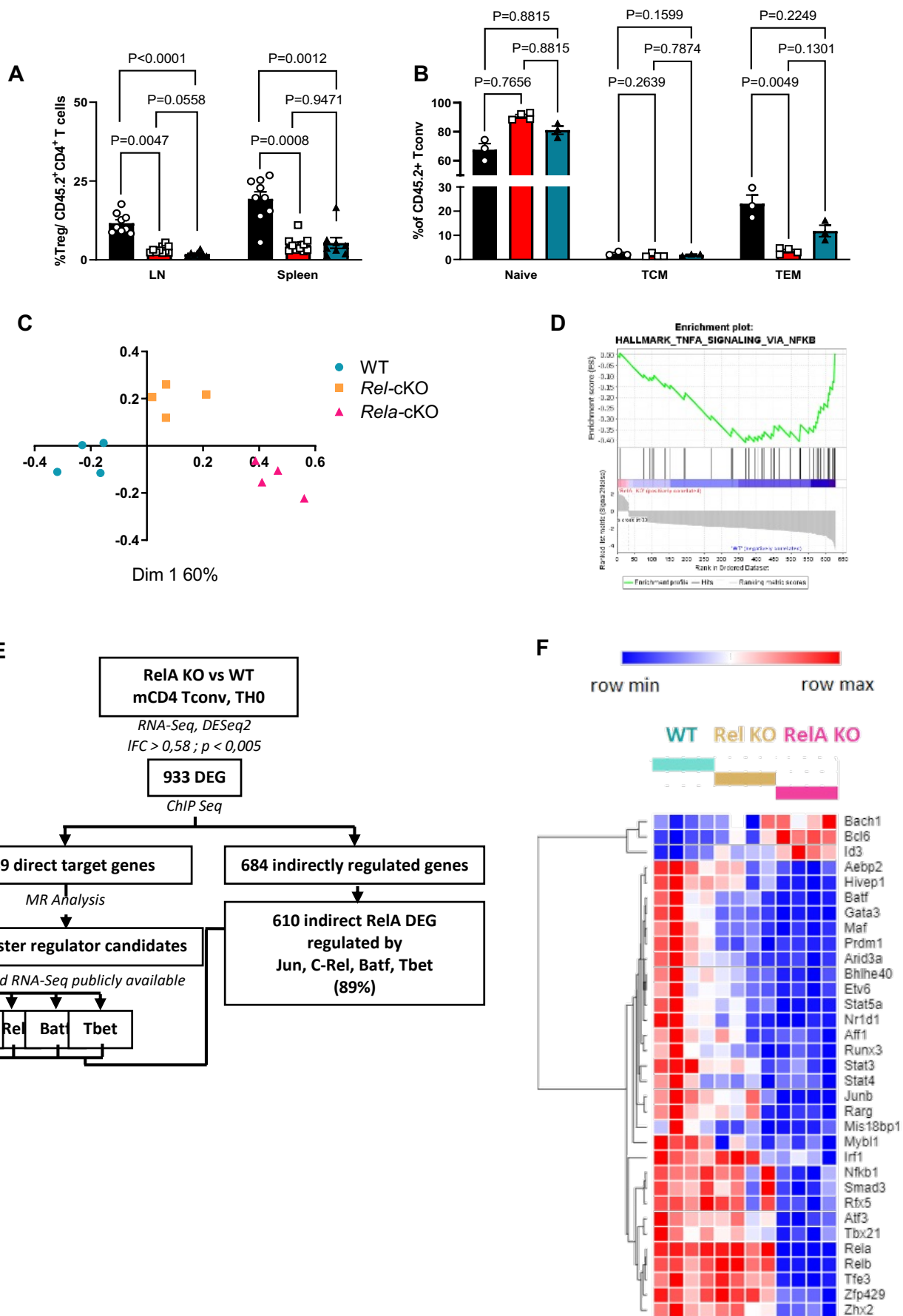
Figure 6



**Figure 7**

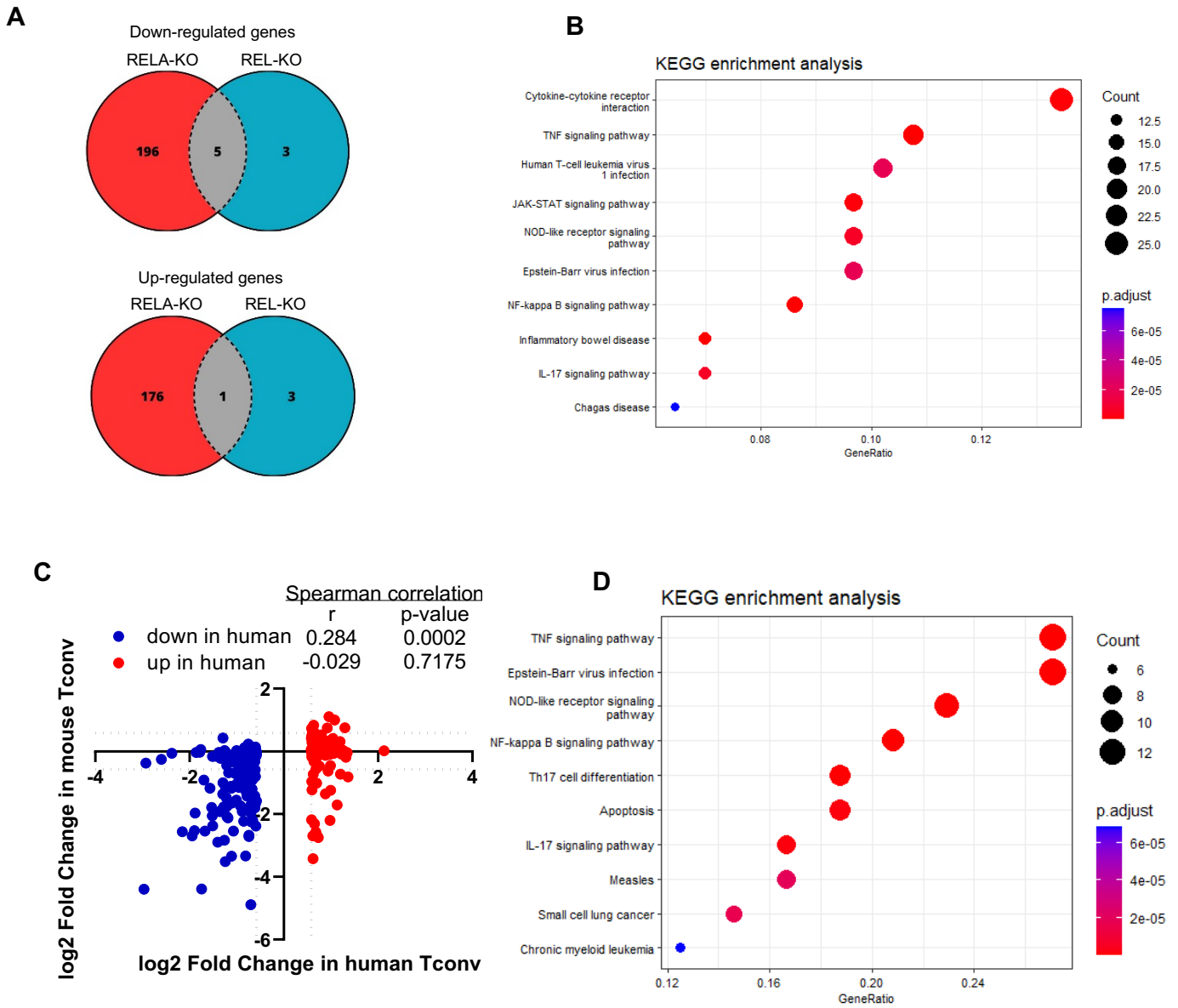


Supplementary Figure 3

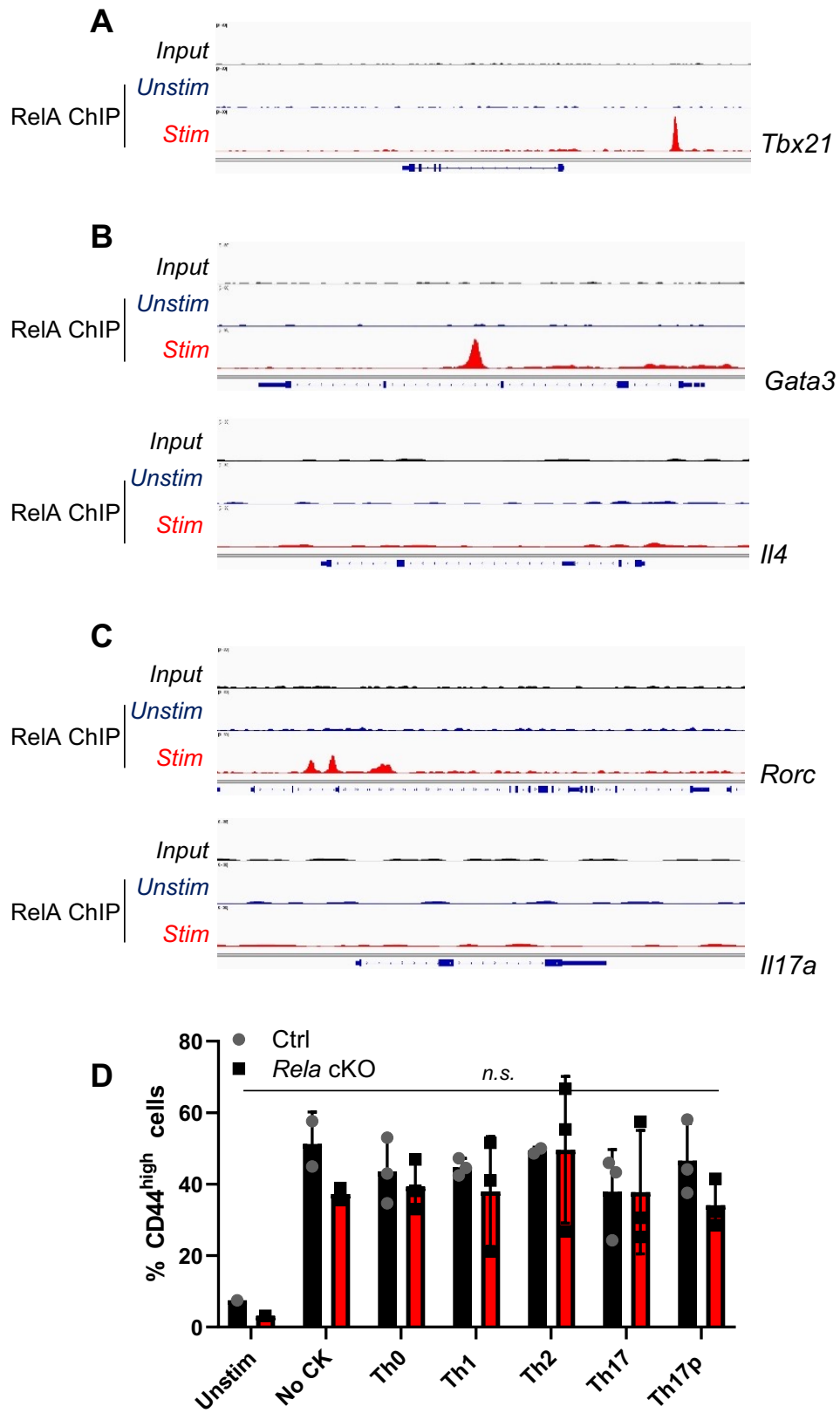


Supplementary Figure 2

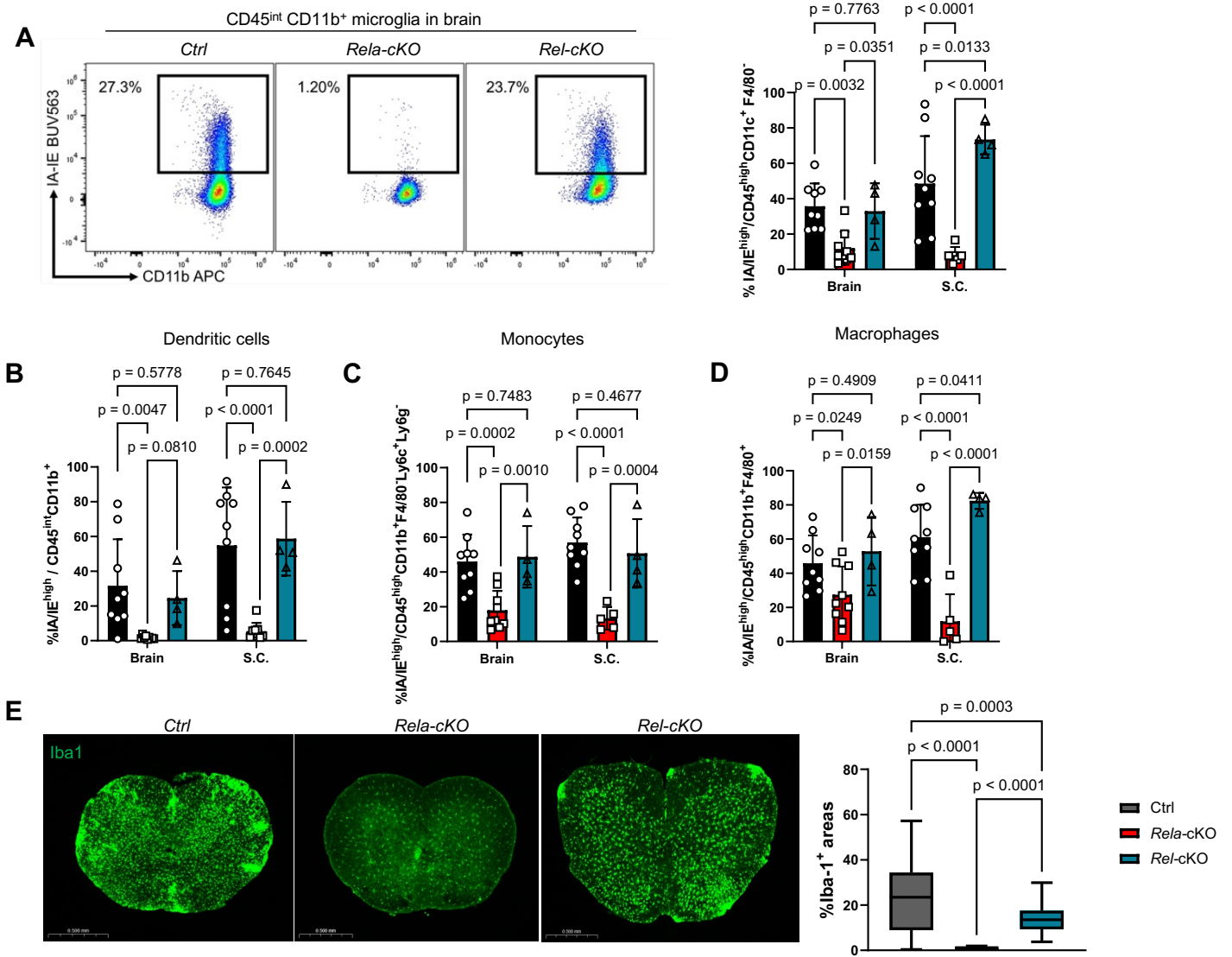




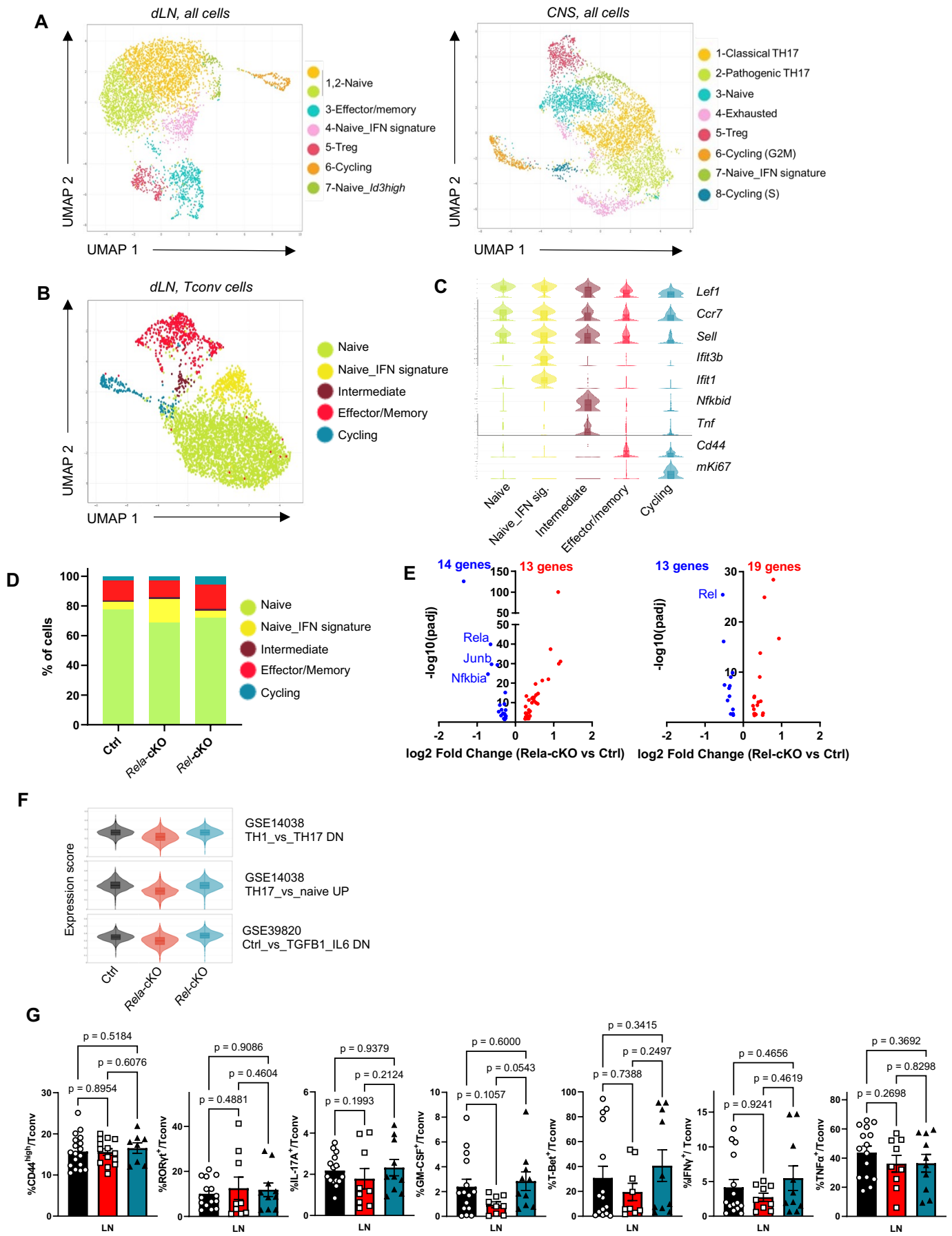
Supplementary Figure 3



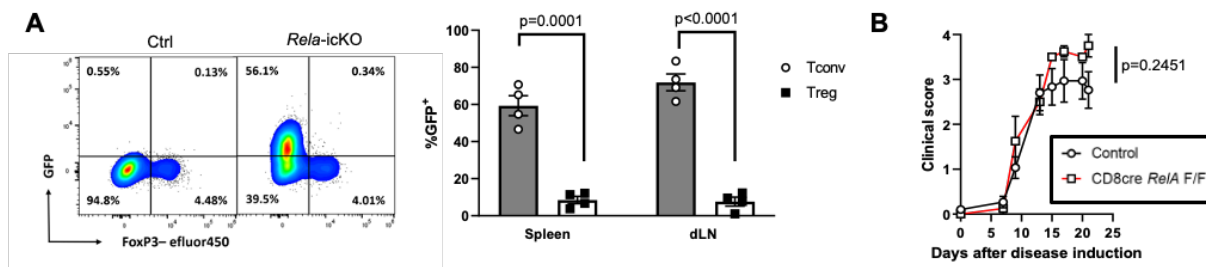
**Supplementary Figure 4**



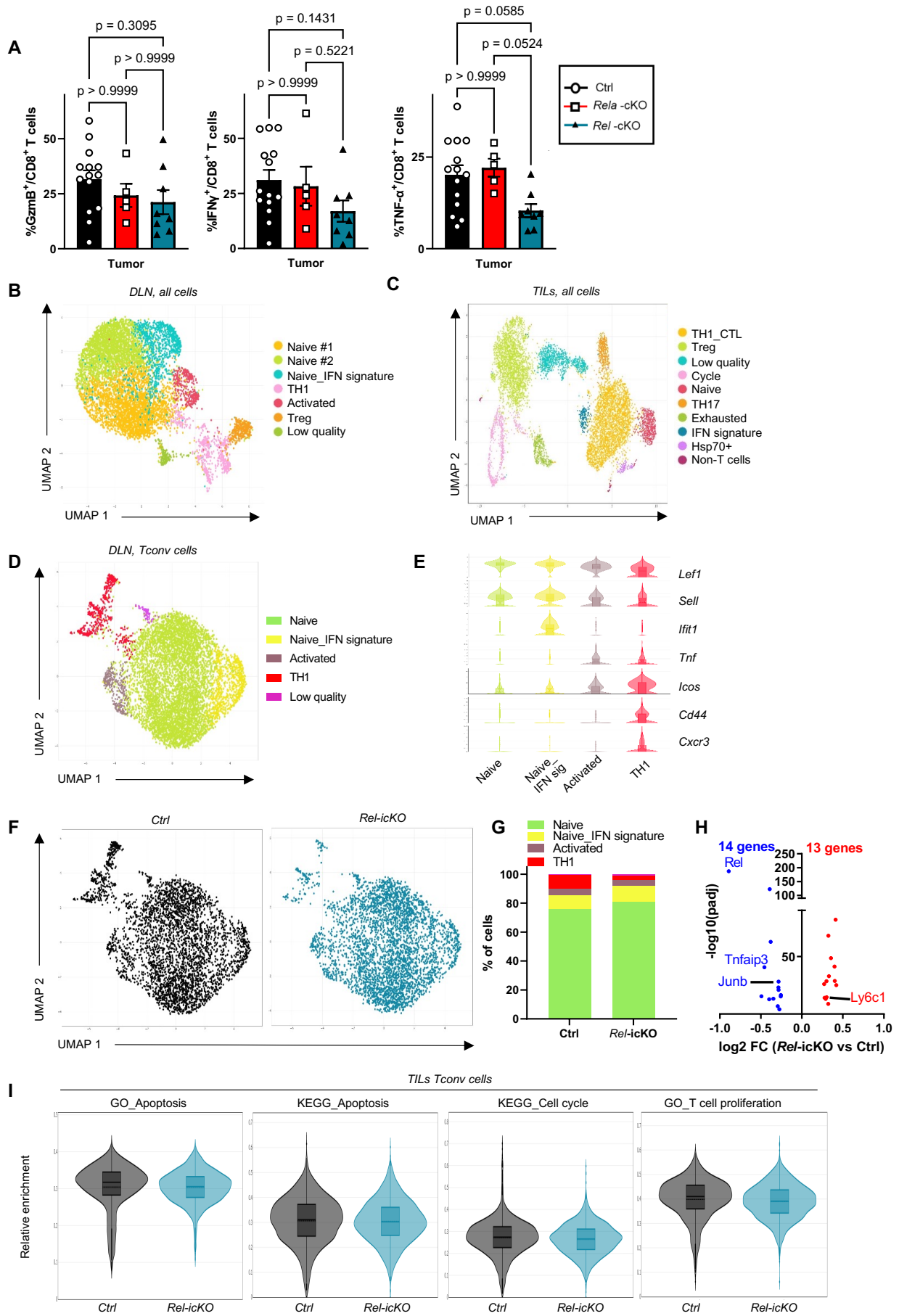
Supplementary Figure 5



Supplementary Figure 6



Supplementary Figure 7



Supplementary Figure 8

Target	Fluorochrome	Clone	Supplier	Reference	Dilution
CD103	Alexa Fluor 700	2E7	Biolegend	121441	100
CD152 (CTLA-4)	APC	UC10-4B9	Biolegend	106310	100
CD25	APC-R700	PC61	BD Horizon	565134	200
CD25	AF700	PC61	Biolegend	102024	200
CD25	SuperBright 780	PC61.5	Invitrogen	78-0251-82	100
CD279 (PD-1)	BV605	J43	BD Horizon	563059	200
CD4	APC-eFluor 780	GK1.5	eBioscience	47-0041-82	400
CD4	BUV805	GK1.5	BD Horizon	612900	600
CD4	biotin	GK1.5	Biolegend	47-0041-82	600
CD44	BUV496	IM7	BD Optibuild	741057	400
CD44	PE-Cy7	IM7	BD Pharmingen	560569	500
CD45	BUV395	30-F11	BD Horizon	564279	400
CD45.1	Biotin	A20	Biolegend	110704	400
CD45.2	FITC	104	BD Pharmingen	553772	200
CD45.2	PE	104	BD Pharmingen	560695	200
CD45.2	Biotin	104	Biolegend	109804	400
CD62L	BV510	MEL-14	Biolegend	104441	400
CD8a	BV570	53-6.7	Biolegend	100739	300
CD8a	PE-eFluor 610	53-6.7	eBioscience	61-0081-82	200
CD8a	Biotin	53-6.7	Biolegend	100703	400
CD8a	Alexa Fluor 532	53-6.7	eBioscience	58-0081-80	200
F4/80	BV711	T45-2342	BD	565612	100
IA/IE	BUV563	M5/114.15.2	bd	748846	200
CD11b	APC	M1/70	BD	553312	100
CD357 (GITR)	APC-eFluor 647	DTA-1	BD	565151	100
CD11c	pe-Cy7	N418	Biolegend	117318	100
Ly-6G	pe dazzle 594	1A8	Biolegend	127648	50
Ly-6C	Apc-Cy7	al-21	BD	560596	300
CD90.2	PerCP-e710	30-H12	ebioscience	46-0903-82	200
FCGR2/3		2.4G2	Tobo biosciences	70-0161-U100	1000
FOXP3	efluor450	FJK-16s	eBioscience	48-5773-82	100
FOXP3	Alexa Fluor 700	FJK-16s	eBioscience	56-5773-82	100
FOXP3	APC	FJK-16s	eBioscience	17-5773-82	150
GATA3	PE-Vio615	REA174	Miltenyi Biotec	130-109-115	50
GATA3	PE-eFluor 610	TWAW	Invitrogen	61-9966-42	100
GM-CSF	APC	MP1-22E9	Biolegend	17-7331-82	50
Granzyme B	eFluor 660	NGZB	eBioscience	50-8898-82	100
Granzyme B	AF700	GB11	BD Pharmingen	560213	600
IFN-γ	PE-Cyanine7	XMG1.2	eBioscience	25-7311-82	400
IFN-γ	BV421	XMG1.2	Biolegend	505830	200
IFN-γ	PE-Cyanine7	XMG1.2	eBioscience	25-7311-82	400
IFN-γ	BV711	B27 (RUO)	BD Horizon	564039	200
IFN-γ	BUV737	XMG1.2	BD	612769	1000
IL-13	PerCP-eFluor 710	eBio13A	eBioscience	46-7133-82	80
IL-17A	BV510	TC11-18H10 (RUO)	BD	564168	100
IL-17A	BV711	TC11-18H10.1	Biolegend	506941	200
IL-2	PE	JES6-5H4	eBioscience	12-7021-82	100
IL-2	BV711	JES6-5H4	Biolegend	503837	100
IL-2	Brilliant Violet 650	MQ1-17H12	Biolegend	BLE500334	100
IL-2	Biotin	JES6-5H4	Invitrogen	13-7021-81	800
IL-4	PE-Cy7	11B11	BD	560699	100
Ki67	PerCP/Cyanine5.5	16A8	Biolegend	652424	75
RORγT	PE	AFKJS-9	eBioscience	12-6988-82	100
RORγT	APC	AFKJS-9	eBioscience	17-6988-80	50
streptavidin	APC-e780		BD	554063	800
Streptavidin	BV650		Biolegend	405232	600
Streptavidin	BUV615		BD	613013	800
T-bet	BV650	O4-46 (RUO)	BD	564142	100
T-bet	Pe-Cy7	4B10	eBioscience	25-5825-82	100
T-bet	PerCP-Cyanine5.5	4B10	eBioscience	45-5825-80	100
T-bet	PE	4B10	Biolegend	644810	100
Target	Fluorochrome	Clone	Vendeur	Ref	Dil
TCR-β	PerCP-Cyanine5.5	H57-597	eBioscience	45-5961-82	300
TCR-β	BV785	H57-597	Biolegend	109249	200
TCR-β	PerCP-Cyanine5.5	H57-597	BD	560657	200
TNF	BV711	MP6-XT22 (RUO)	BD Horizon	563944	200
TNF-α	eFluor 450	MP6-XT22	eBioscience	48-7321-82	200
TNF-α	Biotin	MP6-XT22	Biolegend	506311	400
TNF-α	PE-eFluor 610	MAb11	eBioscience	61-7349-42	200
violet CellTrace™			Invitrogen	C34571	1000
Zombie Green			Biolegend	423111	1000
Zombie UV			Biolegend	423107	1000
Zombie Yellow			Biolegend	423103	1000
Live/Dead Aqua			Thermo	L34957	1000
Zombie NIR			Biolegend	423106	1000

Target	Target species	Species	Clone	Reference	Ref	Dilution
c-Rel	Human	Rabbit	Polyclonal	Invitrogen	PA5-17452	1000
c-Rel	Mouse	Rabbit	D4Y6M	CST	12707	1000
RelA	Human/Mouse	Rabbit	Polyclonal	Invitrogen	PA5-16545	1000
GAPDH	Human/Mouse	Rabbit	14C10	CST	2118	2000

## Supplementary Table 1

## **Analyse de la complémentarité et redondance des sous-unités RelA et c-Rel dans les Tconv**

Dans l'article précédent, nous avons montré que c-Rel et RelA jouent des rôles distincts dépendant du contexte biologique. Néanmoins, il est possible que dans nos modèles déficients pour l'une ou l'autre des sous-unités, certains effets soient compensés ou compromis, par une complémentarité ou un antagonisme de l'autre protéine « sœur ».

Par exemple des études menées dans les LT ou des cellules épithéliales déficient en RelA ont mis en évidence une expression accrue de c-Rel<sup>287,376</sup>. De même, dans notre précédent travail, nous avons montré qu'à l'état basal plus de 150 gènes sont régulés par RelA ou c-Rel (figure 1, article1). Il est probable que certains gènes soient activés indifféremment par RelA ou c-Rel en fonction de la disponibilité des sous-unités.

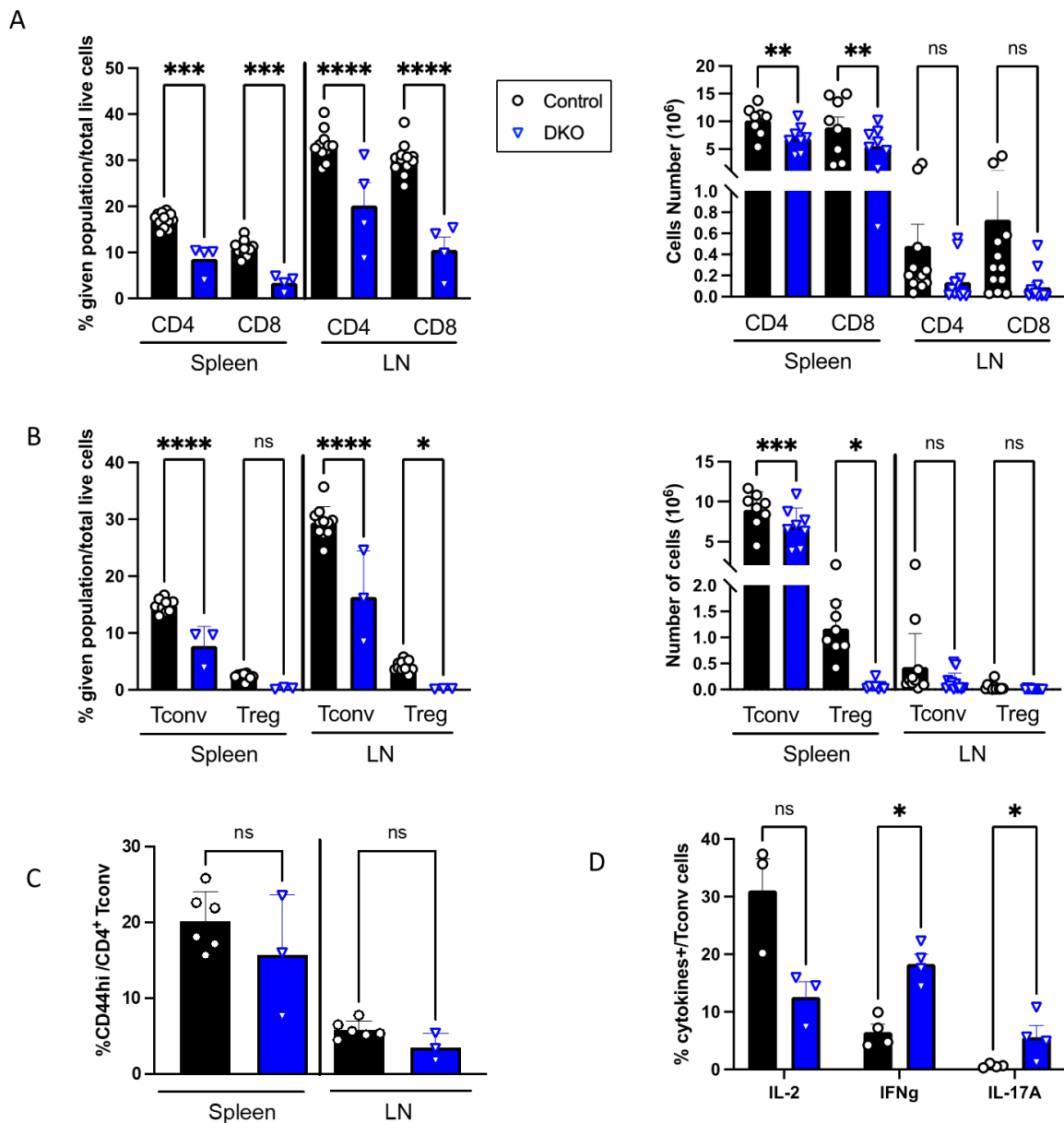
Dans l'optique d'examiner les rôles redondants de c-Rel et de RelA, nous avons généré de souris présentant une délétion conditionnelle de c-Rel et de RelA dans les LT ( $CD4_{cre}Rela^{FLOX/FLOX}Rel^{FLOX/FLOX}$ , DKO). Alors que l'ablation spécifique de c-Rel ou RelA présente un impact modéré sur la distribution des LT périphériques, une ablation conjointe provoque des perturbations majeures, notamment une réduction marquée du nombre de lymphocytes T régulateurs (Treg) et de lymphocytes T conventionnels (Tconv) dans divers organes lymphoïdes. In vitro, la délétion simultanée de c-Rel et RelA inhibe presque entièrement la capacité des LT à se différencier en Th1, Th2 et Th17. De façon surprenante, nous observons une augmentation du profil inflammatoire des Tconv in vivo. Toutefois, par le biais d'expériences de chimère de moelle osseuse, nous montrons que cette dysrégulation repose sur un mécanisme extrinsèque aux Tconv.

Chez les souris vieillissantes, la double délétion dans l'ensemble des LT entraîne un syndrome inflammatoire caractérisé notamment par une inflammation intestinale, et l'apparition d'un prolapsus rectal chez certains animaux. Ces données mettent en évidence une redondance partielle entre c-Rel et RelA et rappellent l'importance cruciale de NF- $\kappa$ B dans la régulation des LT et le maintien de l'homéostasie immunitaire



## 1. Perturbation de l'homéostasie des LT chez les souris DKO

Il a été montré que l'inhibition d'IKK $\beta$ , conduisant à une inhibition complète de la voie canonique de NF- $\kappa$ B, réduit le nombre de LT, en particulier LT mémoires, en périphérie<sup>377</sup>. Toutefois, la délétion individuelle de c-Rel et RelA n'impacte que modérément ces paramètres, suggérant une redondance entre les sous-unités. Dans les souris DKO âgées de 8 à 12 semaines, nous observons une réduction notable de la proportion de LT CD4 et CD8 dans les organes lymphoïdes et du nombre de LT CD4 et CD8 dans la rate (Figure 1A). On note également une quasi-absence de Treg tant dans les ganglions et la rate des souris DKO (Figure 1B). Concernant l'activation des Tconv, on n'observe aucune différence dans la proportion de cellules activées/mémoire CD44<sup>+</sup> (Figure 1C). Après une restimulation polyclonale, les Tconv DKO expriment légèrement moins d'IL-2 que les témoins ; à l'inverse la proportion de Tconv produisant de l'IFN $\gamma$  et de l'IL-17a est significativement augmentée (Figure 1D). Cela suggère que la délétion simultanée de c-Rel et RelA au sein des LT pourrait conduire à une augmentation du profil inflammatoire des Tconv.



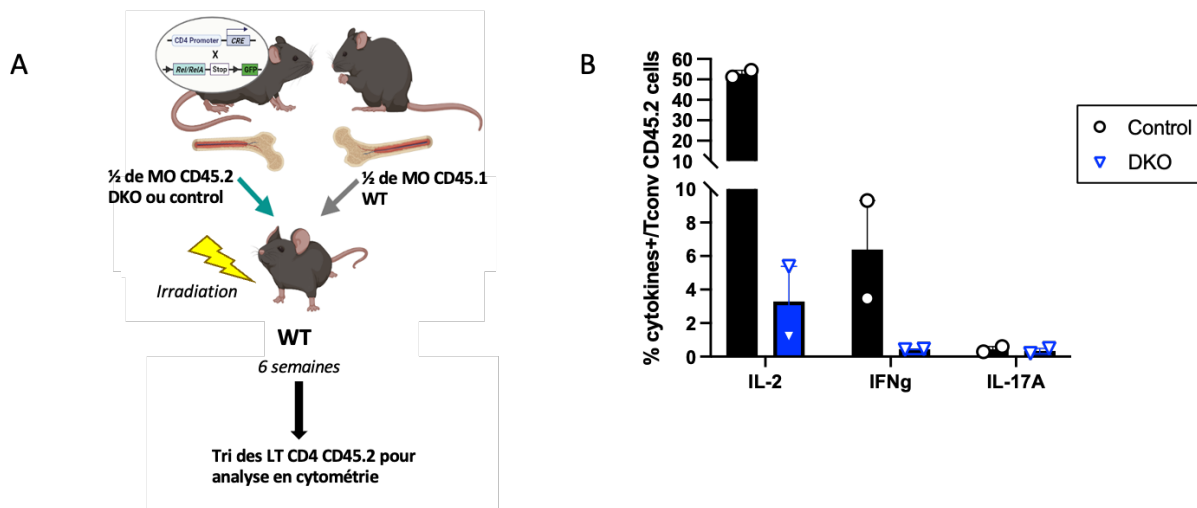
**Figure 1 : L'ablation des deux sous-unités c-Rel et RelA impacte le développement et l'homéostasie des LT.**

La rate (spleen) et les ganglions périphériques (LN) de souris témoins et DKO ont été analysés par cytométrie de flux (A-D). Analyse de la proportion et du nombre des LT CD4 et de LT CD8 (A) ; Analyse de la proportion et du nombre de Tconv et de Treg (B) ; Analyse de la proportion de Tconv CD44<sup>high</sup> (C). Les cellules de la rate ont été restimulées avec de la PMA-ionomycine. La proportion de Tconv exprimant les cytokines est représentée (D). Les données FACS sont présentées comme la moyenne  $\pm$  SEM; chaque point représente une souris ; des tests multiples de Mann-Whitney ont été réalisés.

## 2. La dérégulation des Tconv observée à l'état basal dépend de facteurs extrinsèques

L'activation basale des Tconv en l'absence de c-Rel et RelA peut être attribuée à des facteurs intrinsèques (c'est-à-dire une fonction inhibitrice de NF- $\kappa$ B), comme extrinsèques, notamment une suppression insuffisante des Tconv par les Treg qui sont fortement diminués dans les souris DKO. Pour répondre à cette question, nous avons réalisé des expériences de transfert mixte de

moelle osseuse de cellules CD45.1+ WT et de cellules CD45.2+ de contrôle ou DKO, dans des souris WT CD45.2+ irradiées (Figure 2A). L'analyse par cytométrie en flux après tri et restimulation anti- CD3/CD28 des Tconv CD45.2 de la rate et des ganglions, 8 semaines après le transfert de la moelle osseuse, révèle cette fois une forte baisse de la proportion de Tconv IFN $\gamma$ + et IL-2+ dans la moëlle DKO en comparaison de la moëlle témoin (Figure 2B). Ceci indique donc que l'augmentation de l'état inflammatoire observé à l'état basal dépend de facteurs extrinsèques, possiblement la quasi-absence de Treg.



**Figure 2 : La dérégulation des Tconv observée à l'état basal dépend de facteurs extrinsèques.** Schéma expérimental du modèle de chimère mixte moelle osseuse utilisé (A). Expression des cytokines par les Tconv CD45.2 après tri et restimulation en CD3/CD28 overnight détecté en cytométrie en flux (B)

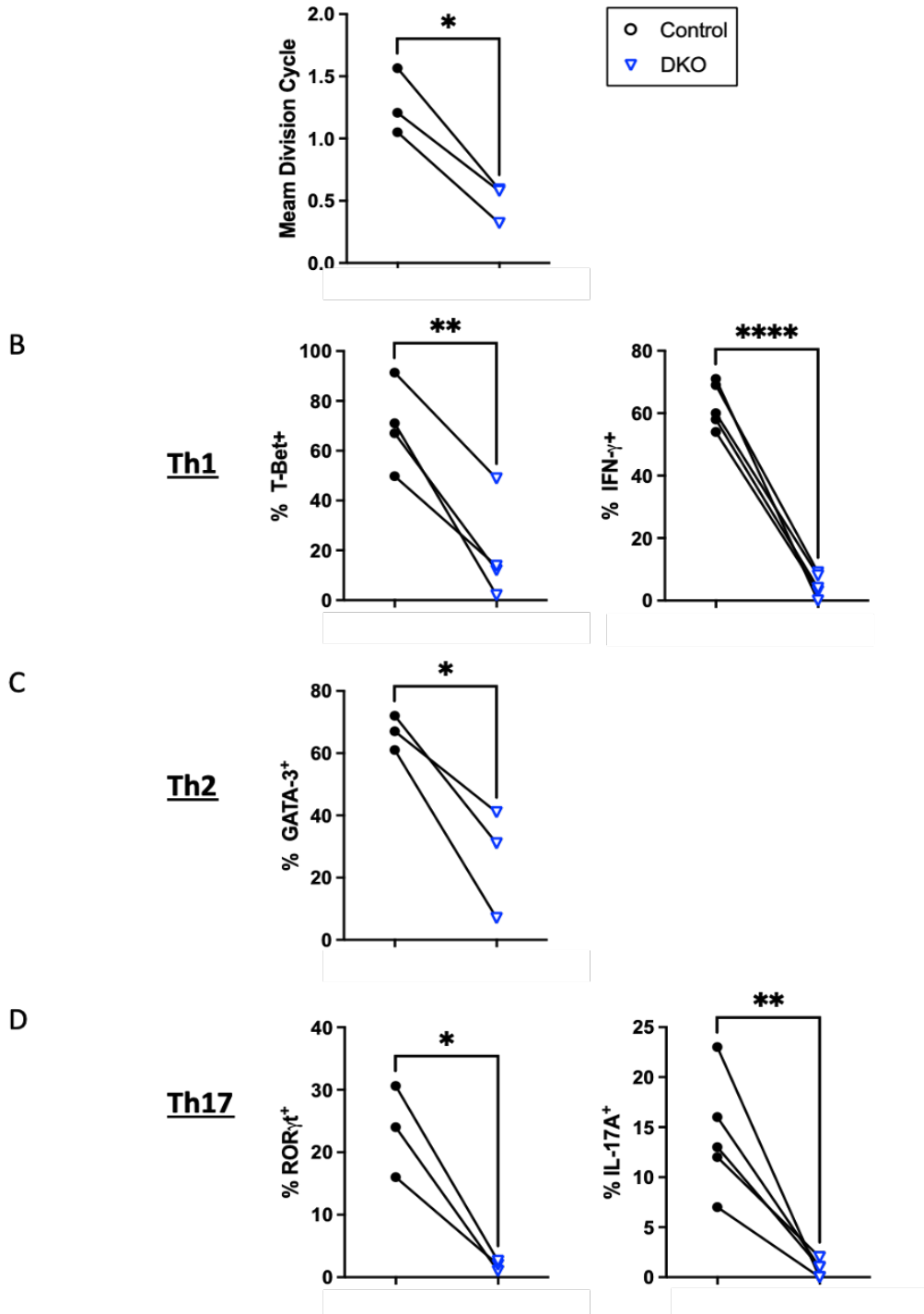
### 3. La délétion de c-Rel et RelA dans les LT bloque la différenciation en Thelper.

L'ablation de RelA nous a montré une fonction de cette sous-unité dans la différenciation des Th1 et Th17 *in vitro* ; néanmoins dans les cellules avec une déficience unique (SKO), il s'agit d'une baisse partielle de la polarisation plus que d'une absence totale. Afin de déterminer la possible redondance entre c-Rel et RelA dans la différenciation des Th, nous avons donc réalisé des tests de culture *in vitro* en utilisant des Tconv naïfs provenant de souris témoins et DKO. Dans un premier temps, nous avons regardé si la délétion conjointe de ces deux sous-unités pouvait influencer sur la capacité de prolifération des LT naïfs. La délétion entraîne une baisse significative de la prolifération, d'un facteur 2 (Figure 3A). Ce résultat est en accord avec les observations faites par Grummont *et al*, qui ont observé un défaut de croissance des LT DKO et un blocage au stade G1<sup>277</sup>. D'autre part, de façon frappante, la polarisation en Th1 et Th17 est abolie de façon quasi-complète dans les cellules DKO, que ce soit en termes d'expression de facteurs de transcription T-BET/ROR $\gamma$ t ou de cytokines IFN $\gamma$ /IL-17a (Figure 3B et D). L'expression de GATA-3 en conditions Th2 est également significativement diminuée (Figure

3C). Ces phénotypes plus marqués que dans les cellules déficientes seulement pour RelA, révèlent une redondance entre RelA et c-Rel dans ces modèles *in vitro*.

A

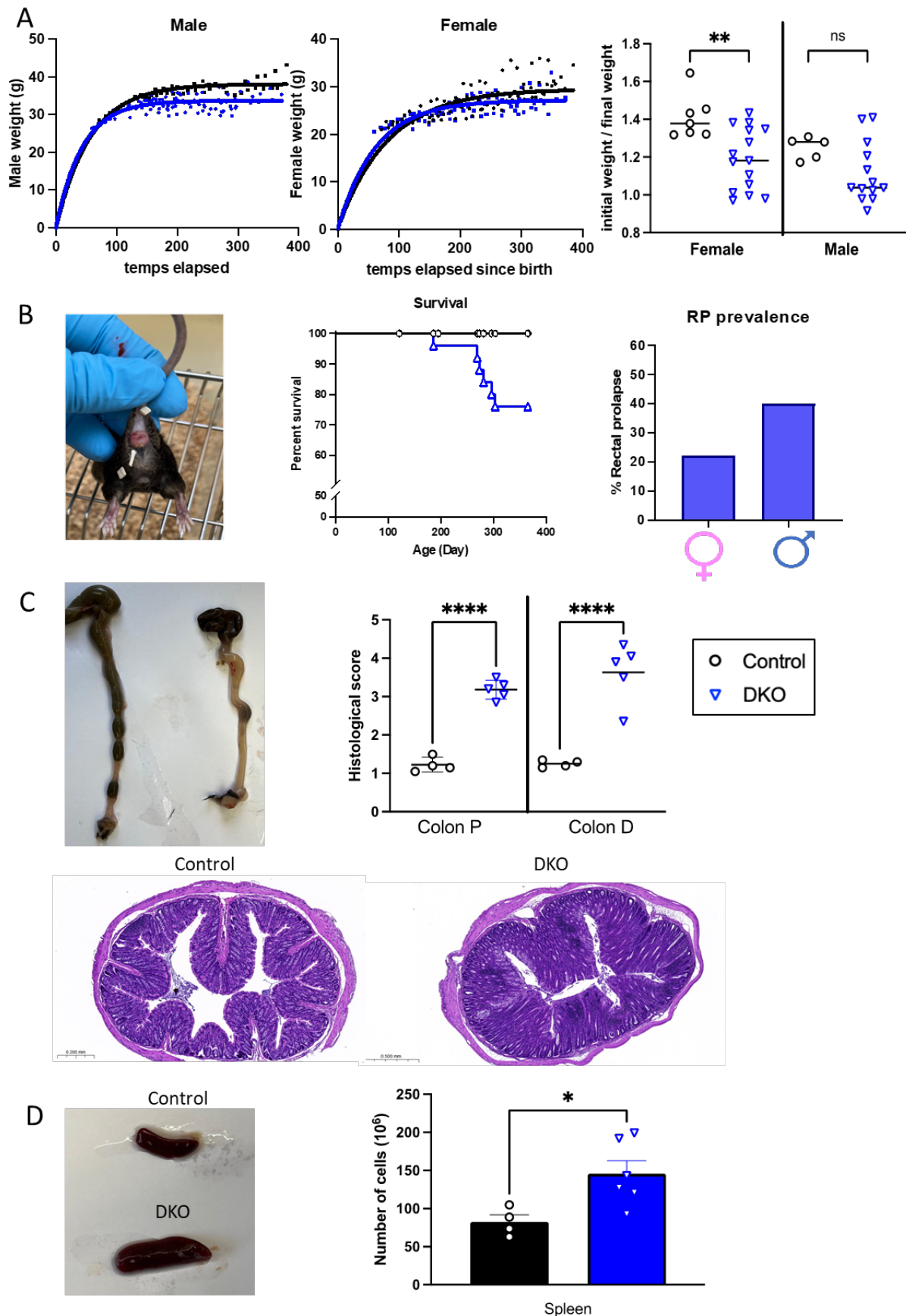
**Prolifération**



**Figure 3 : Contribution majeure de RelA et c-Rel dans la polarisation de Thelper *in vitro*.** Des LT naïfs de contrôle et de DKO ont été isolés et cultivés dans des conditions Th0 (A), Th1 (B), Th2 (C), Th17 (D) pendant 4 jours. Leur phénotype a été analysé par FACS après restimulation par PMA-ionomycine. Des t- tests pairés ont été utilisés.

#### **4. Syndrome inflammatoire spontané chez les souris DKO vieillissantes.**

En parallèle de ces expériences chez les souris jeunes, nous avons laissé vieillir une cohorte de souris témoins et DKO. De façon intéressante, 24% (6 souris sur 25) des souris DKO présentent spontanément un prolapsus rectal dès 6 mois après la naissance. Ceci est associé à une légère baisse de poids entre les groupes d'animaux. Les males semblent être plus sujet aux prolapsus rectaux que les femelles (Figure 4B). Ces prolapsus rectaux s'accompagnent d'une inflammation importante du colon proximal et du colon distal (Figure 4C). Plus spécifiquement, on note chez les souris DKO une infiltration lymphocytaire très marquée, une hyperplasie des glandes et parfois de la dysplasie accompagnée d'une quasi-disparition des cellules caliciformes. On note également la présence d'abcès, parfois des ulcérations et des zones fibrosés au niveau du colon des souris malades. Enfin, les souris DKO atteintes de prolapsus présentent une splénomégalie (Figure 4D).



**Figure 4 : Prolapsus Rectal spontané chez les souris DKO.**

Évolution du poids des souris au cours du temps en fonction de leur sexe, 34 souris ont été suivies. Les points représentent les poids des souris observés en g et une courbe d'extrapolation des poids de chaque génotype a été ajoutée (A). Visualisation du prolapsus rectal chez les souris DKO, courbe d'apparition du prolapsus rectal et prévalence des prolapsus rectaux chez les souris en fonction du sexe, 25 souris ont été étudiées (B). Inflammation du colon visible au

*niveau macroscopique et microscopique (images représentatives). Les scores d'inflammation ont été réalisés à partir de l'analyse des coupes de colons proximales et distales colorées à l'hématoxyline et à l'éosine et fixées au formaldéhyde. L'analyse a été effectuée en double aveugle selon l'échelle proposée par Ulrike Erben et al<sup>378</sup>. (C). Image représentative de splénomégalie observée chez les souris DKO ayant un prolapsus et compte en bleu trypan du nombre de splénocytes recueillis après dilacération des rates (D). Chaque point représente une souris ; des t-tests non pairés ont été utilisés.*

Les souris qui n'ont pas de prolapsus rectal ont également un phénotype altéré et un syndrome inflammatoire. Les analyses histologiques du colon distal des souris à 1 an sans prolapsus rectal, révèlent la présence d'une inflammation du colon modérée chez certaines souris (figure 5A). L'analyse en cytométrie en flux des LT des souris DKO révèle une altération de la distribution des différentes populations, ainsi qu'une altération de leur état d'activation. On observe notamment une diminution significative de la proportion des LT CD4 dans la rate et les ganglions et une très forte diminution de la proportion de LT CD8 dans presque tous les organes lymphoïdes. Cette diminution est particulièrement prononcée pour les LT CD8 et pour les Treg (Figure 5B). De même, une réduction des populations Tconv mémoire centrales (Tcm) et mémoire effecteurs (Tem) est observée dans la rate ainsi que dans les ganglions mésentériques des souris DKO (Figure 5C). Malgré l'absence de Treg, les Tconv des souris DKO semblent présenter une activation réduite. Néanmoins, après une restimulation polyclonale, ces Tconv DKO expriment des niveaux plus élevés de cytokines, notamment d'IFN $\gamma$ , de TNF $\alpha$  et d'IL-17a, dans de nombreux tissus (Figure 5D). On a, par exemple, une augmentation significative de l'infiltration des Th1 dans le Colon et l'intestin des souris DKO. En revanche, les LT CD8 DKO affichent un profil d'activation accru, avec une augmentation des populations Tem et Tcm dans la rate, les ganglions périphériques, mésentériques et les plaques de Peyer (Figure 5E). Ces LT CD8 DKO produisent également davantage de cytokines à la suite d'une restimulation polyclonale (Figure 5F).

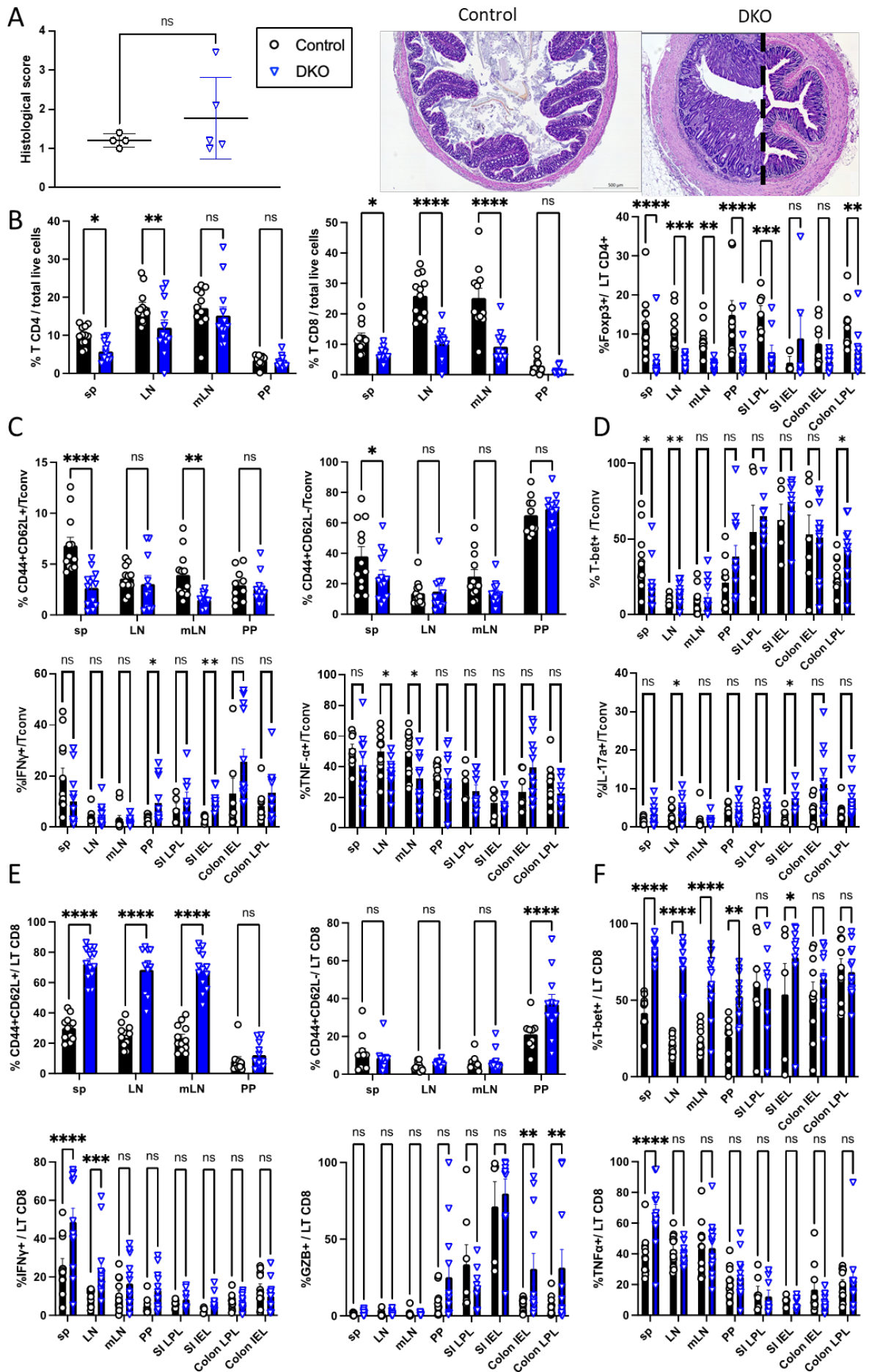


Figure 5 : Les souris à Ian sans prolapsus rectal ont un léger syndrome inflammatoire



Scores d'inflammation réalisés à partir de l'analyse des coupes de colons proximal et distal colorées à l'hématoxyline et à l'éosine et fixées au formaldéhyde. L'analyse a été effectuée en simple aveugle selon l'échelle proposée par Ulrike Erben et al<sup>378</sup>. Image représentative du colon-rectum des souris contrôles et DKO (A). La rate (spleen), les ganglions périphériques (LN), les ganglions mésentériques (mLN), les plaques de Peyer (PP), et les lymphocytes intra-épithéliaux (IEL) et de la lamina propria (LPL) du colon et de l'intestin de souris témoins et DKO ont été analysés par cytométrie de flux (B-F). Analyse de la proportion des LT CD4, des LT CD8 et des Treg (B) ; Analyse des Tconv effecteur mémoire (CD44+ CD62L-), central mémoire (CD44+ CD62L+) et naïfs (CD44- CD62L+) (C) ; Proportions de Tconv exprimant des cytokines (D) ; Analyse des LT CD8 effecteur mémoire (CD44+ CD62L-), central mémoire (CD44+ CD62L+) et naïfs (CD44- CD62L+) (E) ; Proportions des LT CD8 exprimant des cytokines (F) Les données FACS sont présentées comme la moyenne ± SEM; chaque point représente une souris ; des multiples t-tests ont été réalisés et la normalité a été vérifiée avec un test de Shapiro-Wilk.

## Discussion

Les données recueillies soulignent le rôle crucial joué par c-Rel et RelA dans la régulation des LT pour le maintien de l'homéostasie. Tout d'abord, l'inhibition conjuguée des deux sous-unités conduit à une diminution marquée de la proportion de LT, en particulier pour les LT CD8. Ce défaut pourrait être dû à un défaut de survie des LT dans les organes lymphoïdes secondaires, comme suggéré précédemment<sup>275-277</sup>. De plus, l'absence de l'activation des FT canoniques conduit à un défaut de prolifération *in vitro* et à une absence quasi-complète de polarisation en Th1 et Th17, renforçant ainsi nos données acquises chez les souris *Rela*-cKO. Concernant la suractivation des LT et l'inflammation spontanée observée chez certaines souris DKO, cela permet de mettre en évidence deux points cruciaux :

1- L'inflammation observée chez les souris DKO n'est pas un syndrome auto-immun léthal et n'est détectable que 6 mois après la naissance. Ceci est à mettre en opposition aux souris  $\text{Foxp3}^{\text{CRE}}\text{Rela}^{\text{FLOX/FLOX}}\text{Rel}^{\text{FLOX/FLOX}}$  dans lesquelles NF- $\kappa$ B n'est absent que dans les Treg, et qui développent un syndrome auto-immun systémique et léthal 3 semaines après la naissance, mimant le phénotype des souris *Scurfy* déficientes en Treg<sup>379</sup>. Cela démontre que la délétion de c-Rel et RelA dans les LT, tempère l'auto-activation/inflammation causées par l'absence de Treg car la fonction des Tconv et/ou des LT CD8+ est également impactée. Ceci souligne donc l'importance de la voie canonique de NF- $\kappa$ B dans l'activation des LT *in vivo*.

2- Malgré la déficience combinée en RelA et c-Rel, deux facteurs de transcriptions suggérés comme contrôlant l'activation et la production de cytokines par les LT, ceux-ci présentent quand même une expression élevée d'IFN $\gamma$  et d'IL-17a (mais pas d'IL-2), probablement du fait de l'absence de Treg. Ceci suggère que d'autres facteurs de transcriptions peuvent assurer l'activation et la fonction des LT, tels que NFAT, AP-1 ou Foxo.

Cette observation ouvre de nouvelles perspectives dans la compréhension des mécanismes d'auto-immunité et des potentialités thérapeutiques associées. Notre précédent travail suggère que cibler RelA dans les Tconv est une stratégie prometteuse dans le traitement de la SEP. A ce jour il n'existe aucune thérapeutique qui cible spécifiquement RelA pour autant ce travail souligne la nécessité absolue d'être spécifique. En effet, un ciblage non spécifique des deux sous-unités ou un ciblage de l'ensemble des LT risquerait d'aggraver les MAI étant donné que les LT déficient en c-Rel et RelA peuvent s'activer et entraîner un syndrome inflammatoire

## Discussion

### Rôle majeur de RelA à l'état basal

Nous avons montré qu'en condition basale RelA joue un rôle plus important que c-Rel dans le modelage transcriptionnel des LT. A l'état basal, nos souris ne présentent pas de phénotype particulier, n'ont pas de défauts de développement des Tconv dans le thymus et ont une organisation globalement normale des Tconv dans les organes lymphoïdes secondaires. Néanmoins, après stimulation CD3/CD28, RelA permet l'expression de plus de 800 gènes et en inhibe une centaine. Il module l'expression de nombreux marqueurs d'activation, de cytokines et de chimiokines. En comparaison, la suppression de c-Rel n'affecte l'expression que de 199 gènes, dont seulement 16 sont spécifiques de c-Rel. Toutefois, la faible quantité de gènes modulés par c-Rel pourrait être due à la temporalité de notre étude. Nous avons stimulé nos cellules pendant 4 heures mais certaines études indiquent que la régulation des gènes par c-Rel pourrait être plus tardive, comme suggéré récemment dans les LB et discuté plus bas.

Notre stratégie de CRISPR/Cas9 nous a permis de confirmer chez l'homme une partie des résultats obtenus chez la souris. RelA, davantage que c-REL, exerce un contrôle important du transcriptome des Tconv. Étonnamment, contrairement aux observations faites chez les patients et souris déficientes pour c-Rel, nous n'observons pas de déficit d'expression d'IFN $\gamma$  ou d'IL-2. Cette différence pourrait être due à des facteurs extrinsèques aux LT dans le contexte des souris et patients portant une mutation germinale de c-Rel. Une autre explication pourrait résider dans les limites de notre protocole expérimental, notamment la pré-activation des Tconv avant le CRISPR ce qui pourrait masquer certains effets de la délétion des sous-unités. Récemment Pinar Aksoy *et al*, ont publié un article avec un protocole d'électroporation et de CRISPR dans des LT humain non stimulé. Il serait donc intéressant de confirmer nos résultats avec cette méthode<sup>380</sup>.

Nos modèles de délétion conditionnelle des sous-unités dans les LT, nous ont aussi permis d'analyser plus finement leur contribution dans la polarisation en Thelper. Nous excluons notamment un rôle intrinsèque de c-Rel dans la polarisation en Th1 et Th2 comme cela avait pu être suggéré<sup>270,289,298</sup>. L'une des conclusions majeures de nos analyses est la fonction majeure de RelA dans la polarisation en Th17.

Dans les LT déficients en RelA, nous observons une baisse des LT ROR $\gamma$ t+ et IL-17A+ dans des conditions de culture standard et pathogénique. Nos analyses ChIP-seq montrent que RelA

est associé au locus de *Rorc*, mais pas à celui de *Il17a*. Cela suggère l'existence d'une action en deux temps, dans laquelle RelA induit ROR $\gamma$ t, qui lui-même contrôle IL-17a. Nous pourrions vérifier cette hypothèse avec des expériences d'expression ectopique de ROR $\gamma$ t dans nos LT normaux ou déficients en RelA. Si la différenciation Th17 dépend de RelA *via* ROR $\gamma$ t, comme nous le pensons, alors l'expression ectopique de ROR $\gamma$ t dans les LT déficients en RelA devrait abolir le défaut de différenciation.

De façon surprenante, dans notre laboratoire, la différenciation Th17 ne semble pas dépendre de c-Rel. Le rôle de c-Rel dans la polarisation Th17 *in vitro* est controversé, et les résultats obtenus pourraient notamment dépendre des conditions de stimulation des cellules naïves. Pour aborder cette hypothèse, nous avons testé l'effet de l'ablation de RelA ou c-Rel sur des cellules stimulées par anticorps immobilisés anti-CD3 et CD28 (Figure 13).

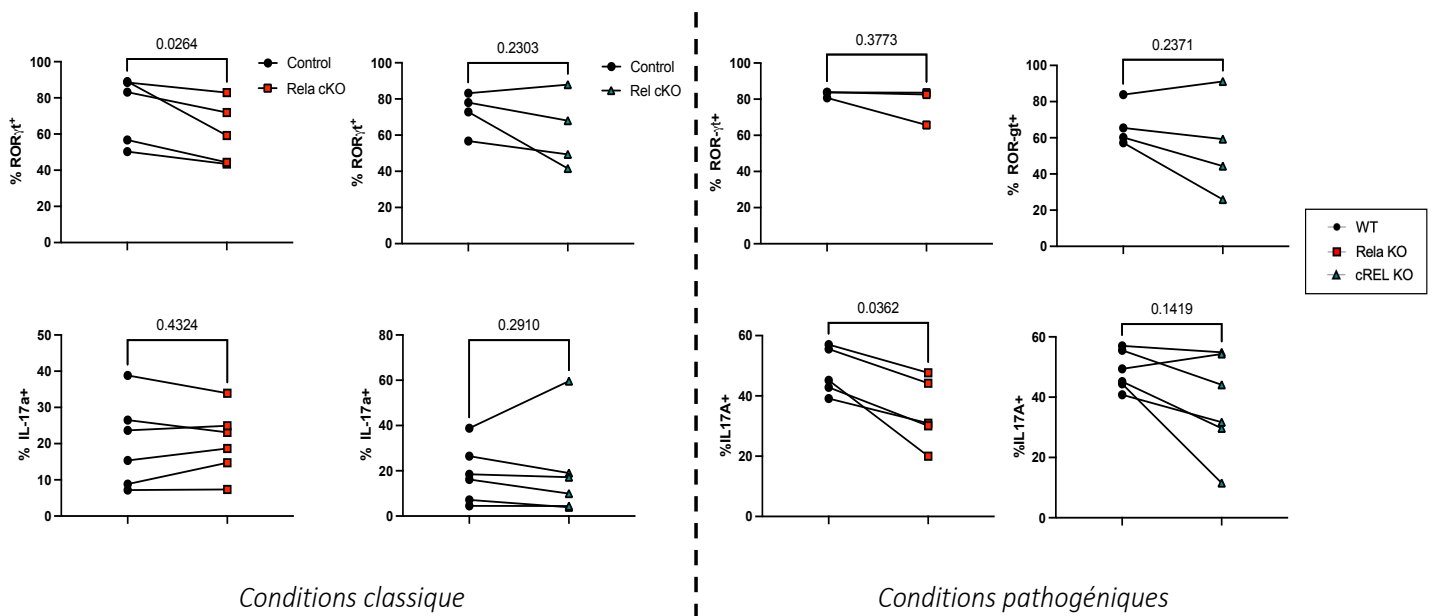


Figure 13 : Différenciation en Th17 avec une stimulation aCD3/aCD28 coaté

Nous pouvons voir que, quelles que soient les conditions, c-Rel semble dispensable à la différenciation Th17. En revanche, dans le cas d'une stimulation classique TGF $\beta$ /IL-6, les LT CD4 déficients en RelA ont une expression réduite de ROR $\gamma$ t mais normale de l'IL-17a alors que l'inverse est observé dans des conditions « pathogéniques » (TGF $\beta$ +IL6+IL-23+IL-1 $\beta$ +anti-IL-2). Ces données ne récapitulent pas entièrement nos observations faites en condition de stimulation anti-CD3 soluble+feeders (Article 1, Figure 3), suggérant que l'implication de RelA varie selon le type de stimulation. Cette différence pourrait être due à la puissance du

signal, à une costimulation différente, ou à un environnement de cytokines différent. Chacun de ces facteurs joue un rôle essentiel dans l'activation des diverses voies de signalisation du LT.

Enfin, une explication à la baisse de différenciation observée à la fois en Th1 et Th17 pourrait être, comme cela a précédemment été suggéré, que RelA serait nécessaire à la survie des cellules<sup>278-280</sup>. Nous avons donc mesuré la mort cellulaire par marquage AnnexineV 24h après le début de la polarisation pour identifier les cellules en apoptose. Aucune différence n'a été observée quelles que soient les conditions de culture (Figure 14). Le défaut de polarisation ne semble donc pas lié à un défaut de survie.

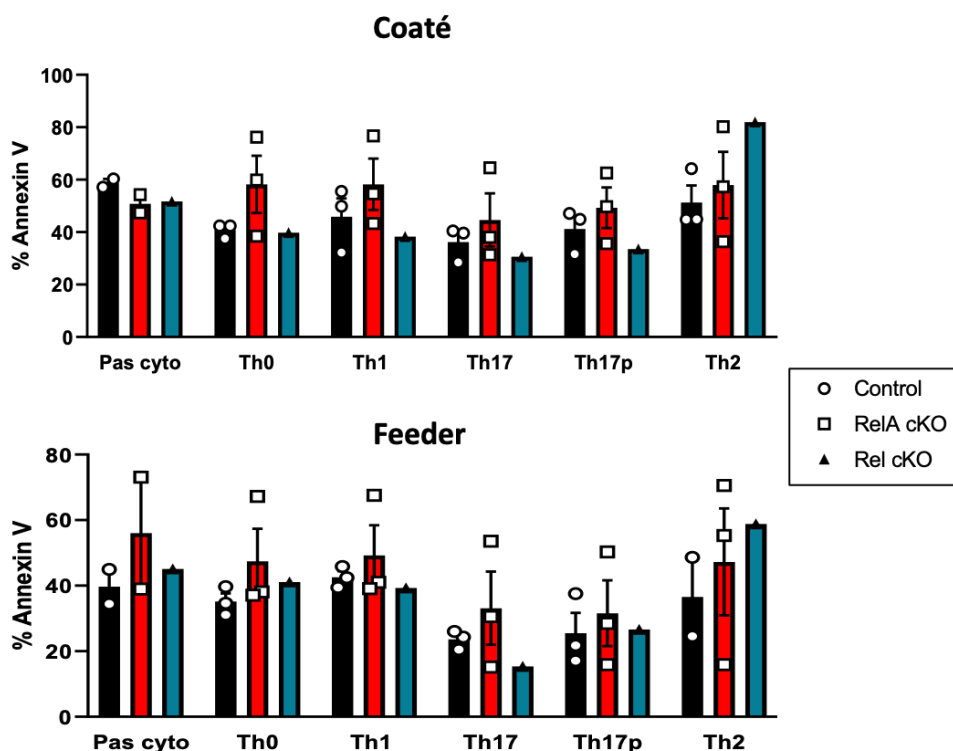


Figure 14 : Étude de l'apoptose, Pourcentage de Thelper exprimant l'Annexine V

Enfin, il aurait également été intéressant de confirmer le rôle de c-Rel et RelA chez l'homme dans la différenciation Th1/Th17. Malheureusement nous n'avons pas réussi à polariser en Th17 des LT naïfs issus de PBMC. Comme le suggèrent Annunziato *et al* dans leur revue, il est possible que les cellules isolées dans les PBMC ne soient pas assez naïves et ne puissent donc pas être différenciées en Th17<sup>381</sup>. Ainsi, certains auteurs utilisent des cellules issues de thymus ou de sang de cordon pour faire de la différenciation Th17<sup>381,382</sup>. Pour étudier le rôle de c-Rel et RelA dans la différenciation en Th17 chez l'homme nous pourrions essayer d'utiliser le protocole de CRISPR d'Aksoy *et al*, dans des cellules naïves provenant de sang de cordon ou de thymus mais cela reste compliqué à mettre en place.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux fonctions de c-Rel et RelA dans les LT dans différents contextes pathogéniques.

## **Fonctions de c-Rel et RelA *in vivo* dans un contexte pathologique**

### **Rôles dans l'immunité anti-tumorale**

Les Tconv sont désormais considérés comme des acteurs clés de l'immunité anti-tumorale, nous avons donc cherché à savoir quel est le rôle de c-Rel et RelA dans ce processus. Dans plusieurs modèles murins, l'ablation de c-Rel a conduit à une augmentation notable de la taille et du poids des tumeurs, alors que la suppression de RelA n'a aucun effet. Dans les Tconv infiltrant la tumeur, l'ablation de c-Rel entraîne une augmentation de la proportion de cellules naïves aux dépens de celles produisant des cytokines. c-Rel, plutôt que RelA, contrôle donc l'amorçage des Th1 et Tcytotoxiques antitumoraux, en dépit d'une implication minimale *in vitro*.

Cette découverte souligne l'importance de c-Rel dans la réponse immunitaire contre le cancer et sa potentialité en tant que cible thérapeutique. Néanmoins, la base moléculaire et le mécanisme exact d'action de c-Rel dans les Tconv restent encore à déterminer.

Nous pourrions par exemple déterminer si c-Rel est nécessaire à la fonction de « help » aux LT CD8, ou aux fonctions cytotoxiques directes des LT CD4. Pour ce faire, nous pourrions injecter des tumeurs dans des souris Rag<sup>-/-</sup> reconstituées avec des LT CD4 mais sans LT CD8 ou dépléter avec un anticorps les LT CD8 dans des souris *Rel-ciKO*.

D'autre part, il reste à déterminer clairement l'implication de c-Rel dans les Tconv infiltrant les tumeurs chez l'homme. Même si l'utilisation de signatures géniques c-Rel-dépendantes suggère une fonction dans la réponse aux anti-PD-1 dans divers cancers, cette analyse est biaisée par le fait que la signature est appliquée à des données de « bulk » RNA-seq, ce qui ne permet pas de conclure sur une fonction intrinsèque de c-Rel dans les Tconv. Pour explorer cette possibilité, nous prévoyons d'une part d'exploiter des données publiques de scRNA-seq, et d'autre part de mesurer l'impact de la translocation de c-Rel dans les Tconv, dans des échantillons de patients par immuno-fluorescence.

### **Rôles dans l'auto-immunité**

A l'inverse du cancer, nous observons un rôle majeur de RelA, mais pas de c-Rel, dans la fonction des Tconv au cours de l'EAE. Dans le SNC mais pas les ganglions drainants, l'ablation de RelA entraîne des changements spectaculaires dans la distribution des cellules. Nous avons constaté un fort enrichissement en LT « naïfs » chez les souris *Rela-cKO*, au détriment des

Th17 et Th17p, ce qui confirme le rôle critique de RelA dans la polarisation des Th17. Il est important de noter que, bien que la proportion de Th17 soit réduite chez les souris *Rel-cKO*, la proportion de Th17p est inchangée, ce qui pourrait expliquer l'absence de protection contre la maladie.

De façon étonnante dans le SNC des souris *Rel-cKO*, un groupe spécifique de Tconv présentant à la fois des marqueurs d'épuisement (*Tox*, *Lag3* et *Lag4*) et de cytotoxicité (*Gzmk*, *Gzmb*, *Eomes*, *Klrd1*) a été détecté. Il serait intéressant de regarder si ces cellules sont effectivement cytotoxiques et pourraient participer à la maladie ou au contraire si elles sont réellement épuisées *in vivo* ou *in vitro*. Il serait ainsi intéressant de mieux les caractériser. Pour ce faire nous pourrions les trier, les restimuler avec du MOG<sub>35-55</sub> et étudier leurs sécrétions de cytokines et leur prolifération *ex vivo*. Nous pourrions également les trier et les réinjecter pour voir si elles sont capables d'induire une neuro-inflammation dans une souris non immunisée. Néanmoins le nombre limité de cellules est un obstacle non négligeable à ce design expérimental. A l'inverse, si ces cellules sont épuisées, il serait extrêmement intéressant de mieux les caractériser. Le phénomène d'épuisement des LT CD4 est peu compris mais a déjà été mis en évidence, notamment dans les infections<sup>383,384</sup>. Ainsi Hwang *et al*, mettent en évidence que non seulement les LT CD4 s'épuisent au cours d'une infection chronique aux toxoplasmoses, mais également que ce dysfonctionnement est plus prononcé que celui des LT CD8. De façon similaire aux LT CD8, les LT CD4 épuisés expriment des niveaux élevés de récepteurs inhibiteurs multiples et une fonctionnalité réduite<sup>383</sup>. Bien que l'épuisement des Tconv dans l'auto-immunité soit peu étudié, un certain nombre de travaux proposent un potentiel impact thérapeutique de ce mécanisme<sup>362,385,386</sup>. Par exemple, l'équipe de V. Kuchroo montre que Bat3 agit comme un inhibiteur de l'épuisement des Tconv Th1 dans l'auto-immunité. La déficience en Bat3 favorise un phénotype d'épuisement profond, supprimant la neuro-inflammation médiée par les LT dans l'EAE<sup>385,386</sup>. Ainsi, si nous avons effectivement l'apparition d'une population épuisée dans les LT déficients en c-Rel, nous pourrions regarder la cinétique d'apparition de cette population (augmentation de la proportion de cellules épuisées au cours du temps) et confirmer par des expériences *in vivo* et *in vitro* l'épuisement.

Le modèle *in vivo* utilisé au cours de ma thèse ne permet pas d'étudier le rôle de l'absence de c-Rel dans les Tconv au cours de la rechute mais d'autres modèles sont disponibles. Nous pourrions, par exemple, utiliser un modèle d'EAE passive (transfert de LT déficients en c-Rel d'une souris immunisée ou de LT transgéniques 2D2 déficient en c-Rel) ce qui permettrait de voir si les LT *Rel-cKO* sont encore pathogéniques ou s'ils vont s'épuiser sur le long terme. De même, nous pourrions utiliser un modèle d'EAE active dans un fond SJL, qui mime la cinétique rémission/rechute, pour étudier l'effet de la délétion sur les phases tardives de la maladie.

La possible mise en évidence de c-Rel comme un inhibiteur de l'épuisement des Tconv dans l'EAE, ferait de c-Rel une cible thérapeutique intéressante dans l'auto-immunité, et son blocage pourrait entraîner l'épuisement cellulaire et ainsi réduire le risque de rechutes dans la SEP-RR. Il faudra cependant être vigilant lors du blocage de c-Rel car il est crucial pour la fonction des Treg, son blocage pourrait donc entraîner un moins bon contrôle des Tconv par les Treg<sup>330,379</sup>. Toutefois, nous ne voyons pas de signature épuisée dans les TILs déficients en c-Rel. Pourtant l'exhaustion a également été largement décrite dans le cancer et fait l'objet de nombreuses études<sup>165,387,388</sup>. Si l'ablation de c-Rel dans les Tconv entraîne de l'épuisement dans un contexte auto-immun, pourquoi ne semble-t-il pas l'induire également dans un contexte cancéreux ? Cela peut être dû à une multitude de facteurs. Premièrement le microenvironnement est très différent entre ces deux contextes ce qui peut conduire à une activation différente des LT. Par exemple le microenvironnement tumoral a de nombreuses particularités biochimiques (pH acide, vascularisation limitée et donc disponibilité en nutriment et O<sub>2</sub> limité) et cellulaires (certaines cellules comme les CAF ou les TAM sont uniquement retrouvés dans le microenvironnement tumoral) qui vont influencer l'activation des LT<sup>389</sup>. L'environnement cytokinique sera également très différent entre le tissu inflammé et le microenvironnement tumoral<sup>389</sup>. La cellule tumorale sera également capable d'exprimer des ligands particuliers comme des activateur des points de contrôle immunitaire. L'ensemble de ces signaux va entraîner une signalisation cellulaire différente de celle du microenvironnement auto-immun. Enfin la nature des antigènes activateur, la force du signal activateur et la cinétique de stimulation des LT est probablement unique ce qui entraînera une signalisation distincte dans les LT.

Finalement, nous avons montré un rôle spécifique de RelA dans un seul modèle d'auto-immunité, l'EAE. Il serait intéressant de vérifier la fonction de c-Rel et RelA dans d'autres modèles d'auto-immunité. Plusieurs autres modèles d'auto-immunité existent en fond C57BL/6 :

- l'arthrite induite par collagène (CIA) : elle reprend le même principe que l'EAE, les souris sont immunisées contre le collagène de type II et l'inflammation est médiée par les Th17<sup>390</sup>. Cette immunisation entraîne une inflammation des articulations conduisant à une érosion cartilagineuse et osseuse. Nous pourrions vérifier et confirmer nos résultats dans ce modèle ou celui de la thyroïdite auto-immune.
- la thyroïdite auto-immune expérimentale (EAT): Pour induire l'EAT, les souris sont immunisées avec de la thyroglobuline ou de la Thyroid peroxidase<sup>391,392</sup>. L'inflammation de la thyroïde est médiée par les LT CD4 (probablement les Th17) entraînant une destruction des cellules thyroïdiennes<sup>393-395</sup>. De même, il s'agit d'un modèle avec immunisation qui pourrait permettre de confirmer nos résultats.



Il serait également extrêmement intéressant d'examiner les rôles de c-Rel et RelA dans la fonction pathogénique des LT dans des modèles d'auto-immunité ayant une physiopathologie différente.

- la colite, par exemple, sert de modèle pour les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), telles que la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse. Un modèle de colite couramment utilisé est la colite induite par transfert de LT CD4. Des LT CD4 naïfs sont transférés dans des souris immunodéficientes. Ces LT s'activent en réponse à la flore intestinale et aux antigènes du soi, provoquant une inflammation importante. Les Th1 et Th17 jouent un rôle central dans la médiation de l'inflammation intestinale<sup>396,397</sup>. Il serait donc intéressant de regarder dans ce modèle le rôle de c-Rel et RelA dans la fonction pathogénique des LT.

-Et la dermatite atopique : plusieurs modèles de dermatite existent médiés par des types cellulaires différents. La dermatite atopique induite par l'application topique d'OVA est par exemple médiée par les Th2<sup>398,399</sup>. *In vitro* nous voyons un potentiel rôle de RelA dans la différenciation Th2 il serait donc intéressant de le confirmer *in vivo* avec ce modèle.

### **Y-a-t-il un lien entre NF- $\kappa$ B et le microbiote ?**

Ces dernières années, de plus en plus d'études mettent en avant le rôle de l'environnement, notamment celui du microbiote, dans la réponse immunitaire anti-tumorale et auto-immune<sup>400-403</sup>. NF- $\kappa$ B pouvant être activé par divers micro-organismes, tels que les virus, bactéries, et parasites<sup>404</sup>, cela le place comme un acteur potentiellement central dans le dialogue avec notre microbiote. Lorsque les composants du microbiote sont détectés par notre système immunitaire intestinal, une réponse transcriptionnelle s'ensuit qui détermine le résultat de cette interaction entre le microorganisme et l'hôte. Elle est essentielle pour maintenir l'équilibre entre l'homéostasie et l'inflammation. A ce stade les sous-unités de NF- $\kappa$ B jouent un rôle crucial dans le maintien de l'équilibre entre la tolérance à l'égard du microbiote commensale et l'inflammation en réponse à une dysbiose ou à une invasion pathogène. La reconnaissance des microorganismes se fait par les PRR (Pattern de Recognition Receptors) qui détectent les structures moléculaires conservées des pathogènes, les PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns). L'activation de ces PRR comme les TLR (Toll Like Receptors), les récepteurs de type NLR (Nucleotide-binding oligomerization Like Receptors) et RLR (RIG-I-like receptor), suivent des voies distinctes qui convergent vers l'activation des sous-unités de NF- $\kappa$ B suggérant un rôle central de NF- $\kappa$ B dans la réponse de l'hôte aux micro-organismes<sup>393,405,406</sup>. Ce lien particulier entre la reconnaissance des micro-organismes et l'activation de NF- $\kappa$ B est d'ailleurs connu depuis longtemps car dès 1986 Baltimore *et al*, montrent que les lipopolysaccharides (LPS) bactériens sont des inducteurs majeurs de NF- $\kappa$ B<sup>187</sup>. Ainsi, au cours de l'évolution, les pathogènes viraux, bactériens et parasitaires ont collectivement acquis un impressionnant

répertoire de molécules qui ciblent presque tous les membres de la voie de signalisation du NF- $\kappa$ B<sup>404</sup>. Cela permet de maintenir un équilibre délicat entre l'activation et l'inhibition de cette voie. L'ensemble de ces résultats montrent que le microbiote peut communiquer avec notre SI *via* NF- $\kappa$ B. Notre SI peut également réguler le microbiote *via* NF- $\kappa$ B. Ainsi, Luu *et al*, observent une expansion excessive des bactéries filamenteuses segmentées (SFB) dans l'intestin grêle des animaux dépourvus de c-Rel (ainsi qu'une altération de la production d'IL-17a, d'IL-21 et d'IgA)<sup>317</sup>. En résumé, NF- $\kappa$ B est un acteur clé dans la régulation de l'interaction entre le système immunitaire et le microbiote intestinal.

Nous observons des différences phénotypiques des Tconv dans les souris *Rel-cKO* qui pourraient être liées au microbiote ; aussi étudier plus en détail ce phénomène pourrait faire l'objet de futurs travaux. L'ensemble de nos expériences *in vivo* ont été réalisées au CRCL dans une animalerie SOPF (Exempt d'agents pathogènes spécifiques) sur des modèles murins où l'environnement est contrôlé. Dans ces expériences les souris *Rel-cKO* ne sont pas protégées contre l'EAE (résultats également vérifiés aux Etats-Unis dans une animalerie SOPF). Néanmoins nous avons observé une protection contre l'EAE chez les souris *Rel-cKO* provenant d'une animalerie avec des conditions moins stériles SPF (Sans Pathogènes Spécifiques) (Figure 15). Cela suggère que la fonction de c-Rel peut varier selon les conditions environnementales. Nous pourrions poser l'hypothèse que c-Rel est nécessaire dans les LT pour la communication avec le microbiote. En effet, la délétion de c-Rel pourrait altérer cette communication soit en entraînant une dysbiose soit en altérant la capacité des LT à détecter les signaux envoyés par le microbiote. Dès lors, explorer les modes de régulation de NF- $\kappa$ B dans les LT en lien avec le microbiote s'avère être une piste de recherche pertinente.

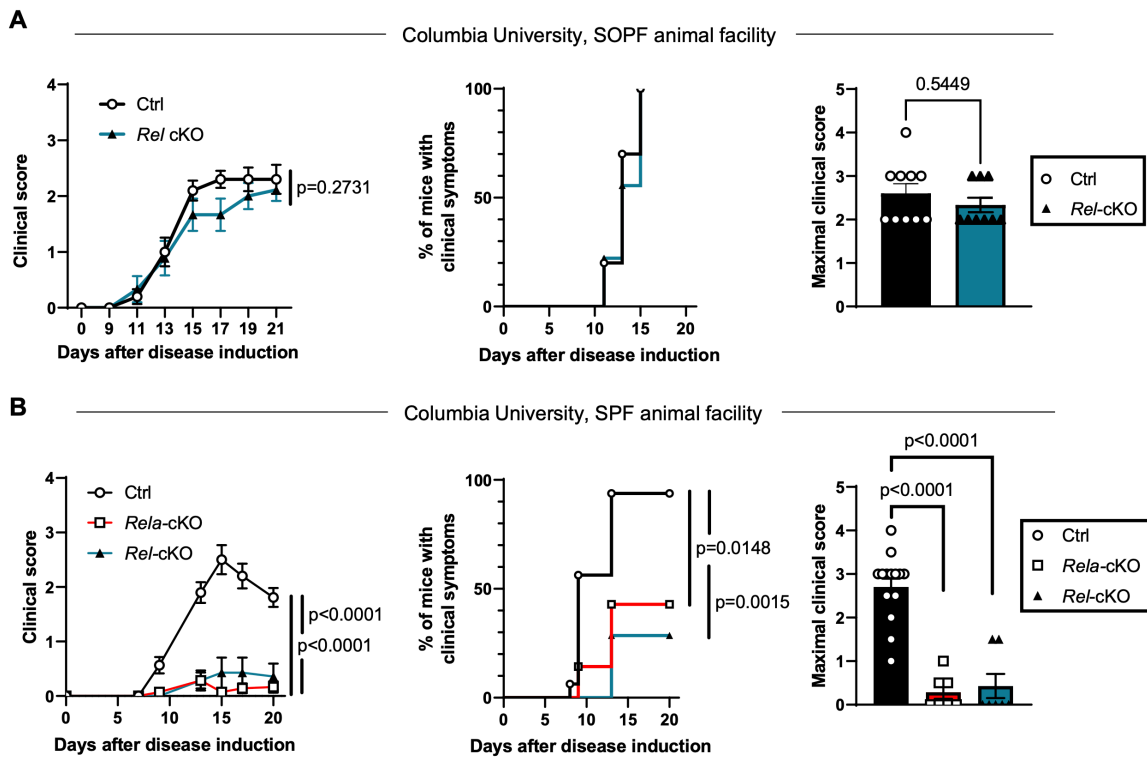


Figure 15 : Impact de l'environnement sur le phénotype des souris Rel-cKO  
 Les souris élevées dans une animalerie SOPF ne sont pas protégées contre l'EAE alors que celles élevées dans une animalerie SPF le sont.

Pour ce faire nous pourrions regarder, dans un premier temps, à l'état basal, si la délétion des sous-unités de NF- $\kappa$ B entraîne une modification des sous-populations de Thelper et Tc dans le système digestif des souris dans un environnement SPF et SOPF. Si nous observons des modifications il serait intéressant de déterminer sur le plan mécanistique comment le microbiote « communique » avec les LT. Est-ce de façon directe *via* les TLR ou est-ce de façon indirecte ? Grâce à quelles molécules cette communication se fait-elle ?

Dans un second temps, nous pourrions étudier dans un contexte pathologique si NF- $\kappa$ B est nécessaire à la fonction des LT dans le maintien de l'homéostasie dépendant du microbiote. Il a été montré que le microbiote impacte le priming des LT pathogéniques dans l'EAE<sup>134,407</sup>. Ainsi les souris GF (Germ Free) ou traitées par des antibiotiques oraux (et non en intra-péritonéale) ont moins de Th17p et sont protégées contre l'EAE<sup>136,407,408</sup>. La colonisation par certains micro-organismes comme les lactobacillus ou les SFB peuvent même moduler la sévérité de la maladie<sup>407,409</sup>. De même les patients atteints de SEP ont une dysbiose<sup>410,411</sup>. Ces études soulignent le rôle du microbiote dans la fonction pathogénique des LT. Cependant est-ce que cette pathogénicité conférée par le microbiote est dépendante de NF- $\kappa$ B ?

Si c-Rel est nécessaire à la fonction pathogénique des LT induite par le microbiote, 2 hypothèses peuvent expliquer ce phénomène :

-La première hypothèse est que ces différences phénotypiques sont liées à une dysbiose causée par l'ablation de c-Rel dans les LT. Pour la vérifier, nous pourrions procéder à un séquençage

et comparaison du microbiote des souris *Rel-cKO* et témoins ou entre les souris *Rel-cKO* SPF et *Rel-cKO* SOPF. S'il y a une dysbiose il serait intéressant d'une part d'élucider le mécanisme à l'origine de celle-ci et d'autre part de vérifier si elle est à l'origine de la protection. Une absence/altération du SI adaptatif peut altérer la composition du microbiote comme le montre le papier de Zhang *et al*, qui met en évidence une dysbiose dans les souris *Rag1*<sup>-/-</sup><sup>412</sup>. Plus précisément, la déplétion des LT CD4 et LT CD8 entraîne également une dysbiose<sup>412</sup>. Concernant les mécanismes possibles à l'origine d'une dysbiose médiée par les Tconv, elle peut dépendre des IgA produites de manière dépendante des LT. Les Tfh sont particulièrement importants pour la production d'IgA et pour la régulation du microbiote<sup>413</sup>. L'absence d'IgA chez la souris entraîne une régulation à la hausse des mécanismes de défense des épithéliums intestinaux modifiant ainsi la composition du microbiome<sup>414</sup>. De même, l'affaiblissement des Tfh résultant de l'absence d'expression du corécepteur PD-1 ou du récepteur ionotrope ATP-gated P2RX7 qui entraîne une altération de la composition du microbiote intestinale<sup>415,416</sup>. Les Th17 vont, quant à eux, stimuler la sécrétion de peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales et jouer sur leur étanchéité et peuvent donc également être impliqués dans la régulation du microbiote<sup>44</sup>. Les Treg sont également cruciaux pour le maintien de l'homéostasie dans l'intestin, leur absence entraînant une inflammation intestinale et une dysbiose<sup>417,418</sup>. Enfin les LT CD8 peuvent également réguler le microbiote mais le mécanisme exacte de cette interaction reste à déterminer<sup>419,420</sup>. Ainsi, une dysbiose pourrait être causée par une altération des fonctions Treg, Tfh, Th17 et même des LT CD8. Pour déterminer si une dysbiose est à l'origine de la protection nous pourrions transférer des fèces de souris *Rel-cKO* SPF dans des souris *Rel-cKO* SOPF ou WT SPF puis induire l'EAE et regarder si les souris *Rel-cKO* SOPF ou WT SPF sont protégées grâce à ce nouveau microbiote. Enfin, si nous observons une protection dépendante du microbiote nous pourrions identifier le ou les microorganismes à l'origine de cette protection, notamment par comparaison des espèces bactériennes dans les fèces.

-la seconde hypothèse est que c-Rel est intrinsèquement nécessaire dans le LT à son priming par le microbiote. Il faudrait alors essayer d'élucider le mécanisme de communication entre le microbiote et le LT. Les Tconv murins peuvent exprimer plusieurs TLR (les TLR2, TLR3, TLR4, TLR9 et potentiellement le TLR5) et les ligands TLR peuvent agir comme des molécules de costimulation dans les LT CD4<sup>421,422</sup>. Ainsi les LT CD4 *MyD88*<sup>-/-</sup> ont un défaut de prolifération *in vivo* et *in vitro*<sup>421,423</sup>. *In vitro*, les LT déficients en *MyD88* ont une capacité réduite à sécréter de l'IL-17 et montrent un défaut de différenciation Th17<sup>421,423</sup>. *In vivo* l'absence de *MyD88* dans les cellules CD4<sup>+</sup>CD45Rb<sup>high</sup> entraîne une protection contre la colite<sup>421</sup>. Ces résultats suggèrent un rôle de la signalisation TLR dans les fonctions des LT. Cela montre également que potentiellement les Tconv peuvent communiquer avec le microbiote grâce à leurs TLRs. De même la régulation du microbiote par les Treg dépend de *MyD88*, ainsi

la déplétion de MyD88 dans les Treg entraîne une dysbiose liée à un défaut de l'axe Tfh-Tfr-IgA et une expansion des Th17<sup>424</sup>. Il est donc également probable que le microbiote puisse réguler les Treg *via* des ligands des TLR. Afin de déterminer si cette régulation est directe ou indirecte nous pourrions réaliser des expériences de culture/coculture. Par exemple, cultiver des LT soit directement avec les bactéries, soit avec du surnageant de bactéries et regarder si cela entraîne une modification de translocation/activation de c-Rel. De même, *in vivo* nous pourrions regarder avec une colite induite par DSS si les Tconv déficients en c-Rel sont capables de réguler l'inflammation causée par la translocation du microbiote.

### **Limite *in vivo* de la délétion inducible**

Une possible limite des modèles de délétion inducible mis en place pour nos expériences est l'utilisation de Tamoxifène. Bien que nos expériences dans l'auto-immunité et dans le cancer aient été vérifiées dans plusieurs modèles, le Tamoxifène peut avoir des effets immunomodulateurs ce qui pourrait introduire un biais<sup>425,426</sup>. En effet, le tamoxifène pourrait impacter la fonction des Tconv en induisant un shift Th1 vers Th2 et en modulant leurs proliférations<sup>426,427</sup>. Par exemple, lorsqu'ils sont traités avec du Tamoxifène, les splénocytes (issus de souris dotées d'un TCR transgénique réagissant spécifiquement au MBP et stimulés avec du MBP) montrent une modification importante dans la production de cytokines<sup>428</sup>. Bien que nous ayons utilisé des contrôles si le tamoxifène signale dans le LT *via* NF- $\kappa$ B il est possible d'avoir un biais dans les expériences réalisées avec les souris CreERT2. Cela a également posé des difficultés dans les expériences d'EAE car le traitement des souris contrôles avec du tamoxifène entraîne une protection contre la maladie (vérifié au labo et montré par Bebo *et al*<sup>428</sup>).

### **Comment expliquer ces différences de fonctions entre RelA et c-Rel ?**

Grâce à nos modèles *in vitro*, ainsi que ceux *in vivo* dans le cancer et l'auto-immunité nous avons montré que c-Rel et RelA ont une fonction spécifique en fonction du contexte pathogénique. Cependant la base moléculaire/le mécanisme exacte conduisant à l'activation d'une sous-unité plutôt qu'une autre reste à déterminer. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer cette spécificité d'activité :

-une première hypothèse serait que malgré des structures proches c-Rel et RelA se lient à des gènes différents. Néanmoins, du fait de l'absence d'anticorps adapté, aucun ChIP-seq de c-Rel dans les Tconv de souris, n'a pu être réalisé à ce jour. De plus, les précédentes expériences de ChIP-seq pour RelA ont été réalisées avec une stimulation *in vitro*<sup>221,379</sup>, il serait plus intéressant

de les réaliser *in vivo* dans un contexte auto-immun ou de cancer. Afin de pallier au manque d'anticorps spécifiques et suffisamment sensibles contre c-Rel, nous développons actuellement une souris dans laquelle une version fusion de c-Rel et d'un Flag-Tag sont exprimés sous le contrôle du promoteur de c-Rel. Ceci permettra d'utiliser un anticorps anti-Flag, très spécifique et efficace, en lieu et place d'un anticorps anti-c-Rel. *In vivo*, réaliser un ChIP-seq serait compliqué étant donné le nombre important de cellules nécessaires mais une expérience de CUT & Tag ou CUT&Run, nécessitant beaucoup moins de matériel, pourrait être réalisée sur les TILs ou le SNC.

-Dans les LB, une élégante étude de ChIP-Seq a récemment montré que le nombre de gènes sur lesquels c-Rel se lie est faible après une heure de stimulation mais augmente drastiquement à 18 h. Une analyse du transcriptome montre que les effets les plus importants du déficit en RelA ont été observés à 1h tandis que ceux de c-Rel sont observés à 4 h et 18 h<sup>209</sup>. Cette régulation plus tardive des gènes par c-Rel pourrait expliquer pourquoi si peu de gènes sont différentiellement exprimés dans nos LT *in vitro* à l'état basal. Ainsi, il pourrait être intéressant d'analyser la cinétique de translocation de c-Rel et RelA dans les LT (en IF ou en WB après fractionnement) pour déterminer la temporalité optimale. Dans un second temps nous pourrions réaliser des analyses RNA-seq sur les temps présélectionnés afin d'étudier la régulation génique au cours du temps. D'autre part, dans cet article, il semble que la séquence consensus de liaison de RelA et c-Rel à l'ADN soit identique, excluant une spécificité à ce niveau. Des résultats similaires avaient précédemment été décrits dans des lignées de lymphomes<sup>429,430</sup>.

-une autre hypothèse possible est que la composition des dimères, la compétition entre eux et/ou leur association à d'autres régulateurs transcriptionnels puissent influencer le motif de liaison préféré<sup>209,431</sup>.

-enfin une dernière hypothèse qui pourrait expliquer l'activation sélective de RelA et c-Rel est la différence de stimuli activateur (*in vitro* ou dans le SNC et la tumeur). Le type, la durée et la force de stimulation ainsi que les différents récepteurs de surface impliqués (TCR, CD28, membres de la super-famille TNFR et autres récepteurs de cytokines) pourraient *in vivo* diriger la translocation préférentielle et la liaison à l'ADN d'une sous-unité donnée, ou modifier l'association à d'autres facteurs de transcription<sup>432,433</sup>. Il a par exemple été proposé que la réponse transcriptionnelle induite par l'activation de NF-κB dépend de l'amplitude et du schéma temporel de l'activité signalétique ce qui pourrait expliquer les différences observées<sup>433-436</sup>. Plus précisément, il a été récemment montré dans des macrophages que la vitesse d'activation, l'amplitude de l'activation, la nature oscillatoire du signal, l'activité globale, la durée et la fraction de l'activité (tardive ou précoce) impactent la réponse transcriptionnelle de RelA<sup>432</sup>. Cela a été montré par Adelaja *et al*, en stimulant de macrophages, issues d'une souris transgénique rapportrice (mVenus-RelA), par différents activateurs de NF-κB (comme TNFα, LPS, CpG...) permettant ainsi d'analyser la dynamique d'activation de RelA.

Dans notre cas, nous pourrions également étudier la dynamique d'activation de RelA et de c-Rel dans les LT lors des différentes conditions de culture et de polarisation. Nous pourrions par exemple étudier les cinétiques de translocation dans les Tconv par IF (après marquage avec un anticorps ciblant c-Rel et RelA) et leur activation par des EMSA ou TransAM. Cela pourrait aider à clarifier certains résultats ambigus/discordant rencontrés dans la littérature ou au laboratoire, en spécifiant la fonction de RelA et c-Rel en fonction des stimuli appliqués.

## Ciblage thérapeutique

Enfin, nos travaux soulignent la possibilité de mettre en place un ciblage thérapeutique spécifique en fonction des conditions pathologiques. L'inhibition de la voie canonique de NF- $\kappa$ B par des inhibiteurs d'IKK dans l'auto-immunité ou le cancer montre des résultats encourageants<sup>368,437</sup>. Néanmoins, très peu de composés ont atteint les phases avancées des essais cliniques, en raison d'un manque d'efficacité et/ou d'une toxicité élevée<sup>437</sup>.

Ces échecs sont possiblement dus, en partie, à l'absence de ciblage sélectif de sous-unités de NF- $\kappa$ B. Nos données pourraient ouvrir la voie à une thérapie plus ciblée et donc avec moins d'effets indésirables. Dans le cadre de l'auto-immunité, l'inhibition de RelA semble être une solution prometteuse, au moins dans les phases initiales de la maladie ou pendant les phases de rémission, en prévention des rechutes, de la SEP-RR.

La première étape vers une application thérapeutique est de valider *in vitro* chez l'homme nos résultats. Nous pourrions regarder si le traitement de LT (issus de PBMC ou de LCR) de patients atteint de SEP avec un inhibiteur de RelA permet de diminuer les fonctions Th17p. Peu d'inhibiteurs spécifiques de RelA sont actuellement disponibles mais Takada *et al*, ont développé un peptide qui bloque la translocation de RelA<sup>438</sup>. Nous pourrions donc l'utiliser pour des études préalables *in vitro*.

*In vivo* l'administration du peptide uniquement au LT est complexe et nécessite de trouver une modalité de délivrance sélective et sûre. Plusieurs stratégies sont envisageables pour atteindre cet objectif :

-la première consiste à utiliser un système anticorps conjugués à un médicament (ADC). Bien que généralement ils soient utilisés pour délivrer des molécules cytotoxiques dans le cadre de thérapie anti-tumorale, on pourrait utiliser ce système pour délivrer notre inhibiteur directement aux LT. Une fois liés à son antigène l'ADC est internalisée, et l'inhibiteur de RelA est ensuite libéré à l'intérieur du LT. Bien que cette approche soit prometteuse, il faut être vigilant sur le choix de l'antigène cible (ici nous pourrions cibler CD3, CD4) et sur le choix du « linker ». En effet, il faut que notre linker soit stable afin d'éviter le relargage de l'inhibiteur dans la circulation générale mais qu'il permette la libération de l'inhibiteur en intracellulaire. Parmi les linkers clivables nous pourrions utiliser un linker hydrazone ou disulfide (sensibles au pH) ou

un linkers peptidiques ou glucoconjugué (clivables par des protéases et pouvant potentiellement protéger notre peptide du métabolisme sanguin). Il faudra également s'assurer que notre ADC ne soit pas reconnue par les autres acteurs du SI, notamment les CPA et les LB car cela pourrait causer des effets indésirables. Il faudra également éviter d'avoir un effet ADCC avec notre anticorps car cela risquerait d'entraîner une lymphodéplétion et vérifier qu'il soit de taille raisonnable afin d'avoir une bonne distribution<sup>439,440</sup>.

-une seconde stratégie consisterait à utiliser des liposomes, des structures lipidiques qui peuvent encapsuler notre inhibiteur. Ils peuvent être fonctionnalisés avec des ligands spécifiques comme des anticorps ciblant les LT<sup>441-443</sup>. Les vésicules sphériques, formées de bicouches lipidiques, encapsulent la substance hydrophile (ici notre inhibiteur) dans leur compartiment aqueux central. Cette stratégie est intéressante car elle permet de protéger notre inhibiteur, a une bonne biocompatibilité et est bien maîtrisée (une quinzaine de médicaments sont sur le marché)<sup>444</sup> mais il faudra s'assurer que notre liposome n'est pas toxique (activation du complément, activation de l'immunité innée) et n'est pas dégradé (opsonisation, immunisation)<sup>445</sup>.

- Enfin d'autres techniques émergentes, comme l'utilisation de nanoparticules, peuvent être envisagées. Ces nanoparticules peuvent être lipidiques, inorganiques ou à base de polymères, permettant d'optimiser l'administration de médicaments de manière plus personnalisée<sup>446</sup>. Ils sont conçus pour encapsuler des agents thérapeutiques et les libérer une fois à l'intérieur de la cellule cible. Les nanoparticules à base de lipides pourraient être un bon choix pour délivrer notre inhibiteur, ils présentent de nombreux avantages, notamment la simplicité de la formulation, l'auto-assemblage, la biocompatibilité et une biodisponibilité élevée (notamment passage de la BHE)<sup>447</sup>. Pour ces raisons, ils constituent la classe la plus courante de nanomédicaments approuvés par la FDA et ont d'ailleurs été récemment utilisés par Moderna et Pfizer dans les vaccins à ARNm contre la COVID-19. Il existe d'ailleurs déjà des nanoparticules capables de cibler efficacement *in vivo* des LT CD8<sup>448</sup>. Aussi, nous pourrions mettre un inhibiteur de RelA dans une nanoparticule ciblant les LT. L'inhibiteur peut être un peptidique bloquant la translocation mais également un siRNA ciblant RelA. Cette approche a d'ailleurs été utilisée par Yan *et al*, dans le traitement de l'ostéoarthrite et a montré sa potentielle efficacité<sup>449</sup>. Les auteurs ont trouvé une formulation stable de nanoparticule permettant l'intégration d'un siRNA ciblant RelA puis ont montré son efficacité dans un modèle murin. L'injection des nanoparticules a entraîné une baisse de la phosphorylation de RelA dans l'articulation et une baisse de la lésion cartilagineuse montrant que cette approche est possible *in vivo*. De même, leur nanoparticule est capable de pénétrer des chondrocytes humaines. Nous pourrions donc utiliser la même construction et le conjuguer à une molécule d'adressage pour qu'il cible les LT. Il faudra cependant s'assurer que cette nouvelle construction est stable dans la circulation sanguine, qu'elle échappe au SI, qu'elle a une bonne distribution et qu'elle permet une libération contrôlée du médicament.



A l'inverse en oncologie, nos résultats suggèrent qu'activer c-Rel spécifiquement dans les Tconv pourrait être une approche thérapeutique prometteuse. Une thérapie cellulaire à base de LT génétiquement modifiés pourrait par exemple être envisagée. Une preuve de concept utilisant des LT CD8 TCR-transgéniques exprimant de manière constitutive IKK $\beta$ , ou déficients pour A20, dans le cancer murin, montre que cette approche est possible<sup>338,361</sup>. De même, une méthode de criblage gain de fonction a récemment montré que l'expression ectopique du récepteur de la LT $\beta$  dans les cellules CAR-T améliorerait le contrôle tumoral de manière dépendante de NF- $\kappa$ B<sup>450</sup>. Il serait donc intéressant d'examiner la supériorité potentielle des LT sur-exprimant c-Rel ou des cellules CAR-T, comme cela a été récemment démontré avec les CAR-T cells surexprimant BATF<sup>451</sup>. Dans un premier temps nous pourrions valider le concept *in vivo* dans un modèle murin en injectant des LT surexprimant c-Rel et voir si cela permet un meilleur contrôle de la pousse tumorale. Cette surexpression pourrait être réalisée par une transduction virale dans des LT puis réinjection à une souris receveuse lymphopénique RAG<sup>-/-</sup> (comme dans le modèle utilisé en figure 5M du 1<sup>er</sup> article), ou grâce à une souris transgénique ayant une mutation entraînant une expression ectopique de c-Rel dans LT<sup>452</sup>.

Si ces LT surexprimant c-Rel montrent une supériorité dans le contrôle des tumeurs une seconde étape consistera à tester leur efficacité thérapeutique. Un CAR-Tcell avec une construction permettant l'expression ectopique de c-Rel pourrait s'avérer plus efficace qu'un CAR-Tcell standard. Il faudrait alors vérifier *in vitro* son efficacité avec des expériences de co-culture et regarder le mécanisme exact qui lui confère cette supériorité (amélioration de la cytotoxicité, amélioration du help, baisse de l'épuisement...). Il pourra ensuite être testé *in vivo* dans des modèles murins de tumeur CD19. Une autre approche de thérapie pourrait consister à over-exprimer c-Rel dans des TIL et ensuite les réinjecter. Nous pourrions vérifier cette approche *in vitro* et *in vivo* avec des LT transgénique spécifique de la tumeur.

De façon générale si nous surexprimons c-Rel il faudra vérifier que cela n'entraîne pas de transformation tumorale dans nos LT. En effet, à l'origine *Rel* est un proto-oncogène il faudra donc être particulièrement vigilant avec les approches de surexpression<sup>453</sup>. Par exemple, il a été montré que la surexpression de c-Rel entraîne une transformation tumorale des cellules de rate de poulet<sup>454</sup> (bien que ceci n'ait pas été confirmé dans des cellules de mammifère) et le gène *Rel* est amplifié dans de nombreux lymphomes humains<sup>453,455</sup>. La solution pourrait être d'utiliser une sur-expression de c-Rel contrôlée dans le temps par un promoteur inducible.

En résumé bien qu'il reste de nombreux défis dans la conception de ces thérapies, nos travaux ouvrent une porte vers de futures thérapies personnalisées et prometteuses.

## **Annexes**

### **Annexe 1 : Transcriptional Control of Regulatory T Cells in Cancer: Toward Therapeutic Targeting?**

Review

# Transcriptional Control of Regulatory T Cells in Cancer: Toward Therapeutic Targeting?

Pierre Stéphan <sup>†</sup>, Raphaëlle Lautreite <sup>†</sup>, Allison Voisin and Yenkel Grinberg-Bleyer <sup>\*</sup>

Cancer Research Center of Lyon, UMR INSERM 1052, CNRS 5286, Université Claude Bernard Lyon 1, Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France; pierre.stephan@lyon.unicancer.fr (P.S.); raphaelle.lautreite@inserm.fr (R.L.); allison.voisin@inserm.fr (A.V.)

<sup>\*</sup> Correspondence: yenkel.grinberg-bleyer@inserm.fr; Tel.: +33-(0)-469-856-248

<sup>†</sup> These authors contributed equally to this paper.

Received: 9 October 2020; Accepted: 28 October 2020; Published: 30 October 2020



**Simple Summary:** Cancer outcomes are often indexed to the quality of the immune response to the tumor. Among immune cells, Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells (Treg cells) are potent inhibitors of cancer immunity, and their presence within solid tumors is generally associated with a poor prognosis. Thus, understanding how Treg cell identity is controlled, is of utmost importance for the development of novel anti-cancer therapies. In this review, we summarize the current knowledge on the different intracellular pathways involved in the programming of Treg cell homeostasis and functions in cancer. We also highlight the therapeutic approaches aiming at targeting these regulators to enhance anti-tumor immunity.

**Abstract:** Extensive research in the past decades has highlighted the tight link between immunity and cancer, leading to the development of immunotherapies that have revolutionized cancer care. However, only a fraction of patients display durable responses to these treatments, and a deeper understanding of the cellular and mechanisms orchestrating immune responses to tumors is mandatory for the discovery of novel therapeutic targets. Among the most scrutinized immune cells, Forkhead Box Protein P3 (Foxp3)<sup>+</sup> Regulatory T cells (Treg cells) are central inhibitors of protective anti-tumor immunity. These tumor-promoting functions render Treg cells attractive immunotherapy targets, and multiple strategies are being developed to inhibit their recruitment, survival, and function in the tumor microenvironment. In this context, it is critical to decipher the complex and multi-layered molecular mechanisms that shape and stabilize the Treg cell transcriptome. Here, we provide a global view of the transcription factors, and their upstream signaling pathways, involved in the programming of Treg cell homeostasis and functions in cancer. We also evaluate the feasibility and safety of novel therapeutic approaches aiming at targeting specific transcriptional regulators.

**Keywords:** regulatory T cells; cancer; transcription; immunotherapy

## 1. Introduction

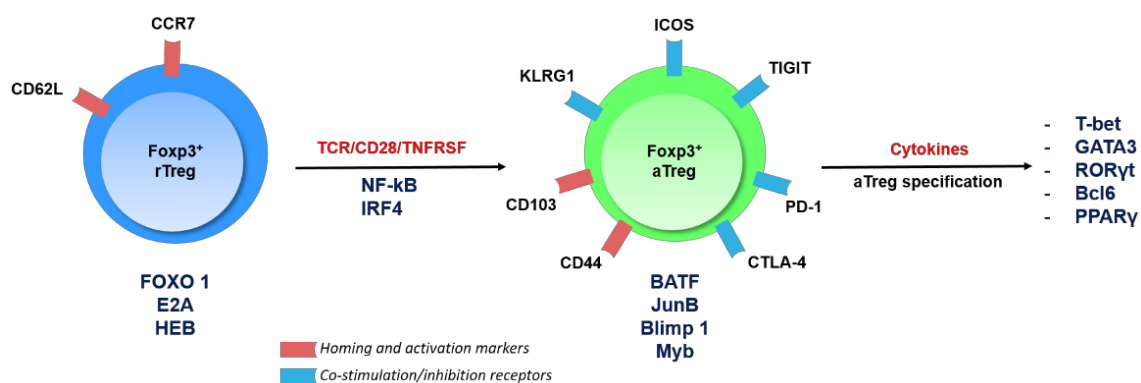
Forkhead Box Protein P3 (Foxp3)<sup>+</sup> regulatory T (Treg) cells compose 5–20% of the total CD4<sup>+</sup> T cell pool. Their primary and most described function is to maintain immune tolerance and prevent autoimmunity at all time [1]. This is illustrated by the systemic autoimmune syndrome observed in Scurfy mice and Immunodysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X-linked (IPEX) patients who carry mutations in *Foxp3* and after the ablation of Treg cells in young and adult mice [2–5]. In addition, through their multiple mechanisms of suppression, Treg cells are involved in the inhibition of a wide variety of immune responses, ranging from infection to cancer immunity [6]. Studies conducted in preclinical murine models have established the deleterious function of Treg cells in cancer. Indeed,

genetic and antibody-mediated depletion of Treg cells enhances tumor immunity and reduces tumor burden in many settings [7,8]. These conclusions have been largely confirmed in cancer patients, where the accumulation of Treg cells in the blood and tumor tissues is generally indicative of poor prognosis, though several exceptions, such as colorectal cancer, have been identified [9]. Because of this deleterious facet, the development of therapies aiming at modulating Treg recruitment, accumulation, and function in the tumor microenvironment is an area of extensive investigation in the field of cancer immunotherapy. As a prominent example, anti-Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4 (CTLA-4) antibodies, the first approved checkpoint-blockade therapy for cancer, were shown to exert their beneficial effects in cancer by decreasing Treg cells in mouse models [10], though the relevance of this mechanism in patients is still under debate [11,12]. The effect of Programmed Death-1 (PD-1) blockade on Treg cells and its contribution to therapeutic efficacy is also under scrutiny (reviewed in [13]). Interestingly, it was suggested that PD-1 inhibition on Treg cells may contribute to the hyperprogressive disease observed in a number of patients with gastric cancer [14]. Together, this demonstrates the central role of Treg cells in cancer immunotherapy. Cutting-edge technologies now provide scientists with the ability to comprehend the complexity of Treg cell populations and their molecular regulation to highlight additional therapeutic targets.

## 2. An Overview of Treg Cell Subsets and Their Transcriptional Regulation

The existence of different flavors of Treg cells underlies their large panel of functions. First, Treg cells can either develop in the thymus (tTreg) or differentiate in peripheral lymphoid tissues from naïve conventional (Tconv) cells (pTreg cells and their *in vitro* relatives, iTreg). To date, whether these two populations rely on shared or distinct transcription factor activity remains unclear. The proper development of Treg cells relies on a large number of transcriptional and epigenetic regulators, either for their survival or for the expression of Foxp3 or its stabilization. These mechanisms have been largely deciphered elsewhere [15,16], and we will therefore focus our review on the transcriptional regulation of mature Foxp3<sup>+</sup> Treg cells.

Treg cell subsets can also be defined based on their activation status. Whereas naïve-like Resting cells (rTreg) are primarily found in lymphoid tissues, engagement of the T-Cell Receptor (TCR) and its co-stimulation partner CD28, as well as members of the Tumor Necrosis Factor Receptor SuperFamily (TNFRSFs), drives the maturation of rTreg cells to a highly immunosuppressive Activated subset (aTreg cells, also known as effector eTreg cells) [17]. aTreg cells migrate to non-lymphoid tissues, where they maintain tissue homeostasis and potently suppress ongoing immune responses. In particular, aTreg cells are highly abundant in the tumor microenvironment and express a large panel of immune checkpoints (i.e., inhibitory and stimulatory surface receptors), making their regulation an important aspect in the development of immune checkpoint-blockade therapies [18,19] (Figure 1).



**Figure 1.** Activation steps of regulatory T cells (Treg cells) and their transcriptional regulation. The figure depicts the main transcription factors involved in the programming and maintenance of Treg cell subsets and highlights the expression of a numbers of surface receptors being targeted in cancer immunotherapy.

This immense regulatory power is under tight transcriptional control. Foxp3 is the master transcription factor of Treg cells, as it provides them with their suppressive function and largely establishes their transcriptomic pattern [20,21]. Moreover, Foxp3 can interact with a myriad other transcriptional regulators, thereby enabling potent repression or activation of gene expression [22,23]. Downstream of the TCR/CD28/TNFRSF signaling cascades, a number of transcription factors are essential for the specification of the aTreg subset. Briefly, Interferon Regulatory Factor 4 (IRF4), Myb, and Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B) seem to kick-start the aTreg specification program [24–27], whereas Basic Leucine Zipper Transcription Factor (BATF), B-lymphocyte-induced maturation protein 1 (Blimp1), JunB, and Myb are then required to establish and maintain the aTreg landscape [24,28]. Importantly, negative regulators of the aTreg program have been described, such as Forkhead Box protein O (Foxo) or E-protein transcription factors [29,30]. At a more advanced level of differentiation, aTreg cells can acquire the expression of tissue- or microenvironment-induced transcription factors historically linked to the polarization of Tconv cells into Thelper (TH) subsets. Indeed, T-Box Expressed in T cells (T-bet), GATA Binding Protein 3 (GATA3), Retinoic Acid Receptor (RAR)-related Orphan Receptor (ROR) $\gamma$ t, and B-Cell Lymphoma 6 protein (Bcl6), hallmarks of TH1, TH2, TH17, and T follicular helper cells, respectively, can also be expressed by aTreg cells and contribute to the diverse and highly adaptive functions of this population [31]. This precise molecular regulation of Treg cell identity has major implications for the regulation of cancer immunity that we will now emphasize.

### 3. Signaling Pathways and Transcription Factors in Treg Cells in Cancer

#### 3.1. Foxp3

Because of its critical function in shaping the Treg cell transcriptome and function, Foxp3 itself is an attractive target for cancer immunotherapy. Several groups have identified small-molecule inhibitors able to impair Foxp3 nuclear translocation dimerization or its interaction with known partners such as Nuclear Factor of Activated T-cells (NFAT) [32–34]. Interestingly, all these inhibitors had a significant therapeutic effect on syngeneic murine tumors when administered with a peptide vaccine or anti-Programmed cell Death 1 (PD-1) checkpoint-blockade therapy. However, one of the major obstacles to further developing such therapies is the expression of FOXP3 by non-Treg cells in humans [35,36]. In recent years, alternative strategies have aimed at targeting Foxp3 cofactors or other pathways, transcription factors, and epigenetic regulators involved in Treg cell biology in cancer; these will be the focus of this review.

#### 3.2. IRF4

*Irf4* (encoding IRF4), whose expression in T cells is driven by TCR engagement, is important in many aspects of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell biology [37]. In addition, IRF4 is one of the master regulators of aTreg generation [24] and was described as critical for the maintenance of peripheral immune homeostasis. Indeed, conditional ablation of *Irf4* in Treg cells leads to a multifocal and lethal autoimmune disease [38]. More recently, it was shown that IRF4 expression also defines the activated subset of tumor-infiltrating Treg cells in patients with lung cancer and may even regulate the human aTreg phenotype [39]. Furthermore, this tumor-promoting function was demonstrated in mice with tamoxifen-induced ablation of *Irf4* in Treg cells, which display reduced growth of transplanted colon adenocarcinoma [39]. Because IRF4 may also promote T conv cell exhaustion [40], it is emerging as a promising target in cancer.

#### 3.3. The Complex Functions of the PI3K/AKT/Foxo Axis

Induced in T cells by CD28 engagement among other signals, the Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K)/AKT signaling cascade is well recognized for its critical role in the activation of the Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) complex, which serves as a central metabolic rheostat. Aside from this

function, AKT also phosphorylates the Foxo1 transcription factor, promoting its exclusion from the nucleus. The function of this axis in Treg cells, especially in the context of cancer, has been under scrutiny in recent years. Historically, it was shown that Treg cells have impaired AKT and mTOR activity, suggesting that the pathway could be expendable or even deleterious for their homeostasis. In support of this latter hypothesis, genetic disruption or chemical inhibition of the phosphatase Phosphatase and Tensin Homolog (PTEN) that leads to exacerbated activation of AKT, drives the conversion of Treg cells into Tconv cells and a significant arrest in tumor growth [41]. Similar results were found upon Treg-restricted ablation of the Neuropilin-1 surface receptor, which normally triggers PTEN recruitment [42,43]. However, at odds with this conclusion, ablation of the PI3K *p110δ* isoform in Tregs, also leads to major delays in the growth of several types of cancers [44,45]. Administration of the *p110δ*-selective inhibitor PI-3065, as well as other PI3K and AKT inhibitors, has a marked therapeutic effect in preclinical models [44,46]. Similarly, another *p110δ* inhibitor was shown to strongly inhibit human Treg cell proliferation and function in *in vivo* assays [47].

Together, this suggests that a balanced activation of the PI3K/AKT pathway is mandatory for the proper suppression of anti-tumor responses by Treg cells. In line with this, both the inactivation and constitutive activation of Foxo1 in Treg cells (using *Foxo1<sup>fllox</sup>* and non-degradable *Foxo1<sup>CA/CA</sup>* constructs, respectively), lead to multifocal autoimmune syndromes [30,48]. However, *Foxo1<sup>CA/+</sup>* mice expressing only one copy of the transgene, do not develop autoimmunity but mount strong anti-tumor immune responses, resulting in reduced tumor growth in spontaneous and transplanted cancer models [30]. This could be attributed to a reduced accumulation of Treg cells in the tumor microenvironment. Specifically, Foxo1, while important for the initiation of *Foxp3* expression, is actually an inhibitor of the aTreg cell program. Consequently, *Foxo1<sup>CA</sup>* Treg cells fail to upregulate aTreg genes and to migrate to the tumor tissue. In conclusion, even though growing evidence highlights the PI3K/AKT/Foxo axis as an attractive therapeutic target for cancer immunotherapy, one should be cautious when it comes to the specificity, the duration, and the dose–effect of this type of treatment.

#### 3.4. Helios

Helios, encoded by *Ikzf2*, is a member of the Ikaros family of transcription factors and expressed by Treg but not Tconv cells in mice [49]. It was originally described that the expression of Helios could be enriched in mouse tTreg when compared to pTreg, though this finding was later debated [50,51]. In addition to this phenotypic hallmark, Helios also supports the identity of Treg cells. Germline deletion or conditional ablation of *Ikzf2* in Treg cells leads to a multifocal autoimmune syndrome detectable from 5 to 6 months of age. Indeed, Treg cells from these animals are present in normal numbers but exhibit impaired suppressive functions *in vivo* [49,52]. Consequently, melanoma and colon adenocarcinoma growth is significantly delayed in mutant mice [53]. This is associated with an unstable phenotype consisting of enhanced expression of inflammatory cytokines, such as Interferon (IFN) $\gamma$  or Granzyme B, by tumor-infiltrating Helios-deficient Treg cells [54]. It was also proposed that the expression of Helios by human Treg cells may promote leukemic cell survival and angiogenesis in *in vitro* assays [55]. Overall, and because it is mainly expendable for Tconv cell function [56], Helios represents an attractive target for cancer immunotherapy. Consistently, it was proposed that agonistic anti-Glucocorticoid-Induced TNFR-Related protein (GITR) antibodies may exert their anti-tumor functions by down-modulating Helios expression in Treg cells [53].

#### 3.5. Eos

Eos (encoded by *Ikzf4*), another member of the Ikaros family, is also critical in Treg cell biology. Eos is highly expressed by Treg cells, although *in vitro* stimulated Tconv cells can express substantial levels of the protein, and physically interacts with Foxp3 to help mediate Foxp3-mediated gene repression in Treg cells [57,58]. Eos is mainly expendable for Tconv cell function *in vivo* [58]. In contrast, *Ikzf4* knock-down or knock-out drives loss of numerous Treg-specific genes and expression of Tconv-associated genes [57]. Consequently, mice with conditional ablation of *Ikzf4* in Treg cells develop a lymphoproliferative and

autoimmune syndrome starting 3 months after birth [59]. This loss of in vivo functionality also leads to impaired suppression of anti-tumor immunity, as shown by the increased T-cell infiltration and function and reduced burden of colon cancer in mutant animals [59].

### 3.6. The Nr4a Family

The Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A (Nr4a) family of orphan nuclear receptors is composed of 3 members encoded by *Nr4a1* (Nur77), *Nr4a2* (Nurr1), and *Nr4a3* (Nor1). In T cells, Nr4a expression is induced by TCR signaling in a dose-dependent manner. Interestingly, the expression of the 3 proteins is higher in Treg than in Tconv cells, likely because of the supposedly high autoreactivity of Treg cells [60]. Mechanistically, Nr4a proteins largely regulate the expression of *Foxp3* itself and of Treg-signature genes [61,62]. Nr4a-deficient Treg cells express many inflammatory genes of the TH1 and TH2 (but not TH17) signatures, in particular because Nr4a directly represses the *Il4* locus [63]. Together, these alterations lead to a loss of Treg suppressive function in in vitro assays. Moreover, conditional ablation of the 3 receptors in total T cells almost leads to the complete absence of Treg cells and drives a Th2-mediated lethal autoimmune syndrome early after birth [62]. A similar phenotype was observed in mice with Treg-restricted ablation of all 3 receptors, while ablation of *Nr4a1* and 2 only, was not sufficient to induce disease [63]. These unstable Treg cells are also poor suppressors of anti-tumor immunity. Transplanted tumor growth is significantly reduced in *Nr4a1/2* double mutant animals, in a CD8-T-cell dependent fashion [64]. Importantly, single deletion of *Nr4a1* or *Nr4a2* is not sufficient to induce the phenotype, reinforcing the concept of major redundancy between Nr4a proteins. In this line, an in vitro screening assay revealed that the chemotherapeutic agent camptothecin, a topoisomerase inhibitor widely used in cancer care [65], is a potent inhibitor of Nr4a-induced transcription [64]. Its administration, either alone or with a Cyclooxygenase-2 (COX2) inhibitor, reduces tumor progression in syngeneic transplanted cancers, associated with reduced expression of Nr4a-dependent, Treg-associated genes and enhanced Tconv cell function. Finally, in addition to this effect on Treg cells, inhibition of Nr4a proteins also seems to salvage the dysfunctional state of exhausted anti-tumor T cells, bestowing cells with potent anti-tumor properties [66,67]. Thus, by affecting both Treg cells and exhausted Tconv cells, Nr4a proteins seem to be attractive targets in cancer therapy.

### 3.7. Bach2

Broad Complex-tramtrack-bric a brac and Cap'n'collar Homology 2 (Bach2) is a transcription factor of the Basic Leucine Zipper (bZip) family. Bach2 competes with Activator Protein-1 (AP-1) family members such as Jun and Fos and promotes the repression of AP-1 target genes, thereby restraining the terminal differentiation of CD8<sup>+</sup> T cells and reducing *Il2* expression in CD4<sup>+</sup> T cells [68,69]. Bach2 is also critical for the development and homeostasis of Treg cells. Its germline deletion drives systemic lethal autoimmunity in adult mice, associated with reduced Treg cells in the periphery [70,71]. Mechanistically, Bach2 was shown to prevent excessive activation of the rTreg pool by limiting the sensitivity to TCR signals, repressing aTreg-associated genes, and limiting cell apoptosis. For instance, Bach2 restricts the transcription of IRF4 target genes such as *Positive Regulatory Domain Containing 1, with zinc finger domain (Prdm1)* (encoding Blimp-1), allowing the long-term maintenance of rTreg cells and enabling their suppressive activity [72]. Bach2 expression is stabilized at the protein level by SUMO-specific Protease 3 (SEN3), which directly deSUMOylates Bach2 and prevents its nuclear export [73]. This central function has major implications in cancer immunity, since tumor growth is significantly delayed in *Bach2*-null mice transplanted with melanoma or thymoma cells, which is associated with reduced Treg cell accumulation in the tumor [74]. Similarly, conditional *Bach2* or *Senp3* ablation in Treg cells leads to enhanced anti-tumor immunity and delayed progression of transplanted colon cancer and melanoma, respectively, demonstrating a Treg-cell-intrinsic function of Bach2 in cancer [73,75].

### 3.8. E-Proteins and Their Inhibitor of DNA Binding (Id) Counterparts

E-proteins are transcriptional activators and repressors, the activity of which is inhibited by Id proteins. The E-proteins E2A and HEB inhibit the transition to the aTreg cell state [29]. Consequently, conditional ablation of *E2A* and *HEB* in mature Treg cells, leads to the accumulation of highly suppressive aTreg cells in the periphery [29]. Conversely, Treg-restricted deletion of *Id2* and *Id3* drives lethal autoimmunity in mice [76]. Paradoxically, forced expression of *Id2* in Treg cells enables mice to mount strong anti-tumor immune responses, with reduced melanoma growth and Treg cell numbers in the tumor bed [77]. This puzzling observation underlines the need for further analyses on the maintenance of the Treg pools through a balance between E-proteins and Id proteins.

### 3.9. STAT3

As the downstream signaling module of many cytokines and soluble factors, Signal Transducer and Activator of Transcription-3 (STAT3) appears to be an important regulator of Treg cell accumulation and function in cancer. Together with STAT5, STAT3 stabilizes *Foxp3* expression in response to IL-2 [78]; IL-23-driven STAT3 activation in tumor-infiltrating Treg cells achieves the same phenotype [79]. Furthermore, STAT3 and *Foxp3* co-operate to promote the suppression of Th17 immunity by Treg cells, as demonstrated by the TH17-mediated intestinal inflammation observed in mice with conditional ablation of *STAT3* in Treg cells [80]. Inhibition of Janus Kinase 2 (JAK2), which phosphorylates and activates STAT3, or STAT3 itself using a chemical inhibitor or antisense oligonucleotides, respectively, reduces the growth of transplanted tumors in mice, associated with decreased Treg cell frequencies [81,82]. However, it is unclear whether this therapeutic effect actually relies on Treg cell inhibition in these settings. Indeed STAT3 is involved in the differentiation and function of many other cell types, including TH17 cells that can be protective or deleterious in cancer, depending on the tumor type (reviewed in [83]). Therefore, additional studies are required to elucidate the cell-autonomous functions of STAT3 in Treg cells and other immune cells during cancer.

### 3.10. The NF- $\kappa$ B Pathway

In the last few years, the NF- $\kappa$ B pathway has emerged as a nexus regulator of Treg cell differentiation, gene expression, and function in autoimmunity and cancer. NF- $\kappa$ B is a family of transcription factors composed of 5 subunits that associate as homo- or heterodimers and all share a Rel Homology Domain (RHD): NF- $\kappa$ B1 (p105/p50, encoded by *Nfkb1*), RelA (encoded by *Rela*), and c-Rel (encoded by *Rel*) of the canonical pathway and NF- $\kappa$ B2 (p100/p52, encoded by *Nfkb2*) and RelB (encoded by *Relb*) of the alternative pathway [84]. In T cells, the canonical pathway is classically activated by the engagement of the TCR and its CD28 partner. Briefly, TCR/CD28 triggering leads to the activation of Protein Kinase C, Isoform Theta (PKC $\theta$ ). Activated PKC $\theta$  phosphorylates Caspase Recruitment domain-containing Membrane-Associated guanylate kinase protein-1 (Carma1), enabling the formation of the CBM complex composed of Carma1, B-cell lymphoma/leukemia 10 (Bcl10), and Mucosa-Associated Lymphoid Tissue lymphoma translocation protein 1 (Malt1). The CBM complex can then recruit the I $\kappa$ B kinase (IKK) complex (composed of IKK $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ ), which phosphorylates the Inhibitor of NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) proteins to relieve inhibition of NF- $\kappa$ B1, RelA, and c-Rel subunits, allowing their nuclear translocation. Both the canonical and the alternative pathway can also be activated by several members of the TNFRSF and CD28 families, in an activation mechanism that involves the TNFR-Associated Factor (TRAF) family of adaptors.

#### 3.10.1. The Many Roles of NF- $\kappa$ B in Treg Cells

The alternative NF- $\kappa$ B pathway exhibits limited functions in Treg cell homeostasis. Conditional ablation of *Nfkb2*, but not *Relb*, in Treg cells, leads to a mild lymphoproliferation and colon inflammation [85]. *Nfkb2*-deficient Treg cells display a slight reduction in their suppressive function and are mostly characterized by an increased expression of TH17-associated genes, including *Il17a*.



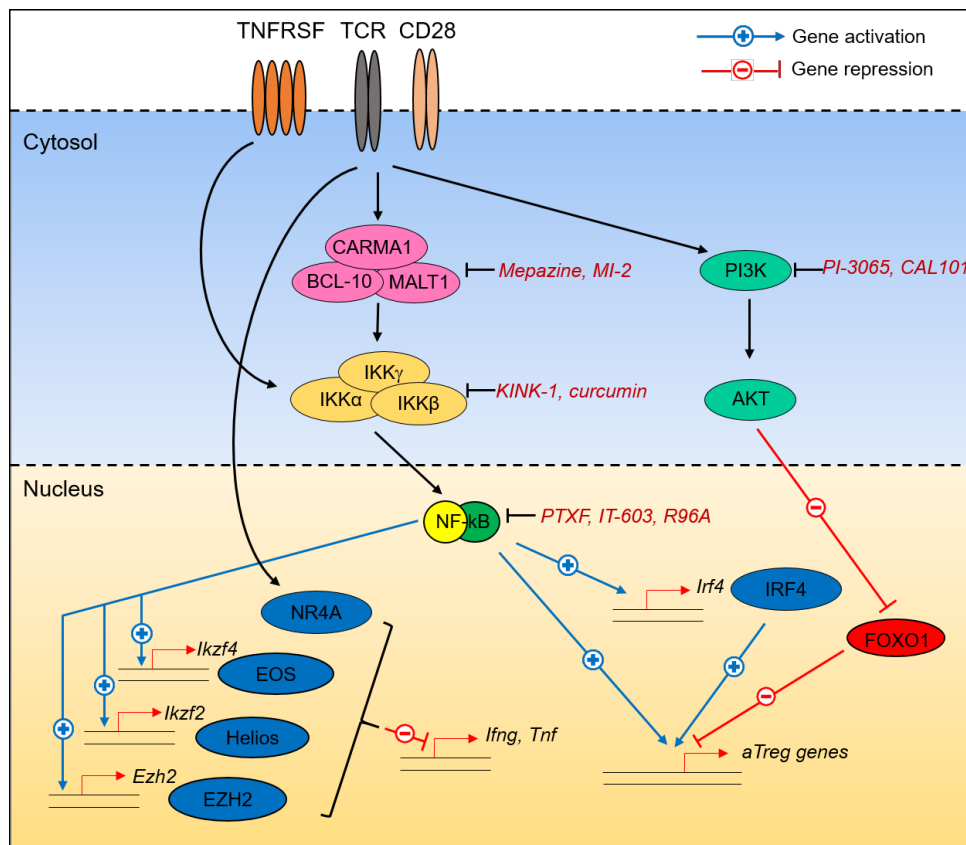
In contrast, the canonical pathway is involved in many different aspects of Treg cell biology. The use of Treg-restricted conditional ablation of the canonical pathway intermediates and subunits has revealed the fundamental roles of NF- $\kappa$ B in mature Treg cells in the periphery. Deletion of either *Carma1*, *Bcl10*, *Malt1*, *Ikkkb* (IKK $\beta$ ), or *Rela* leads to a lethal autoimmune syndrome [86–90]. Interestingly, *Rel* mutant mice display a milder, non-lethal inflammatory syndrome that only arises from >20 weeks of age [90]. This indicates a selective and differential contribution of each NF- $\kappa$ B subunit in the maintenance of peripheral Treg cell homeostasis.

Importantly, these critical functions have a major impact in the context of cancer. Transplanted melanoma growth is dramatically impaired in mice carrying a germline ablation or a Treg-restricted ablation of *Rel*, but not *Rela* [26]. Similar results were obtained when using conditional ablation of *Carma1*, *Bcl10*, and *Malt1* and transplanted models of melanoma, thymoma, or colon adenocarcinoma [86,88,89]. Mechanistically, CBM- and *Rel*-deficient Treg cells exhibit impaired expression of a Treg-associated genes and accumulation in tumor tissues, while significantly increasing their expression of Tconv-associated markers, in particular IFN $\gamma$ . This even leads to a dominant, Treg-cell-intrinsic anti-tumor function, as the sole transfer of *Carma1*-deficient Treg cells into immunocompetent recipients, is sufficient to reduce tumor growth in an IFN $\gamma$ -dependent manner [86]. Of note, the transcriptional program of c-Rel- and *Carma1*-deficient Treg cells does not fully overlap. Moreover, the expression of an IKK $\beta^{CA}$  transgene, that leads to the constitutive activation of p50 and RelA (but not c-Rel, personal communication) fails to rescue the autoimmune syndrome in *Carma1* and *Bcl10* mutant animals [86,89]. It is therefore possible that the function of the CBM complex, in this setting, may partially rely on NF- $\kappa$ B-independent functions.

These observations have led to the use of CBM, IKK $\beta$ , and c-Rel inhibitors as therapeutic agents in preclinical models of cancer, with encouraging observations. Administration of the *Malt1* inhibitors mepazine or MI-2 significantly delays tumor growth when injected in a curative schedule, alone or in combination with a tumor vaccine. The drug also sensitizes checkpoint-blockade-resistant tumors to anti-PD-1 therapy [86,89]. Interestingly, mepazine was proposed to exert its anti-cancer properties through the inhibition of c-Rel in human pancreatic cancer xenografts [91]. Consistently, prolonged systemic inhibition of IKK $\beta$  by the Kinase Inhibitor of NF- $\kappa$ B-1 (KINK-1) agent, though ineffective when administered alone, potentiates the anti-cancer effect of a tumor vaccine in transplanted melanoma [87]. Another well-known, though poorly selective, IKK inhibitor, curcumin, decreases the number of intra-tumoral Treg cells in preclinical models of cancer [92–94], and enhances Th1 cells, while decreasing Treg cells in patients with lung and colon cancer [95,96]. Finally, c-Rel inhibition using the methylxanthine derivative Pentoxifylline (PTXF) or the selective c-Rel inhibitors, IT-603 or R96A, significantly reduces tumor growth and synergizes with anti-PD-1/Programmed cell Death Ligand 1 (PD-L1) therapy as well as doxorubicin [26,97–99]. Interestingly, it seems that most of these drugs, in particular mepazine and PTXF, act through the destabilization of tumor-infiltrating Treg cells by inducing their expression of effector cytokines, rather than by depleting the cells or directly perturbing their inhibitory program.

### 3.10.2. NF- $\kappa$ B Is a Nexus Regulator of the Treg Cell Transcriptional Program in Cancer

In addition to these observations, it is interesting to note that not only does NF- $\kappa$ B directly control many Treg-hallmark genes [90], but it also drives the expression of other transcription factors and epigenetic regulators involved in the suppression of cancer immunity by Treg cells (Figure 2). For instance, NF- $\kappa$ B controls the expression of *Ikzf2* and *Ikzf4* in a RelA- and c-Rel-dependent manner. *Enhancer of Zeste Homolog 2* (*Ezh2*), whose function will be detailed below, is a c-Rel-dependent gene in T cells [100]. Similarly, expression of *Bach2* and *Irf4* is lost in c-Rel-deficient B cells [101,102], though similar observations are currently lacking for T cells.



**Figure 2.** Molecular programming of Treg cells in cancer. Different pathways and transcription factors converge to maintain Treg cell identity in tumors, i.e., the expression of Activated Treg cells (aTreg)-signature genes and the inhibition of inflammatory cytokine expression. Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B), through its regulation of downstream targets, occupies a central place in this program. A number of chemicals, natural products, and small-molecule inhibitors with potent anti-tumor properties are also highlighted.

Collectively, canonical NF- $\kappa$ B and its upstream canonical pathway are of utmost interest for cancer therapy. Of course, owing to the crucial role of NF- $\kappa$ B in cancer initiation, progression, and dissemination [103], many attempts have been made to introduce NF- $\kappa$ B inhibitors into clinics [104]. However, the numerous adverse effects of these inhibitors originally tested in patients have eventually discouraged this research [105]. For further developments in this field, it is thus important to keep in mind that the specificity and safety of such drugs is mandatory for their clinical application. In light of our recent reports demonstrating a selective contribution of each NF- $\kappa$ B subunit to different aspects of Treg cell biology, an attractive option may be to specifically inhibit c-Rel instead of targeting general upstream regulators. No severe adverse effects of the c-Rel inhibitor PTXF (commercialized as Trental) were reported when administered to humans [106]. The recent description of potent and apparently safe c-Rel inhibitors further advocates for such a use [97,99].

#### 4. Epigenetic Programming of Treg Cells in Cancer

In addition to the regulation of Treg cell biology by transcription factors, their identity is also linked to the activity of a number of epigenetic regulators, with implications for their targeting in cancer.

Among these regulators, the histone methyltransferase EZH2, is a prime determinant of Treg activity. As part of the Polycomb Repressive 2 (PRC2) complex, EZH2 represses gene transcription through the addition of H3K27<sup>3me</sup> marks. Importantly, in T cells, *Ezh2* expression is enhanced by CD28 signaling, in a c-Rel-dependent manner [100]. Foxp3 and EZH2 have been shown to co-localize on

Treg-associated gene loci, providing a possible mechanism for the repressive activity of Foxp3 [107]. Conditional ablation of *Ezh2* in Foxp3<sup>+</sup> cells drives a spontaneous lethal inflammatory syndrome linked to Treg cell instability. Moreover, *Ezh2*-deficient naïve T cells display an impaired ability to form Foxp3<sup>+</sup> iTreg cells in vitro [108,109]. In addition, these unstable Treg cells are poor suppressors of anti-tumor responses, as conditional knock-out (KO) animals show impaired growth of transplanted melanoma colon, prostate, and bladder tumors, associated with enhanced T-cell infiltration and function in the tumor microenvironment [110,111]. Conversely, Treg-restricted ablation of the H3K27 demethylase Jumanji domain-containing protein D3 (*Jmjd3*), increases tumor growth [110]. This set of data is of particular interest, as the efficacy of small-molecule inhibitors of EZH2 for the treatment of cancer is currently under investigation [112]. In support of such strategies, EZH2 inhibitors reduce tumor progression and synergize with anti-CTLA4 therapy in a T-cell-dependent fashion [111,113]. Another layer of epigenetic regulation is the critical role of Histone Deacetylases (HDACs) in Treg cell identity. Four different classes of HDACs are known to repress gene expression and protein stability in various ways and can therefore be either beneficial or deleterious for Treg cells [114]. The class I HDAC inhibitor Entinostat, currently under investigation in different types of cancer, was shown to decrease *Foxp3* expression in vitro and in vivo [115]. Similarly, chemical inhibition or genetic ablation of REST Corepressor 1 (*Rcor 1*) in Treg cells that leads to disruption of HDAC1 and HDAC2 activity, promotes the expression of inflammatory cytokines by Treg cells, and impairs their ability to suppress anti-tumor immunity [116]. Finally, it was shown that genetic ablation of the histone/protein acetyltransferase *p300* specifically in Treg cells, delays the growth of transplanted tumors, while autoimmune symptoms remain mild and non-lethal [117].

Together, these studies argue in favor of the importance of epigenetic regulation in Treg cells during cancer. It is interesting to note that many of the inhibitors tested in the above studies do not seem to affect anti-tumor Tconv cells, revealing Treg-cell-specific requirements for EZH2 or p300 in Treg genome architecture and gene expression. Because many epigenetic modulators are currently tested in the clinics [118], this provides an additional rationale for their use as Treg-cell-targeting agents in cancer immunotherapy.

## 5. Shared Mechanisms of Treg Cell Reprogramming in Cancer

It can appear surprising that so many individual transcription factors and pathways exhibit non-redundant functions in Treg cells during cancer. One explanation may reside in the following common observation: whereas the number of Treg cells and/or their function remains generally intact or only slightly impacted, their stability and their “identity” is largely impaired. Specifically, the conversion of rTreg into aTreg and/or the stability of the aTreg subset is deeply affected by ablating the CBM/NF- $\kappa$ B axis or upon constitutive activation of Foxo1 [26,30,86]. More interestingly, discrete alterations in transcription factors and upstream signals lead to a common increase in the expression of major inflammatory cytokines. Specifically, *Carma1*, *Rel*, *Nrp1*, *Ezh2*, *Senp3*, and *Irf2*-null Treg all produce appreciable amounts of IFN $\gamma$  and/or TNF in the tumor microenvironment [26,43,53,73,86,110] (Figure 2). This transformation into anti-tumor cells was nicely demonstrated with *Carma1*-deficient Treg cells, the transfer of which was sufficient to delay tumor growth in recipient animals [86]. Hence, this highlights Treg “reprogramming” as a relevant and dominant approach to improve anti-tumor immunity [119].

## 6. Challenges on the Path toward Cancer Therapy

We have now at our disposal an exhaustive list of transcription factors involved in Treg-cell-mediated suppression of anti-tumor immunity. Although this highlights many possible molecular targets, there are still a number of challenges that must be considered if we are to apply these discoveries to cancer therapy.

### 6.1. Missing Pieces of the Puzzle

Despite the extensive and thorough knowledge on Treg cell regulation in cancers described above, this obviously remains incomplete. It is likely that other transcriptional regulators will be described in the near future as important for tumor immunosuppression and as putative therapeutic targets. The specific function in cancer, of many master regulators of Treg cell identity and differentiation, has not yet been investigated. For example, the Interleukin-2 (IL-2)/Signal Transducer and Activator of Transcription 5 (STAT5) axis is critical for Treg cell differentiation and function [120,121], but its role in cancer has not been formally evaluated yet. Downstream of the TCR/CD28 signaling, NFAT is integral for the transcriptional landscape of Treg cells [122]. AP-1 transcription factors, in particular JunB, seem to be involved in the specification of aTreg cells [28]. Similarly, the role of Blimp1, a central hub of aTreg cell identity, remains unknown in cancer immunity [123].

It is important to note that many of the studies described in the above sections, used the Foxp3<sup>cre</sup> mouse strain as a model to investigate Treg cell autonomous functions of given genes. In recent years, it has been largely demonstrated that expression of Cre recombinase can occur in Foxp3<sup>-</sup> non-Treg cells. This stochastic activity of the *Foxp3* promoter—and “leaky” expression of the Foxp3<sup>cre</sup> allele—may lead to recombination of the loxP-flanked regions in other immune cells that are involved in cancer immunity, such as CD4<sup>+</sup> Tconv, CD8<sup>+</sup> T cells, and also myeloid cell subsets [124–126]. Therefore, it would be of the greatest interest to reevaluate some of the functions that were attributed to the sole activity of transcription factors in Treg cells. Different models can be proposed and are already in use: the Foxp3<sup>cre-ert2</sup> strain that allows tamoxifen-inducible ablation of floxed genes, which limits the duration of Cre activity [127]; the comparison of results obtained with Foxp3<sup>cre</sup> and other strains such as CD4<sup>cre</sup> or germline ablations; or the reconstitution of immunodeficient mice with wild-type and mutant immune cell subsets.

In addition, our knowledge will undoubtedly be improved by the implementation of large-scale screening technologies. For instance, three recent studies have used genome-wide and pooled Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) screen approaches, to identify unknown elements involved in the maintenance of Foxp3 expression and Treg cell identity both in murine and human cells [128–130]. These reports have highlighted a series of novel pathways, such as ubiquitin ligases and deubiquitinases, chromatin remodelers, and transcription factors; in particular, Loo et al. nicely demonstrated that ablation of the *Bromodomain-containing protein 9* (*Brd9*) subunit of the non-canonical BRG1/BRM Associated Factors (BAF) complex, impaired *Foxp3* expression and reduced Treg cell function, leading to enhanced tumor immunity and delayed growth of transplanted MC38 colon adenocarcinoma cells [129]. The quantity of data brought by modern technologies such as CRISPR screens will be invaluable for the discovery of unique or shared molecules that can be targeted to impair Treg cells specifically in tumors.

### 6.2. Avoiding Autoimmunity

Immune-related adverse events, in particular autoimmunity, are among the main complications of the checkpoint-blockade cancer therapies anti-CTLA-4 and anti-PD-1. In patients, CTLA-4 blockade often leads to severe autoimmune symptoms, in particular colitis. Although PD-1/PD-L1 blockade generally induces milder complications, thyroiditis is a frequent complication [131]. Mechanistically, there are commonalities between the two treatments: both the engagement of CTLA-4 and PD-1 drive the recruitment of the phosphatase SHP-2 (Src Homology region 2 domain-containing Phosphatase-2) (and PP2A (Protein Phosphatase 2A) for CTLA-4), leading to impaired activation of the TCR/CD28 cascade through PI3K, MAPK, AP-1, and NF-κB [132,133]. Inhibition of either receptor leads to enhance activation of the aforementioned pathways [133–135], which might thus be responsible for the autoimmune symptoms. It is therefore of the utmost interest to understand the role of these signaling cascades both in Treg and Tconv cells.

In addition, these symptoms are likely due to the stimulation of T cells not only at the tumor site but also in peripheral tissues. An important step in the development of safe therapeutics would,

therefore, be to identify targets that are restricted to the cancer microenvironment. It is noticeable that in many instances, the same pathway or transcription factor can be involved in Treg cell function both in the settings of cancer and tolerance to self. As described in Table 1, Treg-specific ablation of a single gene can lead to pronounced autoimmune symptoms. In contrast, mice with conditional ablation of *Ikzf2*, *Pten*, *Rcor 1*, or *Rel*, for instance, display no (or limited) signs of autoimmunity while enabling enhanced tumor clearance, perhaps indicating “safer” therapeutic targets in terms of adverse effects.

**Table 1.** Autoimmune symptoms in mice with enhanced anti-tumor immunity. Models are ranked by severity of the syndrome.

Protein/Family	Mouse Model	Autoimmune Symptoms	Lethality	Ref.
IKK $\beta$	Foxp3 <sup>cre</sup> Ikkkb <sup>F/F</sup>	Scurfy-like syndrome	Yes	[87]
Ezh2	Foxp3 <sup>cre</sup> Ezh2 <sup>F/F</sup>	From 1 month of age, spontaneous T conv cell activation and tissue infiltration	Yes	[108]
IRF4	Foxp3 <sup>cre</sup> Irf4 <sup>F/F</sup>	From 6 to 8 weeks of age, spontaneous T conv cell activation and tissue infiltration	Yes	[38]
Id proteins	Foxp3 <sup>cre</sup> Id2 <sup>Tg</sup>	From 6 to 8 weeks of age, progressive T conv cell activation and tissue infiltration	Yes	[77]
STAT3	Foxp3 <sup>cre</sup> Stat3 <sup>F/F</sup>	From 6 to 8 weeks of age, splenomegaly and colon inflammation	Yes	[80]
Bach2	Bach2 <sup>-/-</sup>	From 3 months of age, spontaneous T conv cell activation and tissue infiltration	Yes	[70]
P300	Foxp3 <sup>cre</sup> ep300 <sup>F/F</sup>	From 10 weeks of age, spontaneous T conv cell activation and tissue infiltration	n.d.	[117]
CBM complex	Foxp3 <sup>cre</sup> Bcl10 <sup>F/F</sup>	Scurfy-like syndrome	Yes	[89]
	Foxp3 <sup>cre</sup> Malt1 <sup>F/C4712A</sup>	from 6 to 8 weeks of age, spontaneous T conv cell activation and tissue infiltration	n.d.	[88]
	Foxp3 <sup>cre/+</sup> Carma1 <sup>F/F</sup>	No detectable signs of autoimmunity (Foxp3 <sup>cre/cre</sup> Carma1 <sup>F/F</sup> develop Scurfy-like syndrome)	No	[86]
NF- $\kappa$ B	Foxp3 <sup>cre</sup> Rel <sup>F/F</sup>	Mild lymphoproliferation from 20 weeks of age	No	[90]
Helios	Foxp3 <sup>cre</sup> Ikzf2 <sup>F/F</sup>	From 5 months of age, spontaneous T conv cell activation and tissue infiltration	No	[52]
Foxo1	Foxp3 <sup>cre</sup> Foxo1 <sup>CA/+</sup>	No detectable signs of autoimmunity (Foxo1 <sup>CA/CA</sup> develop lethal autoimmunity)	No	[30]
Pten	Foxp3 <sup>cre</sup> PTEN <sup>F/F</sup>	From 12 weeks of age, spontaneous T conv cell activation, kidney damage	No	[136]
	Foxp3 <sup>cre</sup> PTEN <sup>F/F</sup> (2nd construct)	No detectable signs of autoimmunity	No	[41]
Nr4a	Foxp3 <sup>cre</sup> Nr4a1 <sup>F/F</sup> Nr4a2 <sup>F/F</sup> dKO	No detectable signs of autoimmunity (Nr4a1/3 dKO and Nr4a1/2/3 tKO develop lethal autoimmunity)	No	[63]
PI3K	Foxp3 <sup>cre</sup> p110d <sup>F/F</sup>	No detectable signs of autoimmunity	No	[44]

n.d.: not described; dKO: double knock-out; tKO: triple knock-out.

### 6.3. The Issue of Multiple Cell Type Targeting with a Single Agent

The vast majority of the studies described in Section 3 have used Treg-cell-restricted deletion of gene(s) as models. However, it is obvious that many of these transcription factors and regulators also are expressed by other cell types and may impact their function. To ensure the specificity and potency of novel therapeutics, we should at some point obtain a global view of the molecular regulation of the tumor microenvironment as a whole, i.e., assess the potential role of these pathways in other immune cells, as well as in tumor and stromal cells. In some cases, small-molecule inhibitors may impair the fitness of both Treg cells and tumor cells, thus exhibiting a double beneficial effect to restrict cancer progression. This is clearly illustrated, for the various inhibitors of the NF- $\kappa$ B pathway described above. Indeed, in addition to their effect on Treg cell stability, mepazine, KINK-1, or PTXF have all been shown to directly impair tumor cell proliferation, gene expression, and invasiveness [137–141]. However, it is important to keep in mind that signaling pathways and transcription factors can also be expressed and required by anti-tumor immune cells, such as Tconv cells. Once again, this is the case for NF- $\kappa$ B, well-described as a critical component of Tconv cell function in many settings, including cancer [142–145]. This need for a global delineation of the different players is further illustrated by the importance of the balance between Treg and Th17 cells in many cancer types [146]. Indeed, it appears that the same pathways and transcription factors (e.g., STAT3, NF- $\kappa$ B, or Notch) can be involved in the differentiation and function of both subsets. Thereby, important work remains to be done to dissect the different cell types and mechanisms that can be triggered or targeted by a single agent. This could lead to the use of Treg-cell-directed compounds, for instance, using antibody–drug conjugates that are currently under development [145].

### 6.4. Mouse and Human Treg Cells: Commonalities and Divergences

Mechanistic understanding of the pathways involved in the suppression of tumor immunity by Treg cells has required the use of mouse models. These have enabled the discovery of a myriad therapeutic targets. Nevertheless, it is now essential to compare the expression of transcription factors in murine and human Treg cells and to investigate whether these proteins exhibit similar or divergent functions. This need is exemplified by the absence of consensus on the phenotype of human Treg cells. For instance, FOXP3 can also be expressed by a subset of effector T cells [35,36]. In addition, even the function of human Treg cells in promoting tumor growth is controversial or at least is dependent on the type of cancer [9].

## 7. Conclusions

Different strategies can be considered to impair Treg cell “fitness” in cancers. Protocols aiming at impairing their numbers (recruitment, expansion, survival, etc.) or their suppressive function (CTLA-4, inhibitory cytokines, etc.) are under extensive investigation. The amount of literature described above now suggests that by modulating the transcriptional profile of Treg cells, their potential instability can be exploited in a therapeutic manner. Indeed, instead of depleting Treg cells, strategies aiming at reprogramming Treg cells into anti-tumor cells deserve further development. It may seem optimistic to find the “perfect” mechanism, i.e., a targetable pathway or transcription factor selectively involved in human Treg (but not Tconv) cells, specifically in the tumor (but not normal tissues). However, novel technologies, such as single-cell sequencing and CRISPR/Cas9 approaches, should help unravel fundamental mechanisms in the biology of human Treg cells in cancer, and thus provide a strong rationale for the use of modulators of the transcriptional process for cancer therapy.

**Author Contributions:** Conceptualization, Y.G.-B.; writing—original draft preparation, Y.G.-B.; writing—review and editing, P.S., R.L., and A.V.; 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 and the Labex DEVweCAN (ANR-10-LABX-0061). P.S. is funded by the Federation pour la Recherche Médicale, A.V. has a postdoctoral fellowship from the Association pour la Recherche contre le Cancer.

**Acknowledgments:** The authors are grateful to Guilhem Lalle, Julie Twardowski, and Brigitte Manship for their critical reading of the manuscript and helpful discussions.

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

## References

1. Sakaguchi, S.; Yamaguchi, T.; Nomura, T.; Ono, M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* **2008**, *133*, 775–787. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Godfrey, V.L.; Wilkinson, J.E.; Russell, L.B. X-linked lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mutant mouse. *Am. J. Pathol.* **1991**, *138*, 1379–1387. [[PubMed](#)]
3. Bennett, C.L.; Christie, J.; Ramsdell, F.; Brunkow, M.E.; Ferguson, P.J.; Whitesell, L.; Kelly, T.E.; Saulsbury, F.T.; Chance, P.F.; Ochs, H.D. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat. Genet.* **2001**, *27*, 20–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Kim, J.M.; Rasmussen, J.P.; Rudensky, A.Y. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat. Immunol.* **2007**, *8*, 191–197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Lahl, K.; Loddenkemper, C.; Drouin, C.; Freyer, J.; Arnason, J.; Eberl, G.; Hamann, A.; Wagner, H.; Huehn, J.; Sparwasser, T. Selective depletion of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *J. Exp. Med.* **2007**, *204*, 57–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Vignali, D.A.; Collison, L.W.; Workman, C.J. How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* **2008**, *8*, 523–532. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Onizuka, S.; Tawara, I.; Shimizu, J.; Sakaguchi, S.; Fujita, T.; Nakayama, E. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 3128–3133.
8. Nishikawa, H.; Sakaguchi, S. Regulatory T cells in tumor immunity. *Int. J. Cancer* **2010**, *127*, 759–767. [[CrossRef](#)]
9. Whiteside, T.L. FOXP3<sup>+</sup> Treg as a therapeutic target for promoting anti-tumor immunity. *Expert Opin. Ther. Targets* **2018**, *22*, 353–363. [[CrossRef](#)]
10. Simpson, T.R.; Li, F.; Montalvo-Ortiz, W.; Sepulveda, M.A.; Bergerhoff, K.; Arce, F.; Roddie, C.; Henry, J.Y.; Yagita, H.; Wolchok, J.D.; et al. Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *J. Exp. Med.* **2013**, *210*, 1695–1710. [[CrossRef](#)]
11. Arce Vargas, F.; Furness, A.J.S.; Litchfield, K.; Joshi, K.; Rosenthal, R.; Ghorani, E.; Solomon, I.; Lesko, M.H.; Ruef, N.; Roddie, C.; et al. Fc Effector Function Contributes to the Activity of Human Anti-CTLA-4 Antibodies. *Cancer Cell* **2018**, *33*, 649–663. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Sharma, A.; Subudhi, S.K.; Blando, J.; Vence, L.; Wargo, J.; Allison, J.P.; Ribas, A.; Sharma, P. Anti-CTLA-4 Immunotherapy Does Not Deplete FOXP3(+) Regulatory T Cells (Tregs) in Human Cancers-Response. *Clin. Cancer Res.* **2019**, *25*, 3469–3470. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Cai, J.; Wang, D.; Zhang, G.; Guo, X. The Role Of PD-1/PD-L1 Axis in Treg Development and Function: Implications for Cancer Immunotherapy. *Onco. Targets Ther.* **2019**, *12*, 8437–8445. [[CrossRef](#)]
14. Kamada, T.; Togashi, Y.; Tay, C.; Ha, D.; Sasaki, A.; Nakamura, Y.; Sato, E.; Fukuoka, S.; Tada, Y.; Tanaka, A.; et al. PD-1(+) regulatory T cells amplified by PD-1 blockade promote hyperprogression of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 9999–10008. [[CrossRef](#)]
15. Lee, W.; Lee, G.R. Transcriptional regulation and development of regulatory T cells. *Exp. Mol. Med.* **2018**, *50*, e456. [[CrossRef](#)]
16. Savage, P.A.; Klawon, D.E.J.; Miller, C.H. Regulatory T Cell Development. *Annu. Rev. Immunol.* **2020**, *38*, 421–453. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Koizumi, S.I.; Ishikawa, H. Transcriptional Regulation of Differentiation and Functions of Effector T Regulatory Cells. *Cells* **2019**, *8*, 939. [[CrossRef](#)]
18. Plitas, G.; Konopacki, C.; Wu, K.; Bos, P.D.; Morrow, M.; Putintseva, E.V.; Chudakov, D.M.; Rudensky, A.Y. Regulatory T Cells Exhibit Distinct Features in Human Breast Cancer. *Immunity* **2016**, *45*, 1122–1134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. De Simone, M.; Arrighoni, A.; Rossetti, G.; Gruarin, P.; Ranzani, V.; Politano, C.; Bonnal, R.J.P.; Provasi, E.; Sarnicola, M.L.; Panzeri, I.; et al. Transcriptional Landscape of Human Tissue Lymphocytes Unveils Uniqueness of Tumor-Infiltrating T Regulatory Cells. *Immunity* **2016**, *45*, 1135–1147. [[CrossRef](#)]

20. Rudensky, A.Y. Regulatory T cells and Foxp3. *Immunol. Rev.* **2011**, *241*, 260–268. [[CrossRef](#)]
21. Samstein, R.M.; Arvey, A.; Josefowicz, S.Z.; Peng, X.; Reynolds, A.; Sandstrom, R.; Neph, S.; Sabo, P.; Kim, J.M.; Liao, W.; et al. Foxp3 exploits a pre-existent enhancer landscape for regulatory T cell lineage specification. *Cell* **2012**, *151*, 153–166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Rudra, D.; deRoos, P.; Chaudhry, A.; Niec, R.E.; Arvey, A.; Samstein, R.M.; Leslie, C.; Shaffer, S.A.; Goodlett, D.R.; Rudensky, A.Y. Transcription factor Foxp3 and its protein partners form a complex regulatory network. *Nat. Immunol.* **2012**, *13*, 1010–1019. [[CrossRef](#)]
23. Kwon, H.K.; Chen, H.M.; Mathis, D.; Benoist, C. Different molecular complexes that mediate transcriptional induction and repression by FoxP3. *Nat. Immunol.* **2017**, *18*, 1238–1248. [[CrossRef](#)]
24. Cretney, E.; Xin, A.; Shi, W.; Minnich, M.; Masson, F.; Miasari, M.; Belz, G.T.; Smyth, G.K.; Busslinger, M.; Nutt, S.L.; et al. The transcription factors Blimp-1 and IRF4 jointly control the differentiation and function of effector regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **2011**, *12*, 304–311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Dias, S.; D’Amico, A.; Cretney, E.; Liao, Y.; Tellier, J.; Bruggeman, C.; Almeida, F.F.; Leahy, J.; Belz, G.T.; Smyth, G.K.; et al. Effector Regulatory T Cell Differentiation and Immune Homeostasis Depend on the Transcription Factor Myb. *Immunity* **2017**, *46*, 78–91. [[CrossRef](#)]
26. 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-kappaB c-Rel Is Crucial for the Regulatory T Cell Immune Checkpoint in Cancer. *Cell* **2017**, *170*, 1096–1108.e13. [[CrossRef](#)]
27. Vasanthakumar, A.; Liao, Y.; Teh, P.; Pascutti, M.F.; Oja, A.E.; Garnham, A.L.; Gloury, R.; Tempany, J.C.; Sidwell, T.; Cuadrado, E.; et al. The TNF Receptor Superfamily-NF-kappaB Axis Is Critical to Maintain Effector Regulatory T Cells in Lymphoid and Non-lymphoid Tissues. *Cell Rep.* **2017**, *20*, 2906–2920. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Koizumi, S.I.; Sasaki, D.; Hsieh, T.H.; Taira, N.; Arakaki, N.; Yamasaki, S.; Wang, K.; Sarkar, S.; Shirahata, H.; Miyagi, M.; et al. JunB regulates homeostasis and suppressive functions of effector regulatory T cells. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 5344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Han, X.; Huang, H.; Gao, P.; Zhang, Q.; Liu, X.; Jia, B.; Strober, W.; Hou, B.; Zhou, X.; Gao, G.F.; et al. E-protein regulatory network links TCR signaling to effector Treg cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 4471–4480. [[CrossRef](#)]
30. Luo, C.T.; Liao, W.; Dadi, S.; Toure, A.; Li, M.O. Graded Foxo1 activity in Treg cells differentiates tumour immunity from spontaneous autoimmunity. *Nature* **2016**, *529*, 532–536. [[CrossRef](#)]
31. Wang, K.; Fu, W. Transcriptional regulation of Treg homeostasis and functional specification. *Cell. Mol. Life Sci.* **2020**, *77*, 4269–4287. [[CrossRef](#)]
32. Casares, N.; Rudilla, F.; Arribillaga, L.; Llopiz, D.; Riezu-Boj, J.I.; Lozano, T.; Lopez-Sagaseta, J.; Guembe, L.; Sarobe, P.; Prieto, J.; et al. A peptide inhibitor of FOXP3 impairs regulatory T cell activity and improves vaccine efficacy in mice. *J. Immunol.* **2010**, *185*, 5150–5159. [[CrossRef](#)]
33. Lozano, T.; Villanueva, L.; Durantez, M.; Gorraiz, M.; Ruiz, M.; Belsue, V.; Riezu-Boj, J.I.; Hervas-Stubbs, S.; Oyarzabal, J.; Bandukwala, H.; et al. Inhibition of FOXP3/NFAT Interaction Enhances T Cell Function after TCR Stimulation. *J. Immunol.* **2015**, *195*, 3180–3189. [[CrossRef](#)]
34. Lozano, T.; Gorraiz, M.; Lasarte-Cia, A.; Ruiz, M.; Rabal, O.; Oyarzabal, J.; Hervas-Stubbs, S.; Llopiz, D.; Sarobe, P.; Prieto, J.; et al. Blockage of FOXP3 transcription factor dimerization and FOXP3/AML1 interaction inhibits T regulatory cell activity: Sequence optimization of a peptide inhibitor. *Oncotarget* **2017**, *8*, 71709–71724. [[CrossRef](#)]
35. Wang, J.; Ioan-Facsinay, A.; van der Voort, E.I.; Huizinga, T.W.; Toes, R.E. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *Eur. J. Immunol.* **2007**, *37*, 129–138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Miyara, M.; Yoshioka, Y.; Kitoh, A.; Shima, T.; Wing, K.; Niwa, A.; Parizot, C.; Taflin, C.; Heike, T.; Valeyre, D.; et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* **2009**, *30*, 899–911. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Huber, M.; Lohoff, M. IRF4 at the crossroads of effector T-cell fate decision. *Eur. J. Immunol.* **2014**, *44*, 1886–1895. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Zheng, Y.; Chaudhry, A.; Kas, A.; deRoos, P.; Kim, J.M.; Chu, T.T.; Corcoran, L.; Treuting, P.; Klein, U.; Rudensky, A.Y. Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses. *Nature* **2009**, *458*, 351–356. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



39. Alvisi, G.; Brummelman, J.; Puccio, S.; Mazza, E.M.; Tomada, E.P.; Losurdo, A.; Zanon, V.; Peano, C.; Colombo, F.S.; Scarpa, A.; et al. IRF4 instructs effector Treg differentiation and immune suppression in human cancer. *J. Clin. Investig.* **2020**, *130*, 3137–3150. [[CrossRef](#)]
40. Man, K.; Gabriel, S.S.; Liao, Y.; Gloury, R.; Preston, S.; Henstridge, D.C.; Pellegrini, M.; Zehn, D.; Berberich-Siebelt, F.; Febbraio, M.A.; et al. Transcription Factor IRF4 Promotes CD8(+) T Cell Exhaustion and Limits the Development of Memory-like T Cells during Chronic Infection. *Immunity* **2017**, *47*, 1129–1141.e5. [[CrossRef](#)]
41. Sharma, M.D.; Shinde, R.; McGaha, T.L.; Huang, L.; Holmgaard, R.B.; Wolchok, J.D.; Mautino, M.R.; Celis, E.; Sharpe, A.H.; Francisco, L.M.; et al. The PTEN pathway in Tregs is a critical driver of the suppressive tumor microenvironment. *Sci. Adv.* **2015**, *1*, e1500845. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Delgoffe, G.M.; Woo, S.R.; Turnis, M.E.; Gravano, D.M.; Guy, C.; Overacre, A.E.; Bettini, M.L.; Vogel, P.; Finkelstein, D.; Bonnevier, J.; et al. Stability and function of regulatory T cells is maintained by a neuropilin-1-semaphorin-4a axis. *Nature* **2013**, *501*, 252–256. [[CrossRef](#)]
43. Overacre-Delgoffe, A.E.; Chikina, M.; Dadey, R.E.; Yano, H.; Brunazzi, E.A.; Shayan, G.; Horne, W.; Moskovitz, J.M.; Kolls, J.K.; Sander, C.; et al. Interferon-gamma Drives Treg Fragility to Promote Anti-tumor Immunity. *Cell* **2017**, *169*, 1130–1141.e11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Ali, K.; Soond, D.R.; Pineiro, R.; Hagemann, T.; Pearce, W.; Lim, E.L.; Bouabe, H.; Scudamore, C.L.; Hancox, T.; Maecker, H.; et al. Inactivation of PI(3)K p110delta breaks regulatory T-cell-mediated immune tolerance to cancer. *Nature* **2014**, *510*, 407–411. [[CrossRef](#)]
45. Lim, E.L.; Cugliandolo, F.M.; Rosner, D.R.; Gyori, D.; Roychoudhuri, R.; Okkenhaug, K. Phosphoinositide 3-kinase delta inhibition promotes antitumor responses but antagonizes checkpoint inhibitors. *JCI Insight* **2018**, *3*, e120626. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Abu-Eid, R.; Samara, R.N.; Ozbun, L.; Abdalla, M.Y.; Berzofsky, J.A.; Friedman, K.M.; Mkrtichyan, M.; Khleif, S.N. Selective inhibition of regulatory T cells by targeting the PI3K-Akt pathway. *Cancer Immunol. Res.* **2014**, *2*, 1080–1089. [[CrossRef](#)]
47. Chellappa, S.; Kushekhar, K.; Munthe, L.A.; Tjonmfjord, G.E.; Aandahl, E.M.; Okkenhaug, K.; Tasken, K. The PI3K p110delta Isoform Inhibitor Idelalisib Preferentially Inhibits Human Regulatory T Cell Function. *J. Immunol.* **2019**, *202*, 1397–1405. [[CrossRef](#)]
48. Ouyang, W.; Liao, W.; Luo, C.T.; Yin, N.; Huse, M.; Kim, M.V.; Peng, M.; Chan, P.; Ma, Q.; Mo, Y.; et al. Novel Foxo1-dependent transcriptional programs control T(reg) cell function. *Nature* **2012**, *491*, 554–559. [[CrossRef](#)]
49. Kim, H.J.; Barnitz, R.A.; Kreslavsky, T.; Brown, F.D.; Moffett, H.; Lemieux, M.E.; Kaygusuz, Y.; Meissner, T.; Holderried, T.A.; Chan, S.; et al. Stable inhibitory activity of regulatory T cells requires the transcription factor Helios. *Science* **2015**, *350*, 334–339. [[CrossRef](#)]
50. Thornton, A.M.; Korty, P.E.; Tran, D.Q.; Wohlfert, E.A.; Murray, P.E.; Belkaid, Y.; Shevach, E.M. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J. Immunol.* **2010**, *184*, 3433–3441. [[CrossRef](#)]
51. Gottschalk, R.A.; Corse, E.; Allison, J.P. Expression of Helios in peripherally induced Foxp3+ regulatory T cells. *J. Immunol.* **2012**, *188*, 976–980. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Sebastian, M.; Lopez-Ocasio, M.; Metidji, A.; Rieder, S.A.; Shevach, E.M.; Thornton, A.M. Helios Controls a Limited Subset of Regulatory T Cell Functions. *J. Immunol.* **2016**, *196*, 144–155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Nakagawa, H.; Sido, J.M.; Reyes, E.E.; Kiers, V.; Cantor, H.; Kim, H.J. Instability of Helios-deficient Tregs is associated with conversion to a T-effector phenotype and enhanced antitumor immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 6248–6253. [[CrossRef](#)]
54. Yates, K.; Bi, K.; Haining, W.N.; Cantor, H.; Kim, H.J. Comparative transcriptome analysis reveals distinct genetic modules associated with Helios expression in intratumoral regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 2162–2167. [[CrossRef](#)]
55. Li, X.; Li, D.; Huang, X.; Zhou, P.; Shi, Q.; Zhang, B.; Ju, X. Helios expression in regulatory T cells promotes immunosuppression, angiogenesis and the growth of leukemia cells in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Res.* **2018**, *67*, 60–66. [[CrossRef](#)]
56. Cai, Q.; Dierich, A.; Oulad-Abdelghani, M.; Chan, S.; Kastner, P. Helios deficiency has minimal impact on T cell development and function. *J. Immunol.* **2009**, *183*, 2303–2311. [[CrossRef](#)]

57. Pan, F.; Yu, H.; Dang, E.V.; Barbi, J.; Pan, X.; Grosso, J.F.; Jinasena, D.; Sharma, S.M.; McCadden, E.M.; Getnet, D.; et al. Eos mediates Foxp3-dependent gene silencing in CD4+ regulatory T cells. *Science* **2009**, *325*, 1142–1146. [[CrossRef](#)]
58. Rieder, S.A.; Metidji, A.; Glass, D.D.; Thornton, A.M.; Ikeda, T.; Morgan, B.A.; Shevach, E.M. Eos Is Redundant for Regulatory T Cell Function but Plays an Important Role in IL-2 and Th17 Production by CD4+ Conventional T Cells. *J. Immunol.* **2015**, *195*, 553–563. [[CrossRef](#)]
59. Gokhale, A.S.; Gangapara, A.; Lopez-Occasio, M.; Thornton, A.M.; Shevach, E.M. Selective deletion of Eos (Ikzf4) in T-regulatory cells leads to loss of suppressive function and development of systemic autoimmunity. *J. Autoimmun.* **2019**, *105*, 102300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Moran, A.E.; Holzapfel, K.L.; Xing, Y.; Cunningham, N.R.; Maltzman, J.S.; Punt, J.; Hogquist, K.A. T cell receptor signal strength in Treg and iNKT cell development demonstrated by a novel fluorescent reporter mouse. *J. Exp. Med.* **2011**, *208*, 1279–1289. [[CrossRef](#)]
61. Sekiya, T.; Kashiwagi, I.; Inoue, N.; Morita, R.; Hori, S.; Waldmann, H.; Rudensky, A.Y.; Ichinose, H.; Metzger, D.; Chambon, P.; et al. The nuclear orphan receptor Nr4a2 induces Foxp3 and regulates differentiation of CD4+ T cells. *Nat. Commun.* **2011**, *2*, 269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Sekiya, T.; Kashiwagi, I.; Yoshida, R.; Fukaya, T.; Morita, R.; Kimura, A.; Ichinose, H.; Metzger, D.; Chambon, P.; Yoshimura, A. Nr4a receptors are essential for thymic regulatory T cell development and immune homeostasis. *Nat. Immunol.* **2013**, *14*, 230–237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Sekiya, T.; Kondo, T.; Shichita, T.; Morita, R.; Ichinose, H.; Yoshimura, A. Suppression of Th2 and Tfh immune reactions by Nr4a receptors in mature T reg cells. *J. Exp. Med.* **2015**, *212*, 1623–1640. [[CrossRef](#)]
64. Hibino, S.; Chikuma, S.; Kondo, T.; Ito, M.; Nakatsukasa, H.; Omata-Mise, S.; Yoshimura, A. Inhibition of Nr4a Receptors Enhances Antitumor Immunity by Breaking Treg-Mediated Immune Tolerance. *Cancer Res.* **2018**, *78*, 3027–3040. [[CrossRef](#)]
65. Venditto, V.J.; Simanek, E.E. Cancer therapies utilizing the camptothecins: A review of the in vivo literature. *Mol. Pharm.* **2010**, *7*, 307–349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Chen, J.; Lopez-Moyado, I.F.; Seo, H.; Lio, C.J.; Hempleman, L.J.; Sekiya, T.; Yoshimura, A.; Scott-Browne, J.P.; Rao, A. NR4A transcription factors limit CAR T cell function in solid tumours. *Nature* **2019**, *567*, 530–534. [[CrossRef](#)]
67. Liu, X.; Wang, Y.; Lu, H.; Li, J.; Yan, X.; Xiao, M.; Hao, J.; Alekseev, A.; Khong, H.; Chen, T.; et al. Genome-wide analysis identifies NR4A1 as a key mediator of T cell dysfunction. *Nature* **2019**, *567*, 525–529. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Roychoudhuri, R.; Clever, D.; Li, P.; Wakabayashi, Y.; Quinn, K.M.; Klebanoff, C.A.; Ji, Y.; Sukumar, M.; Eil, R.L.; Yu, Z.; et al. BACH2 regulates CD8(+) T cell differentiation by controlling access of AP-1 factors to enhancers. *Nat. Immunol.* **2016**, *17*, 851–860. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Jang, E.; Lee, H.R.; Lee, G.H.; Oh, A.R.; Cha, J.Y.; Igarashi, K.; Youn, J. Bach2 represses the AP-1-driven induction of interleukin-2 gene transcription in CD4 T cells. *BMB Rep.* **2017**, *50*, 472–477. [[CrossRef](#)]
70. Roychoudhuri, R.; Hirahara, K.; Mousavi, K.; Clever, D.; Klebanoff, C.A.; Bonelli, M.; Sciume, G.; Zare, H.; Vahedi, G.; Dema, B.; et al. BACH2 represses effector programs to stabilize T(reg)-mediated immune homeostasis. *Nature* **2013**, *498*, 506–510. [[CrossRef](#)]
71. Kim, E.H.; Gasper, D.J.; Lee, S.H.; Plisch, E.H.; Svaren, J.; Suresh, M. Bach2 regulates homeostasis of Foxp3+ regulatory T cells and protects against fatal lung disease in mice. *J. Immunol.* **2014**, *192*, 985–995. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Sidwell, T.; Liao, Y.; Garnham, A.L.; Vasanthakumar, A.; Gloury, R.; Blume, J.; Teh, P.P.; Chisanga, D.; Thelemann, C.; de Labastida Rivera, F.; et al. Attenuation of TCR-induced transcription by Bach2 controls regulatory T cell differentiation and homeostasis. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 252. [[CrossRef](#)]
73. Yu, X.; Lao, Y.; Teng, X.L.; Li, S.; Zhou, Y.; Wang, F.; Guo, X.; Deng, S.; Chang, Y.; Wu, X.; et al. SENP3 maintains the stability and function of regulatory T cells via BACH2 deSUMOylation. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 3157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Roychoudhuri, R.; Eil, R.L.; Clever, D.; Klebanoff, C.A.; Sukumar, M.; Grant, F.M.; Yu, Z.; Mehta, G.; Liu, H.; Jin, P.; et al. The transcription factor BACH2 promotes tumor immunosuppression. *J. Clin. Investig.* **2016**, *126*, 599–604. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

75. Grant, F.M.; Yang, J.; Nasrallah, R.; Clarke, J.; Sadiyah, F.; Whiteside, S.K.; Imianowski, C.J.; Kuo, P.; Vardaka, P.; Todorov, T.; et al. BACH2 drives quiescence and maintenance of resting Treg cells to promote homeostasis and cancer immunosuppression. *J. Exp. Med.* **2020**, *217*, e20190711. [[CrossRef](#)]
76. Miyazaki, M.; Miyazaki, K.; Chen, S.; Itoi, M.; Miller, M.; Lu, L.F.; Varki, N.; Chang, A.N.; Broide, D.H.; Murre, C. Id2 and Id3 maintain the regulatory T cell pool to suppress inflammatory disease. *Nat. Immunol.* **2014**, *15*, 767–776. [[CrossRef](#)]
77. Hwang, S.M.; Sharma, G.; Verma, R.; Byun, S.; Rudra, D.; Im, S.H. Inflammation-induced Id2 promotes plasticity in regulatory T cells. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 4736. [[CrossRef](#)]
78. Zorn, E.; Nelson, E.A.; Mohseni, M.; Porcheray, F.; Kim, H.; Litsa, D.; Bellucci, R.; Raderschall, E.; Canning, C.; Soiffer, R.J.; et al. IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood* **2006**, *108*, 1571–1579. [[CrossRef](#)]
79. Kortylewski, M.; Xin, H.; Kujawski, M.; Lee, H.; Liu, Y.; Harris, T.; Drake, C.; Pardoll, D.; Yu, H. Regulation of the IL-23 and IL-12 balance by Stat3 signaling in the tumor microenvironment. *Cancer Cell* **2009**, *15*, 114–123. [[CrossRef](#)]
80. Chaudhry, A.; Rudra, D.; Treuting, P.; Samstein, R.M.; Liang, Y.; Kas, A.; Rudensky, A.Y. CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. *Science* **2009**, *326*, 986–991. [[CrossRef](#)]
81. Oweida, A.J.; Darragh, L.; Phan, A.; Binder, D.; Bhatia, S.; Mueller, A.; Court, B.V.; Milner, D.; Raben, D.; Woessner, R.; et al. STAT3 Modulation of Regulatory T Cells in Response to Radiation Therapy in Head and Neck Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **2019**, *111*, 1339–1349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. He, W.; Zhu, Y.; Mu, R.; Xu, J.; Zhang, X.; Wang, C.; Li, Q.; Huang, Z.; Zhang, J.; Pan, Y.; et al. A Jak2-selective inhibitor potently reverses the immune suppression by modulating the tumor microenvironment for cancer immunotherapy. *Biochem. Pharmacol.* **2017**, *145*, 132–146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Rebe, C.; Ghiringhelli, F. STAT3, a Master Regulator of Anti-Tumor Immune Response. *Cancers (Basel)* **2019**, *11*, 1280. [[CrossRef](#)]
84. Hayden, M.S.; Ghosh, S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* **2008**, *132*, 344–362. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Grinberg-Bleyer, Y.; Caron, R.; Seeley, J.J.; De Silva, N.S.; Schindler, C.W.; Hayden, M.S.; Klein, U.; Ghosh, S. The Alternative NF-kappaB Pathway in Regulatory T Cell Homeostasis and Suppressive Function. *J. Immunol.* **2018**, *200*, 2362–2371. [[CrossRef](#)]
86. Di Pilato, M.; Kim, E.Y.; Cadilha, B.L.; Prussmann, 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](#)]
87. Heuser, C.; Gotot, J.; Piotrowski, E.C.; Philipp, M.S.; Courreges, C.J.F.; Otte, M.S.; Guo, L.; Schmid-Burgk, J.L.; Hornung, V.; Heine, A.; et al. Prolonged IKKbeta Inhibition Improves Ongoing CTL Antitumor Responses by Incapacitating Regulatory T Cells. *Cell Rep.* **2017**, *21*, 578–586. [[CrossRef](#)]
88. 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](#)]
89. 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](#)]
90. 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-kappaB Transcription-Factor-Dependent Lineage-Specific Transcriptional Program Promotes Regulatory T Cell Identity and Function. *Immunity* **2017**, *47*, 450–465.e5. [[CrossRef](#)]
91. Konczalla, L.; Perez, D.R.; Wenzel, N.; Wolters-Eisfeld, G.; Klemp, C.; Luddeke, J.; Wolski, A.; Landschulze, D.; Meier, C.; Buchholz, A.; et al. Biperiden and mepazine effectively inhibit MALT1 activity and tumor growth in pancreatic cancer. *Int. J. Cancer* **2020**, *146*, 1618–1630. [[CrossRef](#)]
92. Wang, Y.; Lu, J.; Jiang, B.; Guo, J. The roles of curcumin in regulating the tumor immunosuppressive microenvironment. *Oncol. Lett.* **2020**, *19*, 3059–3070. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. 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](#)]

94. 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](#)]
95. 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](#)]
96. Xu, B.; Yu, L.; Zhao, L.Z. Curcumin up regulates T helper 1 cells in patients with colon cancer. *Am. J. Transl. Res.* **2017**, *9*, 1866–1875. [[PubMed](#)]
97. Li, T.; Li, X.; Zamani, A.; Wang, W.; Lee, C.N.; Li, M.; Jin, J.; Ramachandran, M.; Qingguo, R.; Weiyun, S.; et al. c-Rel is a myeloid checkpoint for cancer immunotherapy. *Nat. Cancer* **2020**, *1*, 507–517. [[CrossRef](#)]
98. Gao, F.; Cheng, Q.; Liu, M.D.; Rong, L.; Liu, 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](#)]
99. Shono, Y.; Tuckett, A.Z.; Liou, H.C.; Doubrovina, E.; Derenzini, E.; Ouk, S.; Tsai, J.J.; Smith, O.M.; Levy, E.R.; Kreines, F.M.; et al. Characterization of a c-Rel Inhibitor That Mediates Anticancer Properties in Hematologic Malignancies by Blocking NF-kappaB-Controlled Oxidative Stress Responses. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 377–389. [[CrossRef](#)]
100. Neo, W.H.; Lim, J.F.; Grumont, R.; Gerondakis, S.; Su, I.H. c-Rel regulates Ezh2 expression in activated lymphocytes and malignant lymphoid cells. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 31693–31707. [[CrossRef](#)]
101. Hunter, J.E.; Butterworth, J.A.; Zhao, B.; Sellier, H.; Campbell, K.J.; Thomas, H.D.; Bacon, C.M.; Cockell, S.J.; Gewurz, B.E.; Perkins, N.D. The NF-kappaB subunit c-Rel regulates Bach2 tumour suppressor expression in B-cell lymphoma. *Oncogene* **2016**, *35*, 3476–3484. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Grumont, R.J.; Gerondakis, S. Rel induces interferon regulatory factor 4 (IRF-4) expression in lymphocytes: Modulation of interferon-regulated gene expression by rel/nuclear factor kappaB. *J. Exp. Med.* **2000**, *191*, 1281–1292. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Xia, Y.; Shen, S.; Verma, I.M. NF-kappaB, an active player in human cancers. *Cancer Immunol. Res.* **2014**, *2*, 823–830. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Gilmore, T.D.; Herscovitch, M. Inhibitors of NF-kappaB signaling: 785 and counting. *Oncogene* **2006**, *25*, 6887–6899. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Baud, V.; Karin, M. Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 33–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Leporini, C.; Pisano, A.; Russo, E.; D'Arrigo, G.; de Sarro, G.; Coppolino, G.; Bolignano, D. Effect of pentoxifylline on renal outcomes in chronic kidney disease patients: A systematic review and meta-analysis. *Pharm. Res.* **2016**, *107*, 315–332. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Arvey, A.; van der Veecken, J.; Samstein, R.M.; Feng, Y.; Stamatoyannopoulos, J.A.; Rudensky, A.Y. Inflammation-induced repression of chromatin bound by the transcription factor Foxp3 in regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **2014**, *15*, 580–587. [[CrossRef](#)]
108. DuPage, M.; Chopra, G.; Quiros, J.; Rosenthal, W.L.; Morar, M.M.; Holohan, D.; Zhang, R.; Turka, L.; Marson, A.; Bluestone, J.A. The chromatin-modifying enzyme Ezh2 is critical for the maintenance of regulatory T cell identity after activation. *Immunity* **2015**, *42*, 227–238. [[CrossRef](#)]
109. Yang, X.P.; Jiang, K.; Hirahara, K.; Vahedi, G.; Afzali, B.; Sciume, G.; Bonelli, M.; Sun, H.W.; Jankovic, D.; Kanno, Y.; et al. EZH2 is crucial for both differentiation of regulatory T cells and T effector cell expansion. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 10643. [[CrossRef](#)]
110. Wang, D.; Quiros, J.; Mahuron, K.; Pai, C.C.; Ranzani, V.; Young, A.; Silveria, S.; Harwin, T.; Abnousian, A.; Pagani, M.; et al. Targeting EZH2 Reprograms Intratumoral Regulatory T Cells to Enhance Cancer Immunity. *Cell Rep.* **2018**, *23*, 3262–3274. [[CrossRef](#)]
111. Goswami, S.; Apostolou, I.; Zhang, J.; Skepner, J.; Anandhan, S.; Zhang, X.; Xiong, L.; Trojer, P.; Aparicio, A.; Subudhi, S.K.; et al. Modulation of EZH2 expression in T cells improves efficacy of anti-CTLA-4 therapy. *J. Clin. Investig.* **2018**, *128*, 3813–3818. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Kim, K.H.; Roberts, C.W. Targeting EZH2 in cancer. *Nat. Med.* **2016**, *22*, 128–134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Zingg, D.; Arenas-Ramirez, N.; Sahin, D.; Rosalia, R.A.; Antunes, A.T.; Haeusel, J.; Sommer, L.; Boyman, O. The Histone Methyltransferase Ezh2 Controls Mechanisms of Adaptive Resistance to Tumor Immunotherapy. *Cell Rep.* **2017**, *20*, 854–867. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

114. Wang, L.; Beier, U.H.; Akimova, T.; Dahiya, S.; Han, R.; Samanta, A.; Levine, M.H.; Hancock, W.W. Histone/protein deacetylase inhibitor therapy for enhancement of Foxp3+ T-regulatory cell function posttransplantation. *Am. J. Transpl.* **2018**, *18*, 1596–1603. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Shen, L.; Ciesielski, M.; Ramakrishnan, S.; Miles, K.M.; Ellis, L.; Sotomayor, P.; Shrikant, P.; Fenstermaker, R.; Pili, R. Class I histone deacetylase inhibitor entinostat suppresses regulatory T cells and enhances immunotherapies in renal and prostate cancer models. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e30815. [[CrossRef](#)]
116. Xiong, Y.; Wang, L.; Di Giorgio, E.; Akimova, T.; Beier, U.H.; Han, R.; Trevisanut, M.; Kalin, J.H.; Cole, P.A.; Hancock, W.W. Inhibiting the coregulator CoREST impairs Foxp3+ Treg function and promotes antitumor immunity. *J. Clin. Investig.* **2020**, *130*, 1830–1842. [[CrossRef](#)]
117. Liu, Y.; Wang, L.; Predina, J.; Han, R.; Beier, U.H.; Wang, L.C.; Kapoor, V.; Bhatti, T.R.; Akimova, T.; Singhal, S.; et al. Inhibition of p300 impairs Foxp3(+) T regulatory cell function and promotes antitumor immunity. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 1173–1177. [[CrossRef](#)]
118. Bates, S.E. Epigenetic Therapies for Cancer. *New Engl. J. Med.* **2020**, *383*, 650–663. [[CrossRef](#)]
119. Moreno Ayala, M.A.; Li, Z.; DuPage, M. Treg programming and therapeutic reprogramming in cancer. *Immunology* **2019**, *157*, 198–209. [[CrossRef](#)]
120. Lio, C.W.; Hsieh, C.S. A two-step process for thymic regulatory T cell development. *Immunity* **2008**, *28*, 100–111. [[CrossRef](#)]
121. Chinen, T.; Kannan, A.K.; Levine, A.G.; Fan, X.; Klein, U.; Zheng, Y.; Gasteiger, G.; Feng, Y.; Fontenot, J.D.; Rudensky, A.Y. An essential role for the IL-2 receptor in Treg cell function. *Nat. Immunol.* **2016**, *17*, 1322–1333. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Wu, Y.; Borde, M.; Heissmeyer, V.; Feuerer, M.; Lapan, A.D.; Stroud, J.C.; Bates, D.L.; Guo, L.; Han, A.; Ziegler, S.F.; et al. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell* **2006**, *126*, 375–387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Garg, G.; Muschawekch, A.; Moreno, H.; Vasanthakumar, A.; Floess, S.; Lepenietier, G.; Oellinger, R.; Zhan, Y.; Regen, T.; Hiltensperger, M.; et al. Blimp1 Prevents Methylation of Foxp3 and Loss of Regulatory T Cell Identity at Sites of Inflammation. *Cell Rep.* **2019**, *26*, 1854–1868.e5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Franckaert, D.; Dooley, J.; Roos, E.; Floess, S.; Huehn, J.; Luche, H.; Fehling, H.J.; Liston, A.; Linterman, M.A.; Schlenner, S.M. Promiscuous Foxp3-cre activity reveals a differential requirement for CD28 in Foxp3(+) and Foxp3(-) T cells. *Immunol. Cell Biol.* **2015**, *93*, 417–423. [[CrossRef](#)]
125. Bittner-Eddy, P.D.; Fischer, L.A.; Costalonga, M. Cre-loxP Reporter Mouse Reveals Stochastic Activity of the Foxp3 Promoter. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 2228. [[CrossRef](#)]
126. Wu, D.; Huang, Q.; Orban, P.C.; Levings, M.K. Ectopic germline recombination activity of the widely used Foxp3-YFP-Cre mouse: A case report. *Immunology* **2020**, *159*, 231–241. [[CrossRef](#)]
127. Rubtsov, Y.P.; Niec, R.E.; Josefowicz, S.; Li, L.; Darce, J.; Mathis, D.; Benoist, C.; Rudensky, A.Y. Stability of the regulatory T cell lineage in vivo. *Science* **2010**, *329*, 1667–1671. [[CrossRef](#)]
128. Cortez, J.T.; Montauti, E.; Shifrut, E.; Gatchalian, J.; Zhang, Y.; Shaked, O.; Xu, Y.; Roth, T.L.; Simeonov, D.R.; Zhang, Y.; et al. CRISPR screen in regulatory T cells reveals modulators of Foxp3. *Nature* **2020**, *582*, 416–420. [[CrossRef](#)]
129. Loo, C.S.; Gatchalian, J.; Liang, Y.; Leblanc, M.; Xie, M.; Ho, J.; Venkatraghavan, B.; Hargreaves, D.C.; Zheng, Y. A Genome-wide CRISPR Screen Reveals a Role for the Non-canonical Nucleosome-Remodeling BAF Complex in Foxp3 Expression and Regulatory T Cell Function. *Immunity* **2020**, *53*, 143–157.e8. [[CrossRef](#)]
130. Schumann, K.; Raju, S.S.; Lauber, M.; Kolb, S.; Shifrut, E.; Cortez, J.T.; Skartsis, N.; Nguyen, V.Q.; Woo, J.M.; Roth, T.L.; et al. Functional CRISPR dissection of gene networks controlling human regulatory T cell identity. *Nat. Immunol.* **2020**, *21*, 1456–1466. [[CrossRef](#)]
131. Postow, M.A.; Sidlow, R.; Hellmann, M.D. Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Blockade. *New Engl. J. Med.* **2018**, *378*, 158–168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Fraser, J.H.; Rincon, M.; McCoy, K.D.; Le Gros, G. CTLA4 ligation attenuates AP-1, NFAT and NF-kappaB activity in activated T cells. *Eur. J. Immunol.* **1999**, *29*, 838–844. [[CrossRef](#)]
133. Walker, L.S.K. PD-1 and CTLA4: Two checkpoints, one pathway? *Sci. Immunol.* **2017**, *2*, eaan3864. [[CrossRef](#)]
134. Fenwick, C.; Loredó-Varela, J.L.; Joo, V.; Pellaton, C.; Farina, A.; Rajah, N.; Esteves-Leuenberger, L.; Decaillon, T.; Suffiotti, M.; Noto, A.; et al. Tumor suppression of novel anti-PD-1 antibodies mediated through CD28 costimulatory pathway. *J. Exp. Med.* **2019**, *216*, 1525–1541. [[CrossRef](#)]

135. 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](#)]
136. Huynh, A.; DuPage, M.; Priyadharshini, B.; Sage, P.T.; Quiros, J.; Borges, C.M.; Townamchai, N.; Gerriets, V.A.; Rathmell, J.C.; Sharpe, A.H.; et al. Control of PI(3) kinase in Treg cells maintains homeostasis and lineage stability. *Nat. Immunol.* **2015**, *16*, 188–196. [[CrossRef](#)]
137. Wang, Y.; Zhang, G.; Jin, J.; Degan, S.; Tameze, Y.; Zhang, J.Y. MALT1 promotes melanoma progression through JNK/c-Jun signaling. *Oncogenesis* **2017**, *6*, e365. [[CrossRef](#)]
138. Nagel, D.; Spranger, S.; Vincendeau, M.; Grau, M.; Raffegerst, S.; Kloo, B.; Hlahla, D.; Neuenschwander, M.; Peter von Kries, J.; Hadian, K.; et al. Pharmacologic inhibition of MALT1 protease by phenothiazines as a therapeutic approach for the treatment of aggressive ABC-DLBCL. *Cancer Cell* **2012**, *22*, 825–837. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
139. Schon, M.; Wienrich, B.G.; Kneitz, S.; Sennefelder, H.; Amschler, K.; Vohringer, V.; Weber, O.; Stiewe, T.; Ziegelbauer, K.; Schon, M.P. KINK-1, a novel small-molecule inhibitor of IKKbeta, and the susceptibility of melanoma cells to antitumoral treatment. *J. Natl. Cancer Inst.* **2008**, *100*, 862–875. [[CrossRef](#)]
140. Edward, M.; MacKie, R.M. Pentoxifylline enhances lung colonization and alters cell adhesion and glycosaminoglycan synthesis by metastatic B16 melanoma cells. *Int. J. Cancer* **1991**, *49*, 711–716. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
141. Ratheesh, A.; Ingle, A.; Gude, R.P. Pentoxifylline modulates cell surface integrin expression and integrin mediated adhesion of B16F10 cells to extracellular matrix components. *Cancer Biol. Ther.* **2007**, *6*, 1743–1752. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
142. Oh, H.; Ghosh, S. NF-kappaB: Roles and regulation in different CD4(+) T-cell subsets. *Immunol. Rev.* **2013**, *252*, 41–51. [[CrossRef](#)]
143. Barnes, S.E.; Wang, Y.; Chen, L.; Molinero, L.L.; Gajewski, T.F.; Evaristo, C.; Alegre, M.L. T cell-NF-kappaB activation is required for tumor control in vivo. *J. Immunother. Cancer* **2015**, *3*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. 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 IKKbeta in T Cells Drives Tumor Rejection. *J. Immunol.* **2016**, *196*, 2933–2938. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Sievers, E.L.; Senter, P.D. Antibody-drug conjugates in cancer therapy. *Annu. Rev. Med.* **2013**, *64*, 15–29. [[CrossRef](#)]
146. Knochelmann, H.M.; Dwyer, C.J.; Bailey, S.R.; Amaya, S.M.; Elston, D.M.; Mazza-McCrann, J.M.; Paulos, C.M. When worlds collide: Th17 and Treg cells in cancer and autoimmunity. *Cell. Mol. Immunol.* **2018**, *15*, 458–469. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

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



© 2020 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 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Annexe 2 : A T cell-intrinsic function for NF- $\kappa$ B RelB in experimental autoimmune encephalomyelitis**



OPEN

## A T cell-intrinsic function for NF- $\kappa$ B RelB in experimental autoimmune encephalomyelitis

Guilhem Lalle<sup>1</sup>, Raphaëlle Lautreite<sup>1</sup>, Allison Voisin<sup>1</sup>, Julie Twardowski<sup>1</sup>, Pierre Stéphan<sup>1</sup>, Marlène Perrin-Niquet<sup>1</sup>, Ramdane Igalouzene<sup>1</sup>, Saidi M. Soudja<sup>1</sup>, Julien C. Marie<sup>1</sup>, Marc Vocanson<sup>2</sup>, Nilushi De Silva<sup>3</sup>, Ulf Klein<sup>4</sup>, Sankar Ghosh<sup>5</sup> & Yenkel Grinberg-Bleyer<sup>1</sup>✉

NF- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) is a family of transcription factors with pleiotropic functions in immune responses. The alternative NF- $\kappa$ B pathway that leads to the activation of RelB and NF- $\kappa$ B2, was previously associated with the activation and function of T cells, though the exact contribution of these NF- $\kappa$ 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<sup>+</sup> 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- $\kappa$ B family is composed of 5 subunits that all share a Rel homology domain and associate as homo- or heterodimers to modulate gene expression<sup>1</sup>. 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  $\kappa$ B kinase (IKK) $\alpha/\beta/\gamma$  cascade. This, in turn, leads to the degradation of I $\kappa$ B $\alpha$  and the nuclear translocation of NF- $\kappa$ B1 (p105/p50, encoded by *Nfkb1*), RelA (or p65, encoded by *Rela*) and c-Rel (encoded by *Rel*) proteins<sup>2</sup>. The alternative NF- $\kappa$ 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 $\alpha$ , driving the processing of NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ B and adding another layer of complexity to its signaling<sup>3–5</sup>. In addition, RelB was suggested to repress gene transcription at given loci by recruiting chromatin modifiers, independently of other NF- $\kappa$ B subunits; thereby promoting immune tolerance under certain circumstances<sup>6–8</sup>. A number of studies have reported the multiple functions of NF- $\kappa$ B in inflammation and immunity. In particular, it was suggested to exert critical roles in the development and homeostasis of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes<sup>9,10</sup>.

CD4<sup>+</sup> T cells are pivotal actors of adaptive immune responses. Following stimulation, naïve conventional CD4<sup>+</sup> 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 pathogens<sup>11</sup>. 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 $\gamma$ ) 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<sup>12,13</sup>.

<sup>1</sup>Cancer Research Center of Lyon, UMR INSERM 1052, CNRS 5286, Université Claude Bernard Lyon 1, Labex DEVweCAN, Centre Léon Bérard, Lyon, France. <sup>2</sup>CIRI-Centre International de Recherche en Infectiologie, INSERM, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, Ecole Normale Supérieure de Lyon, CNRS UMR 5308, Lyon, France. <sup>3</sup>Immunity and Cancer Department, Institut Curie, Paris-Sciences-Et-Lettres Research University, INSERM U932, Paris, France. <sup>4</sup>Division of Haematology and Immunology, Leeds Institute of Medical Research at St. James's, University of Leeds, Leeds, UK. <sup>5</sup>Department 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<sup>14,15</sup>. At odds with these pro-inflammatory cells, another subset of CD4<sup>+</sup> 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 autoimmunity<sup>16</sup>. Hence, depletion of Treg cells exacerbates EAE severity<sup>17</sup>.

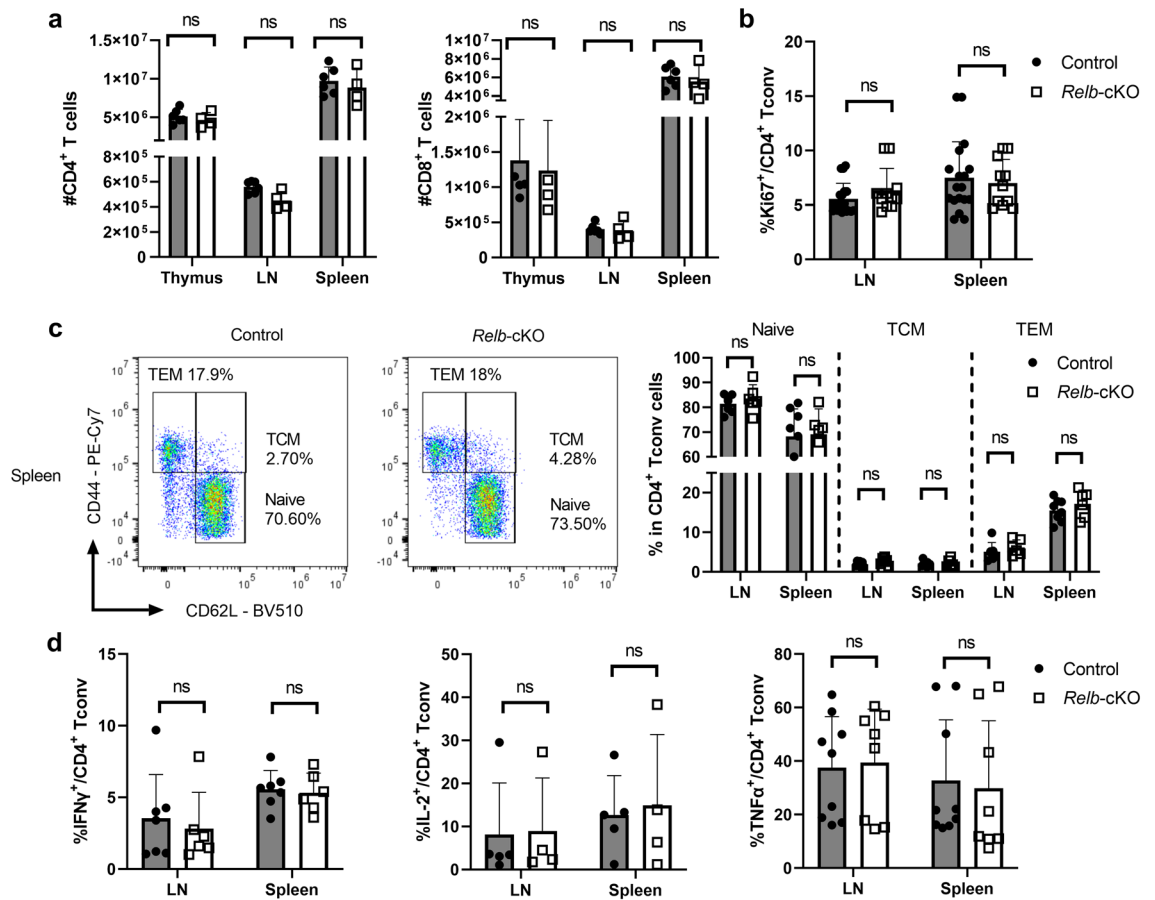
Canonical NF- $\kappa$ B subunits are largely implicated in T-cell activation, survival, as well as in the polarization toward the TH17 lineage and the development of autoimmunity<sup>18–20</sup>. Moreover, these proteins are critical for Treg cell development and function<sup>21,22</sup>. In contrast, 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<sup>23–26</sup>. 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<sup>27,28</sup>. 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<sup>29,30</sup>. In line with this, *Relb*<sup>-/-</sup> T cells, though they may have an impaired TH1 differentiation ability in vitro<sup>31</sup>, induced severe EAE upon transfer to immunodeficient recipients, associated with enhanced TH17 cytokines in the inflamed CNS<sup>8</sup>. However, conflicting results were also reported<sup>30</sup>, 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*<sup>26</sup>. 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<sup>+</sup> T cells in the inflamed CNS. Our results reveal a discrete contribution of RelB in T-cell biology and highlight this NF- $\kappa$ 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<sup>cre</sup> strain, allowing the conditional ablation of *RelB* in T-cells (*Relb*-cKO)<sup>32</sup>. *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<sup>cre</sup> control mice (Fig. 1a and data not shown). The proportion and quantity of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> 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- $\kappa$ B signaling has been associated with the expression of inflammatory cytokines by T cells, we measured IFN- $\gamma$ , IL-2 and TNF $\alpha$  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 $\gamma$ <sup>+</sup>, IL-2<sup>+</sup>, TNF $\alpha$ <sup>+</sup> and GM-CSF<sup>+</sup> 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 $\gamma$ /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- $\kappa$ 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<sup>+</sup> and ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> TH17 cells when cultured with anti-CD3, feeders, TGF- $\beta$  and IL-6 was not impacted by the absence of *Relb* (Fig. 3d). Similar results were obtained following the addition of IL-1 $\beta$  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.

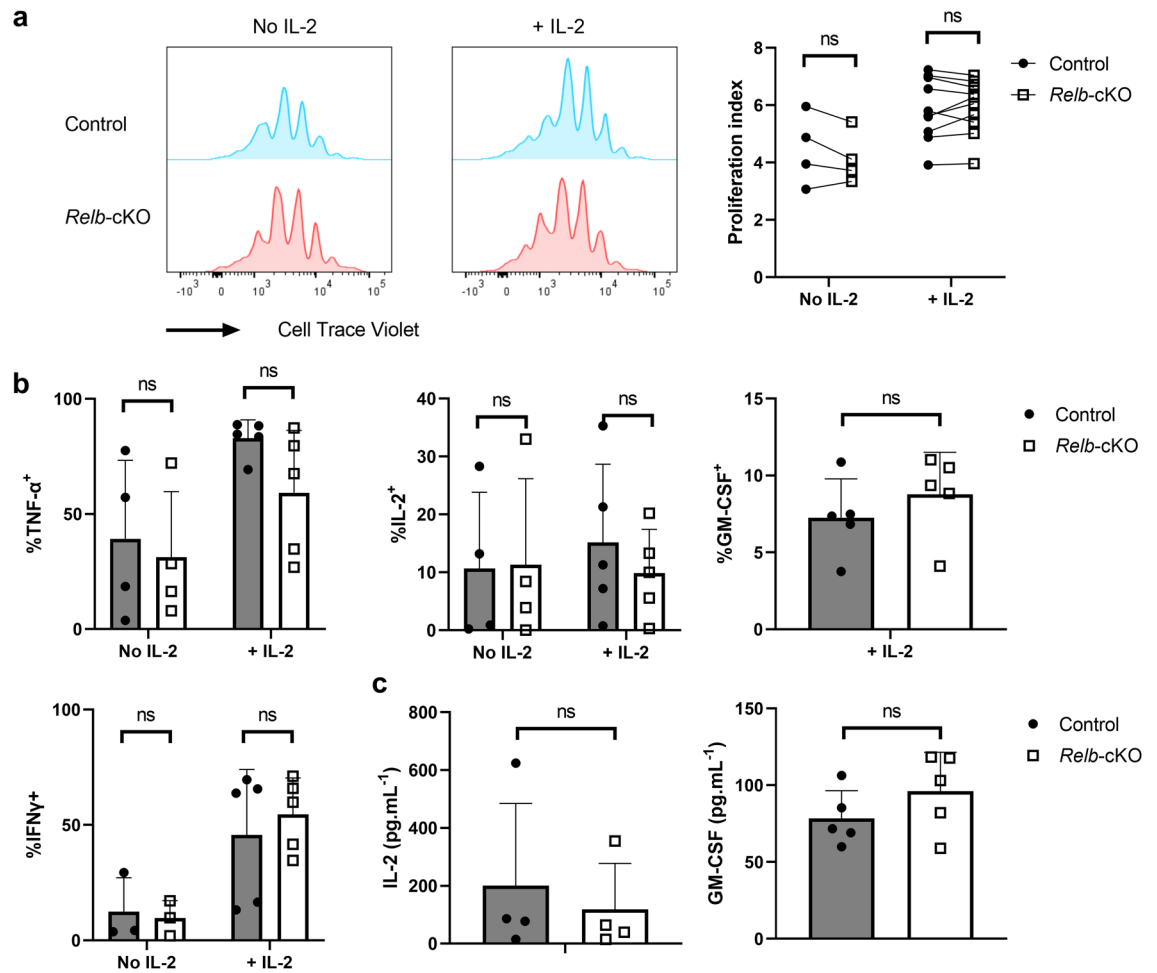
**RelB expression is not required for T-cell mediated colitis.** To test the TH polarization capacity and pathogenic function of *Relb*-deficient T cells in vivo, we next used a T-cell-transfer model of colitis, in which naïve Tconv cells are transferred to immunodeficient *Rag2*<sup>-/-</sup> recipients. 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<sup>+</sup> 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 $\gamma$  or TNF $\alpha$  was also stable (Fig. 4f). Interestingly, whereas the overall proportion of ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> T cells was not impacted by the absence of RelB, we detected a significant increase in the percentage of IL-17A<sup>+</sup> 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<sup>cre</sup> (control) and CD4<sup>cre</sup>*Relb*<sup>F/F</sup> (*Relb*-cKO) mice were analyzed by flow cytometry. (a) Quantification of live TCR- $\beta$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells. (b) Proportion of Ki67<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> (Tconv) cells. (c) Representative dot plots in the spleen and cumulative data of CD44 and CD62L expression in Tconv cells. T<sub>CM</sub>: T central memory; T<sub>EM</sub>: 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 MOG<sub>33-55</sub> 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<sup>+</sup> T cells in draining lymph nodes (dLN), accumulation of CD45<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> cells was not modified (Fig. 5d,e). Moreover, the proportion of Foxp3<sup>+</sup> 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<sup>hi</sup>) and proliferating (Ki67<sup>+</sup>) 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 $\alpha$  as well as TH1 (T-bet and IFN $\gamma$ ) and classical TH17 (ROR $\gamma$ t and IL-17A) markers was unaffected in *Relb*-cKO animals (Fig. 5g,h). IFN $\gamma$  and IL-17A production by CD8<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> Tconv cells, which directly impact the severity of the disease, were dramatically decreased in the brain and spinal cord of mutant



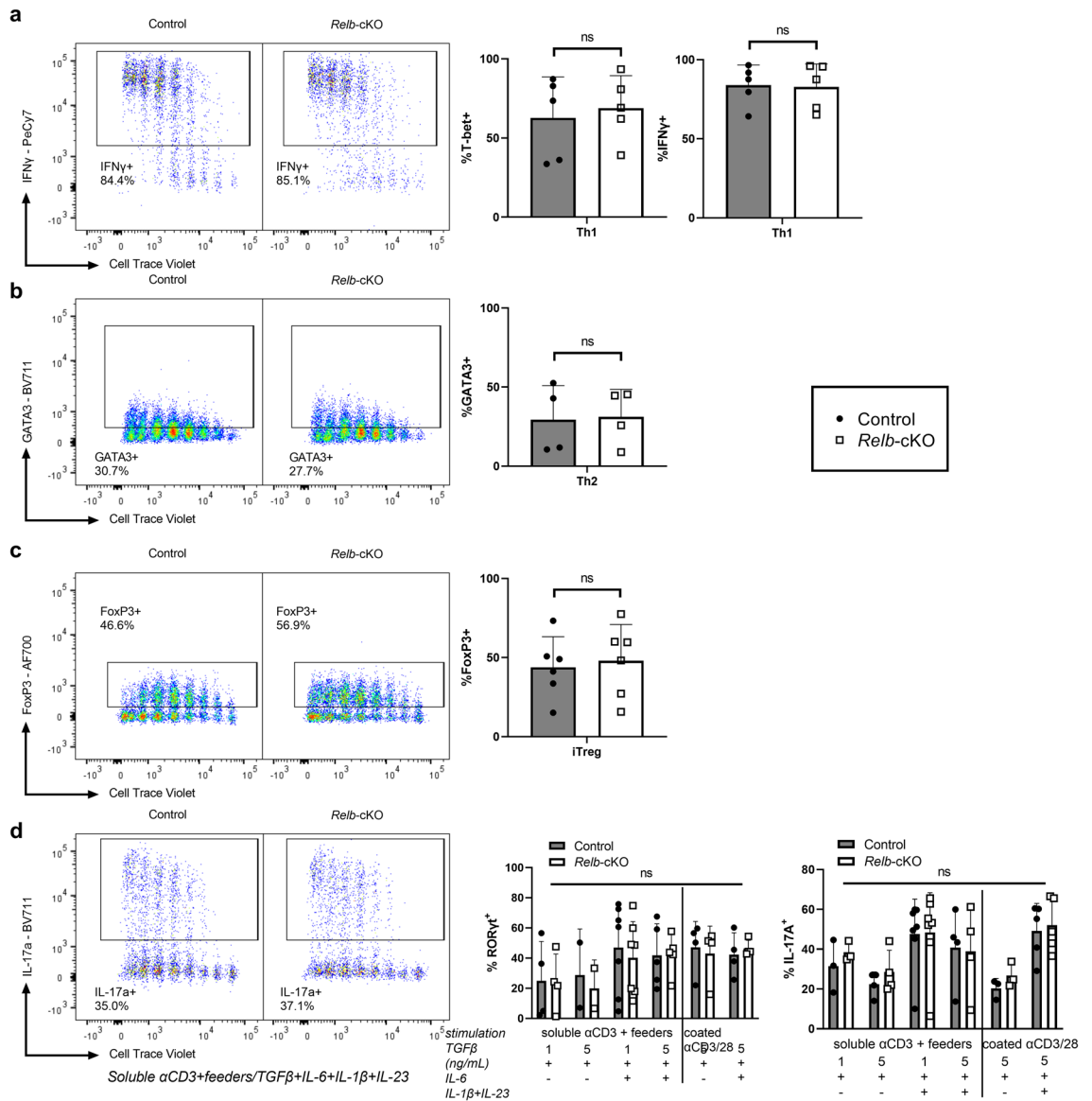
**Figure 2.** Normal proliferative capacity and cytokine expression of *Relb*-deficient T cells in vitro. CTV-labeled naïve Tconv cells were stimulated with soluble anti-CD3 + mitomycin C-treated feeders. **(a,b)** After 4 days of culture, cells were restimulated with PMA/ionomycin and analyzed by flow 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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<sup>33,34</sup>. 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- $\kappa$ B subunits to TH polarization. For instance, total T cells from *Relb* $^{-/-}$  animals, but not *Nfkb2* $^{-/-}$  or *Map3k14* $^{-/-}$  mice, displayed defects in TH1 polarization<sup>28,30,31</sup>, suggesting an alternative pathway-independent function of RelB. Because we detected intact IFN $\gamma$  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<sup>28,30</sup>. At odds with these reports, it

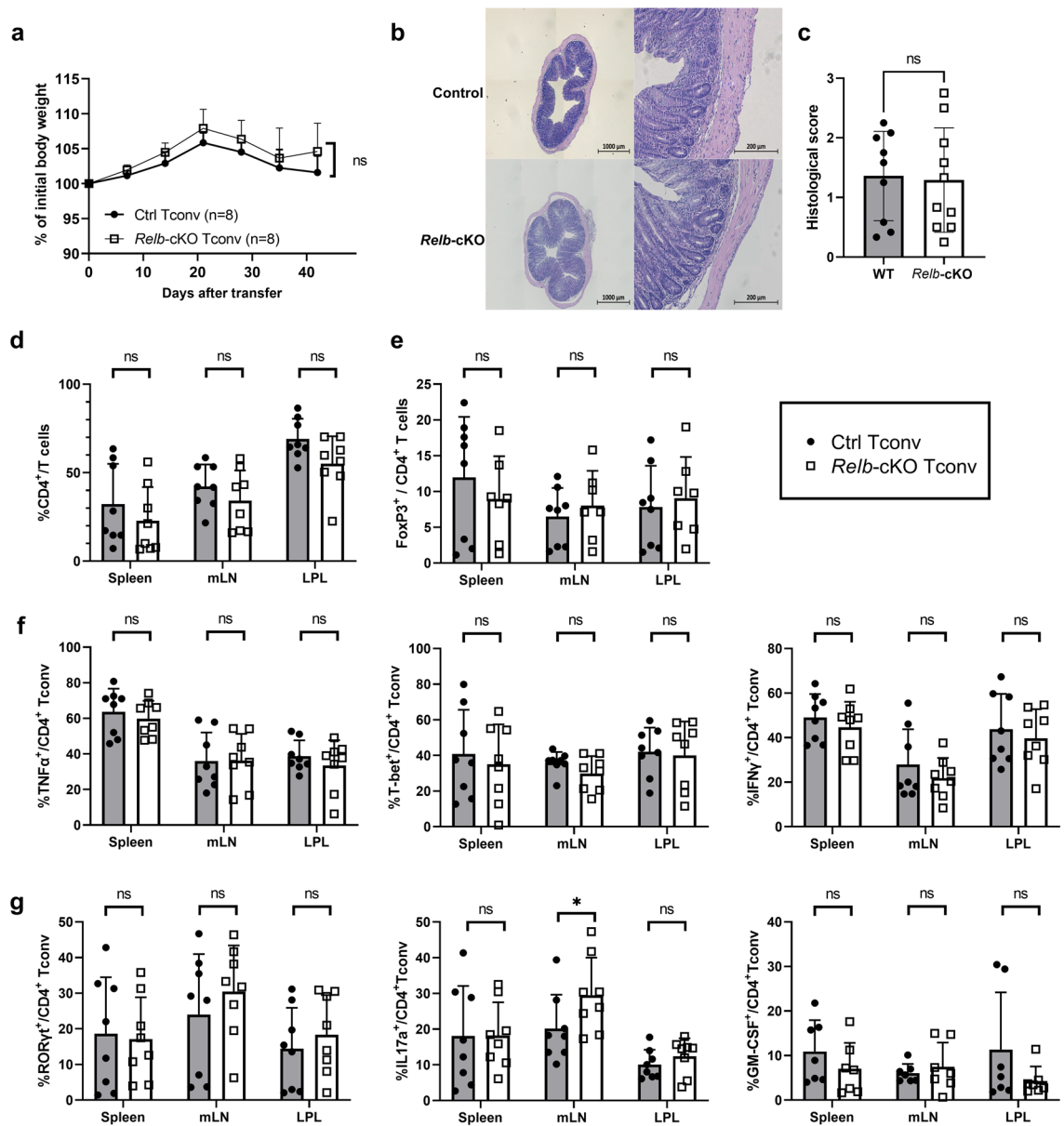


**Figure 3.** Thelper polarization profile is maintained in the absence of RelB. CTV-labeled naive Tconv cells were stimulated in TH1, TH2, iTreg-polarizing conditions (a–c) or with different TH17 stimulation protocols (d) as described in the *Methods* section. After 4 days of culture, cells were restimulated with PMA/ionomycin and analyzed by flow cytometry. (a) Percentage of T-bet<sup>+</sup> and IFN $\gamma$ <sup>+</sup> cells in the TH1 condition, (b) GATA3<sup>+</sup> cells in the TH2 condition, and (c) Foxp3<sup>+</sup> cells in the iTreg condition. (d) Percentage of ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> and IL-17a<sup>+</sup> 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* expression<sup>8</sup>. Conversely, we showed here that T-cell-restricted ablation of *Relb* did not modify the ability of Tconv to polarize into ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> IL-17A<sup>+</sup> cells in vitro. This confirmed the conclusions of a previous report using *Lck<sup>cre</sup>Relb<sup>flxed</sup>* animals<sup>34</sup>. 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<sup>35,36</sup>. In addition, *Chuk<sup>-/-</sup>* T cells (deficient for IKK $\alpha$ ), that have reduced activation of the canonical and alternative pathways, fail to induce IBD when transferred to *Rag1<sup>-/-</sup>* recipients<sup>37</sup>. 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- $\kappa$ B pathway in intestinal autoimmunity.

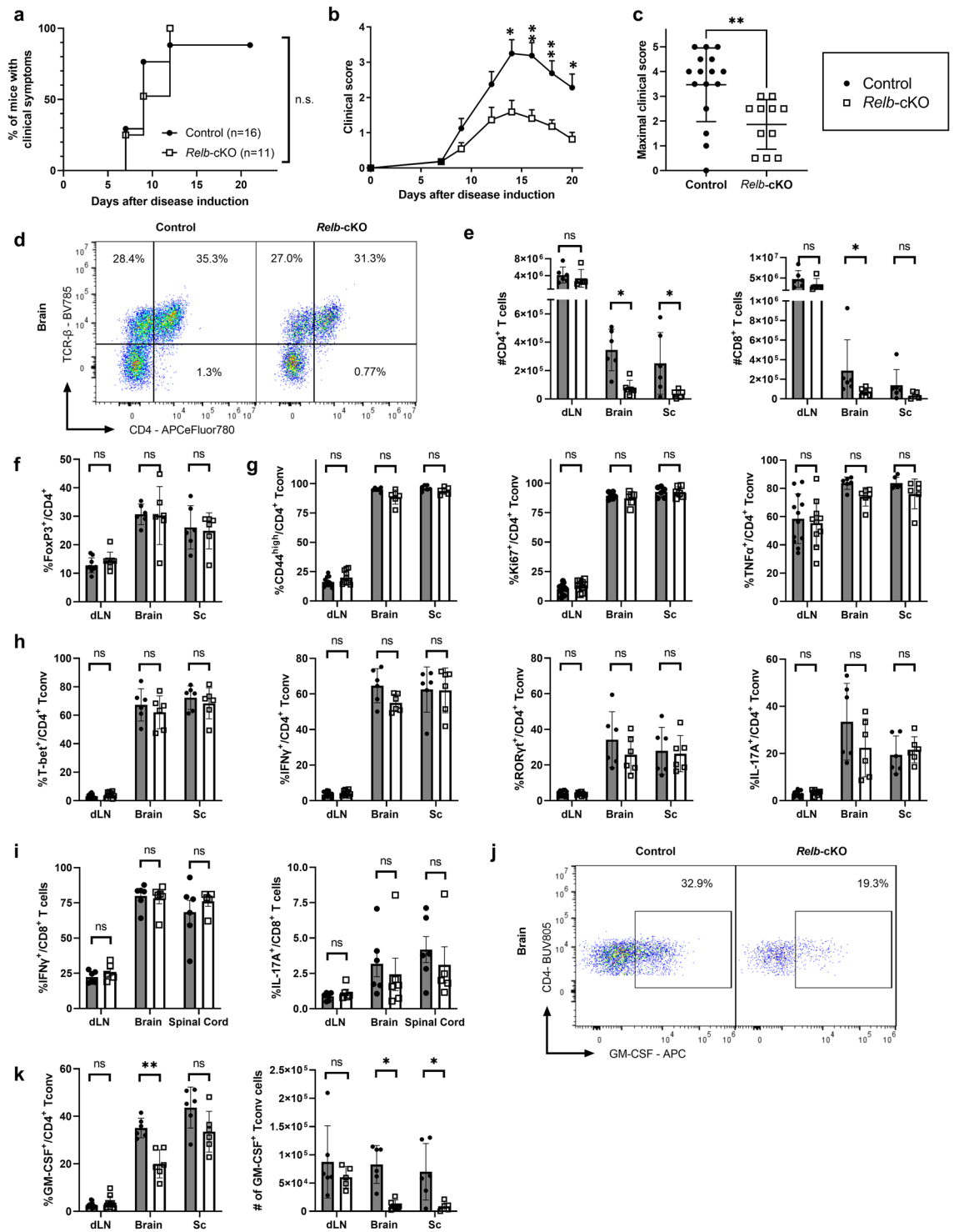
Interestingly, T-cell-intrinsic *RelB* expression was critical to induce severe symptoms of EAE. This observation is in stark contrast with previous reports showing either no effect<sup>30</sup> or a deleterious impact<sup>8</sup> of *Relb* ablation on the function of T cells during EAE. However, these two studies used cell transfer experiments to address the



**Figure 4.** The colitogenic potential of Tconv cells is maintained in the absence of RelB. Naive Tconv cells were transferred to sex-matched *Rag2*<sup>-/-</sup> 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  $\pm$  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<sup>38,39</sup>.

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<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> 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 of 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 animals<sup>28</sup>. In addition to this reduced accumulation, we detected a specific impairment of GM-CSF<sup>+</sup> Tconv cells in the brain of mutant mice, whereas the proportion of ROR $\gamma$ <sup>+</sup> and IL-17a<sup>+</sup> cells was not significantly altered. Importantly, the Tc1/Tc17 profile of CD8<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells (live CD45<sup>+</sup>TCRβ<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> / CD8<sup>+</sup>) in the indicated tissues. (f) Percentage of Treg cells among CD4<sup>+</sup> T cells. (g,h) Percentage of Tconv cells (live CD45<sup>+</sup>TCRβ<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>) expressing the indicated markers. (i) Percentage of IFNγ and IL-17A expressing CD8<sup>+</sup> T cells (live CD45<sup>+</sup>TCRβ<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) (j) Representative GM-CSF staining in brain Tconv cells. (k) Cumulative proportion and number of live CD45<sup>+</sup>TCRβ<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>GM-CSF<sup>+</sup> 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<sup>40,41</sup>. 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 cells<sup>30</sup>. However, divergent conclusions were reached using human cell lines<sup>42</sup>. 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 mechanisms<sup>43</sup>: (i) activation of the alternative NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ B family. While c-Rel seems critical to kickstart the expression of ROR $\gamma$ t and the TH17 lineage<sup>19</sup>, 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- $\kappa$ B subunit as a putative therapeutic target in EAE and MS.

## Methods

**Mice.** *Relb*-Floxed mice were previously described<sup>44</sup>. CD4<sup>cre</sup> (Tg(CD4-cre)<sup>1Cw1</sup>) on a C57Bl/6 J background were purchased from the Jackson Laboratory. *Rag2*<sup>-/-</sup> and C57Bl/6 CD45.1 (*Ptprca<sup>d</sup> Pepcb/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 harvested in ice cold NaCl. Sterile single cell suspensions were obtained by mechanical dilaceration through a 70  $\mu$ m cell strainer. Red blood cells were lysed in RBC lysis buffer (NH<sub>4</sub>Cl 0.154 M + NaHCO<sub>3</sub> 0.14 M + EDTA 0.1 mM) for 10 min at room temperature. Naïve CD4<sup>+</sup> T cells were negatively isolated using the Naïve CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit (Miltenyi), with a purity >90%. Cells were resuspended at 20  $\times$  10<sup>6</sup> cells/mL in ice cold PBS 1X and 2  $\times$  10<sup>6</sup> cells were injected intravenously in the retro orbital sinus of recipient *Rag2*<sup>-/-</sup> mice under isoflurane-induced anesthesia. Mice were weighed once a week.

**EAE.** Mice were injected subcutaneously in each flank with 50  $\mu$ g of MOG<sub>35-55</sub> peptide (Smart Biosciences SB023) emulsified in 100  $\mu$ L of complete Freund adjuvant (Sigma-Aldrich) supplemented with 243  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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 (Ca<sup>2+</sup>- and Mg<sup>2+</sup>-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  $\mu$ g/mL DNaseI 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  $\mu$ 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<sup>+</sup> T cells were negatively isolated using the Naïve CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit (Miltenyi). Cells were labeled using the CellTrace Violet Cell Proliferation

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

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

After 4 days of culture, supernatants were collected and stored at  $-80^\circ\text{C}$  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  $37^\circ\text{C}$  with 50 ng/mL PMA (Sigma), 1  $\mu$ g/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  $\mu$ L surface marker antibody mix for 20 min at  $4^\circ\text{C}$  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  $4^\circ\text{C}$  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](http://www.flowjo.com)).

**Histology.** Colons were fixed in 4% formaldehyde solution (Sigma) for 1 day and stored at  $4^\circ\text{C}$  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.2008.01.020> (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-RORγ-T transcriptional axis. *J. Exp. Med.* **208**, 2321–2333. <https://doi.org/10.1084/jem.20110462> (2011).
20. Chen, G. *et al.* The NF-κB 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-κB transcription factor-dependent, lineage specific transcriptional program promotes regulatory T cell identity and function. *Immunity* **47**, 450–465.e455. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.08.010> (2017).
22. Grinberg-Bleyer, Y. *et al.* NF-κB c-Rel Is crucial for the regulatory T cell immune checkpoint in cancer. *Cell* **170**, 1096–1108.e1013. <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-κB-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-κB 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-κB 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-κB 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 γδ 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 NFκappaB 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-κB 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](http://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

## Bibliographie

1. Laidlaw, B. J., Craft, J. E. & Kaech, S. M. The multifaceted role of CD4<sup>+</sup> T cells in CD8<sup>+</sup> T cell memory. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 102–111 (2016).
2. Crotty, S. T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. *Immunity* **50**, 1132–1148 (2019).
3. Sharma, A. & Rudra, D. Emerging Functions of Regulatory T Cells in Tissue Homeostasis. *Front. Immunol.* **9**, 883 (2018).
4. Oh, D. Y. & Fong, L. Cytotoxic CD4<sup>+</sup> T cells in cancer: Expanding the immune effector toolbox. *Immunity* **54**, 2701–2711 (2021).
5. Agak, G. W. *et al.* Extracellular traps released by antimicrobial TH17 cells contribute to host defense. *J. Clin. Invest.* **131**, e141594 (2021).
6. Zlotoff, D. A. & Bhandoola, A. Hematopoietic progenitor migration to the adult thymus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1217**, 122–138 (2011).
7. Janeway, C. A., Murphy, K. P., Weaver, C. T. & Masson, P. L. *Immunobiologie de Janeway*. (De Boeck supérieur, 2018).
8. Maeda, Y. *et al.* S1P lyase in thymic perivascular spaces promotes egress of mature thymocytes via up-regulation of S1P receptor 1. *Int. Immunol.* **26**, 245–255 (2014).
9. Allende, M. L., Dreier, J. L., Mandala, S. & Proia, R. L. Expression of the Sphingosine 1-Phosphate Receptor, S1P1, on T-cells Controls Thymic Emigration. *J. Biol. Chem.* **279**, 15396–15401 (2004).
10. Boyton, R. & Altmann, D. Is selection for TCR affinity a factor in cytokine polarization? *Trends Immunol.* **23**, 526–529 (2002).
11. Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. & Coffman, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* **136**, 2348–2357 (1986).
12. Zhu, J. & Paul, W. E. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* **112**, 1557–1569 (2008).
13. Szabo, S. J., Sullivan, B. M., Peng, S. L. & Glimcher, L. H. Molecular Mechanisms Regulating Th1 Immune Responses. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 713–758 (2003).
14. Zhou, L., Chong, M. M. W. & Littman, D. R. Plasticity of CD4<sup>+</sup> T Cell Lineage Differentiation. *Immunity* **30**, 646–655 (2009).
15. Szabo, S. J. *et al.* A Novel Transcription Factor, T-bet, Directs Th1 Lineage Commitment. *Cell* **100**, 655–669 (2000).
16. Yang, Y., Ochando, J. C., Bromberg, J. S. & Ding, Y. Identification of a distant T-bet enhancer responsive to IL-12/Stat4 and IFN $\gamma$ /Stat1 signals. *Blood* **110**, 2494–2500 (2007).
17. Afkarian, M. *et al.* T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naïve CD4<sup>+</sup> T cells. *Nat. Immunol.* **3**, 549–557 (2002).
18. Zhu, J. *et al.* The Transcription Factor T-bet Is Induced by Multiple Pathways and Prevents an Endogenous Th2 Cell Program during Th1 Cell Responses. *Immunity* **37**, 660–673 (2012).
19. Lighvani, A. A. *et al.* T-bet is rapidly induced by interferon- $\gamma$  in lymphoid and myeloid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 15137–15142 (2001).
20. Bos, R. & Sherman, L. A. CD4<sup>+</sup> T-Cell Help in the Tumor Milieu Is Required for Recruitment and Cytolytic Function of CD8<sup>+</sup> T Lymphocytes. *Cancer Res.* **70**, 8368–8377 (2010).
21. Boehm, U., Klamp, T., Groot, M. & Howard, J. C. CELLULAR RESPONSES TO INTERFERON- $\gamma$ . *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 749–795 (1997).
22. Biswas, S. K. & Mantovani, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat. Immunol.* **11**, 889–896 (2010).

23. Jorgovanovic, D., Song, M., Wang, L. & Zhang, Y. Roles of IFN- $\gamma$  in tumor progression and regression: a review. *Biomark. Res.* **8**, 49 (2020).
24. Braumüller, H. *et al.* T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature* **494**, 361–365 (2013).
25. Leonard, J. P., Waldburger, K. E. & Goldman, S. J. Regulation of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Interleukin-12. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **795**, 216–226 (1996).
26. Dungan, L. S., McGuinness, N. C., Boon, L., Lynch, M. A. & Mills, K. H. G. Innate IFN- $\gamma$  promotes development of experimental autoimmune encephalomyelitis: A role for NK cells and M1 macrophages. *Eur. J. Immunol.* **44**, 2903–2917 (2014).
27. Cua, D. J. *et al.* Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* **421**, 744–748 (2003).
28. Park, H. *et al.* A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat. Immunol.* **6**, 1133–1141 (2005).
29. Harrington, L. E. *et al.* Interleukin 17–producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.* **6**, 1123–1132 (2005).
30. Zheng, W. & Flavell, R. A. The Transcription Factor GATA-3 Is Necessary and Sufficient for Th2 Cytokine Gene Expression in CD4 T Cells. *Cell* **89**, 587–596 (1997).
31. Micossé, C. *et al.* Human “T<sub>H</sub> 9” cells are a subpopulation of PPAR- $\gamma$ <sup>+</sup> T<sub>H</sub> 2 cells. *Sci. Immunol.* **4**, eaat5943 (2019).
32. Chang, H.-C. *et al.* The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. *Nat. Immunol.* **11**, 527–534 (2010).
33. Schmitt, E. *et al.* IL-9 production of naive CD4<sup>+</sup> T cells depends on IL-2, is synergistically enhanced by a combination of TGF- $\beta$  and IL-4, and is inhibited by IFN- $\gamma$ . *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **153**, 3989–3996 (1994).
34. Purwar, R. *et al.* Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin-9–producing T cells. *Nat. Med.* **18**, 1248–1253 (2012).
35. Lu, Y. *et al.* Th9 Cells Represent a Unique Subset of CD4<sup>+</sup> T Cells Endowed with the Ability to Eradicate Advanced Tumors. *Cancer Cell* **33**, 1048–1060.e7 (2018).
36. Ivanov, I. I. *et al.* The Orphan Nuclear Receptor ROR $\gamma$ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17<sup>+</sup> T Helper Cells. *Cell* **126**, 1121–1133 (2006).
37. Brüstle, A. *et al.* The development of inflammatory TH-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nat. Immunol.* **8**, 958–966 (2007).
38. Yang, X. O. *et al.* T Helper 17 Lineage Differentiation Is Programmed by Orphan Nuclear Receptors ROR $\alpha$  and ROR $\gamma$ . *Immunity* **28**, 29–39 (2008).
39. Bettelli, E. *et al.* Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* **441**, 235–238 (2006).
40. Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M. & Stockinger, B. TGF $\beta$  in the Context of an Inflammatory Cytokine Milieu Supports De Novo Differentiation of IL-17-Producing T Cells. *Immunity* **24**, 179–189 (2006).
41. Mangan, P. R. *et al.* Transforming growth factor- $\beta$  induces development of the TH17 lineage. *Nature* **441**, 231–234 (2006).
42. Brucklacher-Waldert, V. *et al.* Cellular Stress in the Context of an Inflammatory Environment Supports TGF- $\beta$ -Independent T Helper-17 Differentiation. *Cell Rep.* **19**, 2357–2370 (2017).
43. Nurieva, R. *et al.* Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* **448**, 480–483 (2007).
44. Liang, S. C. *et al.* Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J. Exp. Med.* **203**, 2271–2279 (2006).
45. Enamorado, M. *et al.* Immunity to the microbiota promotes sensory neuron regeneration. *Cell* **186**, 607–620.e17 (2023).
46. *Th 17 cells: role in inflammation and autoimmune disease.* (Birkhäuser, 2009).
47. Zepp, J. A. *et al.* IL-17A–Induced PLET1 Expression Contributes to Tissue Repair and Colon Tumorigenesis. *J. Immunol.* **199**, 3849–3857 (2017).

48. Grivennikov, S. I. *et al.* Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature* **491**, 254–258 (2012).
49. McAllister, F. *et al.* Oncogenic Kras Activates a Hematopoietic-to-Epithelial IL-17 Signaling Axis in Preinvasive Pancreatic Neoplasia. *Cancer Cell* **25**, 621–637 (2014).
50. Chang, S. H. *et al.* T helper 17 cells play a critical pathogenic role in lung cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 5664–5669 (2014).
51. Wu, L. *et al.* A novel IL-17 signaling pathway controlling keratinocyte proliferation and tumorigenesis via the TRAF4–ERK5 axis. *J. Exp. Med.* **212**, 1571–1587 (2015).
52. Lee, E.-J. *et al.* Inhibition of IL-17A Suppresses Enhanced-Tumor Growth in Low Dose Pre-Irradiated Tumor Beds. *PLoS ONE* **9**, e106423 (2014).
53. Lotti, F. *et al.* Chemotherapy activates cancer-associated fibroblasts to maintain colorectal cancer-initiating cells by IL-17A. *J. Exp. Med.* **210**, 2851–2872 (2013).
54. Wang, K. *et al.* Interleukin-17 Receptor A Signaling in Transformed Enterocytes Promotes Early Colorectal Tumorigenesis. *Immunity* **41**, 1052–1063 (2014).
55. Zhao, J., Chen, X., Herjan, T. & Li, X. The role of interleukin-17 in tumor development and progression. *J. Exp. Med.* **217**, e20190297 (2020).
56. Váraljai, R. *et al.* Interleukin 17 signaling supports clinical benefit of dual CTLA-4 and PD-1 checkpoint inhibition in melanoma. *Nat. Cancer* (2023) doi:10.1038/s43018-023-00610-2.
57. Vitiello, G. A. & Miller, G. Targeting the interleukin-17 immune axis for cancer immunotherapy. *J. Exp. Med.* **217**, e20190456 (2020).
58. Thomas, W. D. & Hersey, P. TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) Induces Apoptosis in Fas Ligand-Resistant Melanoma Cells and Mediates CD4 T Cell Killing of Target Cells. *J. Immunol.* **161**, 2195–2200 (1998).
59. Zajac, A. J., Quinn, D. G., Cohen, P. L. & Frelinger, J. A. Fas-dependent CD4<sup>+</sup> cytotoxic T-cell-mediated pathogenesis during virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 14730–14735 (1996).
60. Igney, F. H. & Krammer, P. H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 277–288 (2002).
61. Nagata, S. & Golstein, P. The Fas Death Factor. *Science* **267**, 1449–1456 (1995).
62. Della-Torre, E. *et al.* A CD8α<sup>-</sup> Subset of CD4<sup>+</sup>SLAMF7<sup>+</sup> Cytotoxic T Cells Is Expanded in Patients With IgG4-Related Disease and Decreases Following Glucocorticoid Treatment. *Arthritis Rheumatol.* **70**, 1133–1143 (2018).
63. Yang, D. *et al.* NKG2D<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T Cells Kill Regulatory T Cells in a NKG2D-NKG2D Ligand-Dependent Manner in Systemic Lupus Erythematosus. *Sci. Rep.* **7**, 1288 (2017).
64. Maehara, T. *et al.* Cytotoxic CD4<sup>+</sup> T lymphocytes may induce endothelial cell apoptosis in systemic sclerosis. *J. Clin. Invest.* **130**, 2451–2464 (2020).
65. Takeuchi, A. & Saito, T. CD4 CTL, a Cytotoxic Subset of CD4<sup>+</sup> T Cells, Their Differentiation and Function. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
66. Takeuchi, A. *et al.* CRTAM determines the CD4<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocyte lineage. *J. Exp. Med.* **213**, 123–138 (2016).
67. Quezada, S. A. *et al.* Tumor-reactive CD4<sup>+</sup> T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *J. Exp. Med.* **207**, 637–650 (2010).
68. Johnston, R. J. *et al.* Bcl6 and Blimp-1 Are Reciprocal and Antagonistic Regulators of T Follicular Helper Cell Differentiation. *Science* **325**, 1006–1010 (2009).
69. Nurieva, R. I. *et al.* Bcl6 Mediates the Development of T Follicular Helper Cells. *Science* **325**, 1001–1005 (2009).
70. Reinhardt, R. L., Liang, H.-E. & Locksley, R. M. Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. *Nat. Immunol.* **10**, 385–393 (2009).
71. Cui, C., Craft, J. & Joshi, N. S. T follicular helper cells in cancer, tertiary lymphoid structures, and beyond. *Semin. Immunol.* **69**, 101797 (2023).
72. Gu-Trantien, C. *et al.* CD4<sup>+</sup> follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J. Clin. Invest.* **123**, 2873–2892 (2013).
73. Overacre-Delgoffe, A. E. *et al.* Microbiota-specific T follicular helper cells drive

- tertiary lymphoid structures and anti-tumor immunity against colorectal cancer. *Immunity* **54**, 2812-2824.e4 (2021).
74. Duhon, R. *et al.* PD-1 and ICOS coexpression identifies tumor-reactive CD4<sup>+</sup> T cells in human solid tumors. *J. Clin. Invest.* **132**, e156821 (2022).
  75. Veatch, J. R. *et al.* Neoantigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells in human melanoma have diverse differentiation states and correlate with CD8<sup>+</sup> T cell, macrophage, and B cell function. *Cancer Cell* **40**, 393-409.e9 (2022).
  76. Meylan, M. *et al.* Tertiary lymphoid structures generate and propagate anti-tumor antibody-producing plasma cells in renal cell cancer. *Immunity* **55**, 527-541.e5 (2022).
  77. Niogret, J. *et al.* Follicular helper-T cells restore CD8<sup>+</sup>-dependent antitumor immunity and anti-PD-L1/PD-1 efficacy. *J. Immunother. Cancer* **9**, e002157 (2021).
  78. Schafflick, D. *et al.* Integrated single cell analysis of blood and cerebrospinal fluid leukocytes in multiple sclerosis. *Nat. Commun.* **11**, 247 (2020).
  79. Quinn, J. & Axtell, R. Emerging Role of Follicular T Helper Cells in Multiple Sclerosis and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 3233 (2018).
  80. Gershon, R. K. A Disquisition on Suppressor T Cells. *Immunol. Rev.* **26**, 170–185 (1975).
  81. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. & Toda, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* **155**, 1151–1164 (1995).
  82. Fontenot, J. D., Gavin, M. A. & Rudensky, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **4**, 330–336 (2003).
  83. Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor *Foxp3*. *Science* **299**, 1057–1061 (2003).
  84. Bennett, C. L. *et al.* The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat. Genet.* **27**, 20–21 (2001).
  85. Santamaria, J. C., Borelli, A. & Irla, M. Regulatory T Cell Heterogeneity in the Thymus: Impact on Their Functional Activities. *Front. Immunol.* **12**, 643153 (2021).
  86. Gottschalk, R. A., Corse, E. & Allison, J. P. Expression of Helios in Peripherally Induced Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cells. *J. Immunol.* **188**, 976–980 (2012).
  87. Weiss, J. M. *et al.* Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3<sup>+</sup> T reg cells. *J. Exp. Med.* **209**, 1723–1742 (2012).
  88. Ayyoub, M., Raffin, C. & Valmori, D. Comment on “Helios<sup>+</sup> and Helios<sup>-</sup> Cells Coexist within the Natural FOXP3<sup>+</sup> T Regulatory Cell Subset in Humans”. *J. Immunol.* **190**, 4439–4440 (2013).
  89. Lal, G. *et al.* Epigenetic Regulation of Foxp3 Expression in Regulatory T Cells by DNA Methylation. *J. Immunol.* **182**, 259–273 (2009).
  90. Kressler, C. *et al.* Targeted De-Methylation of the FOXP3-TSDR Is Sufficient to Induce Physiological FOXP3 Expression but Not a Functional Treg Phenotype. *Front. Immunol.* **11**, 609891 (2020).
  91. Vignali, D. A. A., Collison, L. W. & Workman, C. J. How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 523–532 (2008).
  92. Tang, Q. & Bluestone, J. A. The Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat. Immunol.* **9**, 239–244 (2008).
  93. Gondek, D. C., Lu, L.-F., Quezada, S. A., Sakaguchi, S. & Noelle, R. J. Cutting Edge: Contact-Mediated Suppression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Regulatory Cells Involves a Granzyme B-Dependent, Perforin-Independent Mechanism. *J. Immunol.* **174**, 1783–1786 (2005).
  94. Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J. & Lenardo, M. J. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4<sup>+</sup> T cells. *Nat. Immunol.* **8**, 1353–1362 (2007).
  95. Deaglio, S. *et al.* Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.* **204**, 1257–1265 (2007).
  96. Bopp, T. *et al.* Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T

- cell-mediated suppression. *J. Exp. Med.* **204**, 1303–1310 (2007).
97. Wing, K. *et al.* CTLA-4 Control over Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cell Function. *Science* **322**, 271–275 (2008).
  98. Huang, C.-T. *et al.* Role of LAG-3 in Regulatory T Cells. *Immunity* **21**, 503–513 (2004).
  99. Workman, C. J. & Vignali, D. A. A. Negative Regulation of T Cell Homeostasis by Lymphocyte Activation Gene-3 (CD223). *J. Immunol.* **174**, 688–695 (2005).
  100. Liang, B. *et al.* Regulatory T Cells Inhibit Dendritic Cells by Lymphocyte Activation Gene-3 Engagement of MHC Class II. *J. Immunol.* **180**, 5916–5926 (2008).
  101. Workman, C. J., Szymczak-Workman, A. L., Collison, L. W., Pillai, M. R. & Vignali, D. A. A. The development and function of regulatory T cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 2603–2622 (2009).
  102. Cao, X. *et al.* Granzyme B and Perforin Are Important for Regulatory T Cell-Mediated Suppression of Tumor Clearance. *Immunity* **27**, 635–646 (2007).
  103. Zhao, D.-M., Thornton, A. M., DiPaolo, R. J. & Shevach, E. M. Activated CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood* **107**, 3925–3932 (2006).
  104. Plitas, G. & Rudensky, A. Y. Regulatory T Cells in Cancer. *Annu. Rev. Cancer Biol.* **4**, 459–477 (2020).
  105. Nagamine, K. *et al.* Positional cloning of the APECED gene. *Nat. Genet.* **17**, 393–398 (1997).
  106. Meyer, S. *et al.* AIRE-Deficient Patients Harbor Unique High-Affinity Disease-Ameliorating Autoantibodies. *Cell* **166**, 582–595 (2016).
  107. Filippi, M. *et al.* Multiple sclerosis. *Nat. Rev. Dis. Primer* **4**, 43 (2018).
  108. HAS. Médicaments utilisés dans les formes très actives de sclérose en plaques récurrente. *Haute Autorité de Santé* [https://www.has-sante.fr/jcms/p\\_3067012/fr/medicaments-utilises-dans-les-formes-tres-actives-de-sclerose-en-plaques-recurrente](https://www.has-sante.fr/jcms/p_3067012/fr/medicaments-utilises-dans-les-formes-tres-actives-de-sclerose-en-plaques-recurrente).
  109. Govender, U., Corre, B., Bourdache, Y., Pellegrini, S. & Michel, F. Type I interferon-enhanced IL-10 expression in human CD4 T cells is regulated by STAT3, STAT2, and BATF transcription factors. *J. Leukoc. Biol.* **101**, 1181–1190 (2017).
  110. AVONEX 30 µg/0,5 ml sol inj. *VIDAL* <https://www.vidal.fr/medicaments/avonex-30-mcg-0-5-ml-sol-inj-1780.html>.
  111. Moreau, thibault & X. Ayrignac, O. Casez, P. Clavelou, N. Collongues, F. Durand-Dubief, G. Edan, P. Gallien, A. Kerbrat, D.A Laplaud, E. Leray, R. Marignier, T. Moreau, J. Pelletier, A. Ruet, B. Stankoff, E. Thouvenot, H. Zéphir. *Le Point sur la SEP*.
  112. COPAXONE 20 mg/ml sol inj en seringue préremplie. *VIDAL* <https://www.vidal.fr/medicaments/copaxone-20-mg-ml-sol-inj-en-seringue-preremplie-189757.html>.
  113. EMA. *RCP ocrevus*. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/ocrevus-epar-product-information\\_fr.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/ocrevus-epar-product-information_fr.pdf).
  114. GILENYA 0,25 mg gél. *VIDAL* <https://www.vidal.fr/medicaments/gilenya-0-25-mg-gel-197464.html>.
  115. TYSABRI 150 mg sol inj en seringue préremplie. *VIDAL* <https://www.vidal.fr/medicaments/tysabri-150-mg-sol-inj-en-seringue-preremplie-224436.html>.
  116. AUBAGIO 14 mg cp pellic. *VIDAL* <https://www.vidal.fr/medicaments/aubagio-14-mg-cp-pellic-133438.html>.
  117. EMA. RCP Tecfidera.
  118. Lanz, T. V. *et al.* Clonally expanded B cells in multiple sclerosis bind EBV EBNA1 and GlialCAM. *Nature* **603**, 321–327 (2022).
  119. Bjornevik, K. *et al.* Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science* **375**, 296–301 (2022).
  120. Kebir, H. *et al.* Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat. Med.* **13**, 1173–1175 (2007).
  121. Ronchi, F. *et al.* Experimental priming of encephalitogenic Th1/Th17 cells requires

- pertussis toxin-driven IL-1 $\beta$  production by myeloid cells. *Nat. Commun.* **7**, 11541 (2016).
122. Kroenke, M. A., Carlson, T. J., Andjelkovic, A. V. & Segal, B. M. IL-12- and IL-23-modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition. *J. Exp. Med.* **205**, 1535–1541 (2008).
123. Vogel, D. Y. S. *et al.* GM-CSF promotes migration of human monocytes across the blood brain barrier: Molecular immunology. *Eur. J. Immunol.* **45**, 1808–1819 (2015).
124. Ferber, I. A. *et al.* Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **156**, 5–7 (1996).
125. Matuszewicz, D. *et al.* Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult. Scler. J.* **5**, 101–104 (1999).
126. Tzartos, J. S. *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.* **172**, 146–155 (2008).
127. Capone, A. *et al.* Distinct Expression of Inflammatory Features in T Helper 17 Cells from Multiple Sclerosis Patients. *Cells* **8**, 533 (2019).
128. Samoilova, E. B., Horton, J. L., Hilliard, B., Liu, T.-S. T. & Chen, Y. IL-6-Deficient Mice Are Resistant to Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: Roles of IL-6 in the Activation and Differentiation of Autoreactive T Cells. *J. Immunol.* **161**, 6480–6486 (1998).
129. Haak, S. *et al.* IL-17A and IL-17F do not contribute vitally to autoimmune neuroinflammation in mice. *J. Clin. Invest.* JCI35997 (2008) doi:10.1172/JCI35997.
130. El-Behi, M. *et al.* The encephalitogenicity of TH17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nat. Immunol.* **12**, 568–575 (2011).
131. Codarri, L. *et al.* ROR $\gamma$ t 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 (2011).
132. 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-1 $\beta$ . *Immunity* **50**, 1289-1304.e6 (2019).
133. Bartholomäus, I. *et al.* Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions. *Nature* **462**, 94–98 (2009).
134. Hiltensperger, M. *et al.* Skin and gut imprinted helper T cell subsets exhibit distinct functional phenotypes in central nervous system autoimmunity. *Nat. Immunol.* **22**, 880–892 (2021).
135. Berer, K. *et al.* Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature* **479**, 538–541 (2011).
136. Ochoa-Repáraz, J. *et al.* Role of Gut Commensal Microflora in the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Immunol.* **183**, 6041–6050 (2009).
137. Correale, J., Hohlfeld, R. & Baranzini, S. E. The role of the gut microbiota in multiple sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* **18**, 544–558 (2022).
138. Viglietta, V., Baecher-Allan, C., Weiner, H. L. & Hafler, D. A. Loss of Functional Suppression by CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Patients with Multiple Sclerosis. *J. Exp. Med.* **199**, 971–979 (2004).
139. Huan, J. *et al.* Decreased FOXP3 levels in multiple sclerosis patients. *J. Neurosci. Res.* **81**, 45–52 (2005).
140. Dominguez-Villar, M., Baecher-Allan, C. M. & Hafler, D. A. Identification of T helper type 1-like, Foxp3+ regulatory T cells in human autoimmune disease. *Nat. Med.* **17**, 673–675 (2011).
141. Kitz, A. *et al.* AKT isoforms modulate Th1-like Treg generation and function in human autoimmune disease. *EMBO Rep.* **17**, 1169–1183 (2016).
142. Fletcher, J. M. *et al.* CD39+Foxp3+ Regulatory T Cells Suppress Pathogenic Th17 Cells and Are Impaired in Multiple Sclerosis. *J. Immunol.* **183**, 7602–7610 (2009).
143. 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 (2005).



144. Kohm, A. P., Carpentier, P. A., Anger, H. A. & Miller, S. D. Cutting Edge: CD4+CD25+ Regulatory T Cells Suppress Antigen-Specific Autoreactive Immune Responses and Central Nervous System Inflammation During Active Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Immunol.* **169**, 4712–4716 (2002).
145. Dunn, G. P., Old, L. J. & Schreiber, R. D. The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 329–360 (2004).
146. Burnet, F. M. IMMUNOLOGICAL ASPECTS OF MALIGNANT DISEASE. *The Lancet* **289**, 1171–1174 (1967).
147. Engels, E. A. Epidemiologic perspectives on immunosuppressed populations and the immunosurveillance and immunocontainment of cancer. *Am. J. Transplant.* **19**, 3223–3232 (2019).
148. Dighe, A. S., Richards, E., Old, L. J. & Schreiber, R. D. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN $\gamma$  receptors. *Immunity* **1**, 447–456 (1994).
149. Shankaran, V. *et al.* IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* **410**, 1107–1111 (2001).
150. Marincola, F. M., Jaffee, E. M., Hicklin, D. J. & Ferrone, S. Escape of Human Solid Tumors from T-Cell Recognition: Molecular Mechanisms and Functional Significance. in *Advances in Immunology* vol. 74 181–273 (Elsevier, 1999).
151. Sharpe, A. H. & Pauken, K. E. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 153–167 (2018).
152. McCarthy, E. F. The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *Iowa Orthop. J.* **26**, 154–158 (2006).
153. Interféron alfa : substance active à effet thérapeutique. VIDAL <https://www.vidal.fr/medicaments/substances/interferon-alfa-10737.html>.
154. Aldesleukine : substance active à effet thérapeutique. VIDAL <https://www.vidal.fr/medicaments/substances/aldesleukine-219.html>.
155. EMA. RCP Provence. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/provence-epar-product-information\\_fr.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/provence-epar-product-information_fr.pdf).
156. Liu, J. *et al.* Cancer vaccines as promising immuno-therapeutics: platforms and current progress. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* **15**, 28 (2022).
157. KEYTRUDA (pembrolizumab). Haute Autorité de Santé [https://www.has-sante.fr/jcms/pprd\\_2982864/fr/keytruda-pembrolizumab](https://www.has-sante.fr/jcms/pprd_2982864/fr/keytruda-pembrolizumab).
158. Valero, C. *et al.* Response Rates to Anti-PD-1 Immunotherapy in Microsatellite-Stable Solid Tumors With 10 or More Mutations per Megabase. *JAMA Oncol.* **7**, 739 (2021).
159. Cercek, A. *et al.* PD-1 Blockade in Mismatch Repair-Deficient, Locally Advanced Rectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* **386**, 2363–2376 (2022).
160. Hodi, F. S. *et al.* Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **363**, 711–723 (2010).
161. Tawbi, H. A. *et al.* Relatlimab and Nivolumab versus Nivolumab in Untreated Advanced Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **386**, 24–34 (2022).
162. Zitvogel, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F. & Kroemer, G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 59–73 (2008).
163. Keene, J.-A. & Forman, J. Helper activity is required for the in vivo generation of cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **155**, 768–782 (1982).
164. Bennett, S. R. M., Carbone, F. R., Karamalis, F., Miller, J. F. A. P. & Heath, W. R. Induction of a CD8+ Cytotoxic T Lymphocyte Response by Cross-priming Requires Cognate CD4+ T Cell Help. *J. Exp. Med.* **186**, 65–70 (1997).
165. Antony, P. A. *et al.* CD8+ T Cell Immunity Against a Tumor/Self-Antigen Is Augmented by CD4+ T Helper Cells and Hindered by Naturally Occurring T Regulatory Cells. *J. Immunol.* **174**, 2591–2601 (2005).
166. Linnemann, C. *et al.* High-throughput epitope discovery reveals frequent recognition of neo-antigens by CD4+ T cells in human melanoma. *Nat. Med.* **21**, 81–85 (2015).
167. Ott, P. A. *et al.* An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma. *Nature* **547**, 217–221 (2017).

168. Sahin, U. *et al.* Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. *Nature* **547**, 222–226 (2017).
169. Cohen, A. D. *et al.* B cell maturation antigen-specific CAR T cells are clinically active in multiple myeloma. *J. Clin. Invest.* **129**, 2210–2221 (2019).
170. Schoenberger, S. P., Toes, R. E. M., Van Der Voort, E. I. H., Offringa, R. & Melief, C. J. M. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40–CD40L interactions. *Nature* **393**, 480–483 (1998).
171. Castellino, F. *et al.* Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8<sup>+</sup> T cells to sites of CD4<sup>+</sup> T cell–dendritic cell interaction. *Nature* **440**, 890–895 (2006).
172. Boutilier, A. J. & Elswa, S. F. Macrophage Polarization States in the Tumor Microenvironment. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 6995 (2021).
173. Muraille, E., Leo, O. & Moser, M. Th1/Th2 Paradigm Extended: Macrophage Polarization as an Unappreciated Pathogen-Driven Escape Mechanism? *Front. Immunol.* **5**, (2014).
174. Chen, D. *et al.* CTLA-4 blockade induces CD4<sup>+</sup> T cell IFN $\gamma$ -driven microglial phagocytosis and anti-tumor function in glioblastoma. *Immunity* S107476132300328X (2023) doi:10.1016/j.immuni.2023.07.015.
175. Jabrane-Ferrat, N. *et al.* Effect of gamma interferon on HLA class-I and -II transcription and protein expression in human breast adenocarcinoma cell lines. *Int. J. Cancer* **45**, 1169–1176 (1990).
176. Guo, X. *et al.* Global characterization of T cells in non-small-cell lung cancer by single-cell sequencing. *Nat. Med.* **24**, 978–985 (2018).
177. Zhang, L. *et al.* Lineage tracking reveals dynamic relationships of T cells in colorectal cancer. *Nature* **564**, 268–272 (2018).
178. Zhang, Q. *et al.* Landscape and Dynamics of Single Immune Cells in Hepatocellular Carcinoma. *Cell* **179**, 829-845.e20 (2019).
179. Oh, D. Y. *et al.* Intratumoral CD4<sup>+</sup> T Cells Mediate Anti-tumor Cytotoxicity in Human Bladder Cancer. *Cell* **181**, 1612-1625.e13 (2020).
180. Zhou, Y. *et al.* Single-cell RNA landscape of intratumoral heterogeneity and immunosuppressive microenvironment in advanced osteosarcoma. *Nat. Commun.* **11**, 6322 (2020).
181. Cachot, A. *et al.* Tumor-specific cytolytic CD4 T cells mediate immunity against human cancer. *Sci. Adv.* **7**, eabe3348 (2021).
182. Macian, F. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 472–484 (2005).
183. Angel, P. & Karin, M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* **1072**, 129–157 (1991).
184. Karin, M., Liu, Z. & Zandi, E. AP-1 function and regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 240–246 (1997).
185. Yamazaki, S. *et al.* The AP-1 transcription factor JunB is required for Th17 cell differentiation. *Sci. Rep.* **7**, 17402 (2017).
186. Schraml, B. U. *et al.* The AP-1 transcription factor Batf controls TH17 differentiation. *Nature* **460**, 405–409 (2009).
187. Sen, R. & Baltimore, D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* **46**, 705–716 (1986).
188. Oeckinghaus, A., Hayden, M. S. & Ghosh, S. Crosstalk in NF- $\kappa$ B signaling pathways. *Nat. Immunol.* **12**, 695–708 (2011).
189. Israel, A. The IKK Complex, a Central Regulator of NF- $\kappa$ B Activation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a000158–a000158 (2010).
190. Vallabhapurapu, S. & Karin, M. Regulation and Function of NF- $\kappa$ B Transcription Factors in the Immune System. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 693–733 (2009).
191. Moorthy, A. K. *et al.* The 20S proteasome processes NF- $\kappa$ B1 p105 into p50 in a translation-independent manner. *EMBO J.* **25**, 1945–1956 (2006).
192. Liang, C., Zhang, M. & Sun, S.-C.  $\beta$ -TrCP binding and processing of NF- $\kappa$ B2/p100 involve its phosphorylation at serines 866 and 870. *Cell. Signal.* **18**, 1309–1317 (2006).

193. Ghosh, P., Tan, T. H., Rice, N. R., Sica, A. & Young, H. A. The interleukin 2 CD28-responsive complex contains at least three members of the NF kappa B family: c-Rel, p50, and p65. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 1696–1700 (1993).
194. Sommer, K. *et al.* Phosphorylation of the CARMA1 Linker Controls NF- $\kappa$ B Activation. *Immunity* **23**, 561–574 (2005).
195. Matsumoto, R. *et al.* Phosphorylation of CARMA1 Plays a Critical Role in T Cell Receptor-Mediated NF- $\kappa$ B Activation. *Immunity* **23**, 575–585 (2005).
196. Lubrano di Ricco, M. *et al.* Tumor necrosis factor receptor family costimulation increases regulatory T-cell activation and function via NF- $\kappa$ B. *Eur. J. Immunol.* **50**, 972–985 (2020).
197. Tada, K. *et al.* Critical Roles of TRAF2 and TRAF5 in Tumor Necrosis Factor-induced NF- $\kappa$ B Activation and Protection from Cell Death. *J. Biol. Chem.* **276**, 36530–36534 (2001).
198. Baud, V. & Collares, D. Post-Translational Modifications of RelB NF- $\kappa$ B Subunit and Associated Functions. *Cells* **5**, 22 (2016).
199. Wang, J. *et al.* TNFR2 ligation in human T regulatory cells enhances IL2-induced cell proliferation through the non-canonical NF- $\kappa$ B pathway. *Sci. Rep.* **8**, 12079 (2018).
200. Ghosh, G. & Wang, V. Y.-F. Origin of the Functional Distinctiveness of NF- $\kappa$ B/p52. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**, 764164 (2021).
201. Jacque, E., Tchenio, T., Piton, G., Romeo, P.-H. & Baud, V. RelA repression of RelB activity induces selective gene activation downstream of TNF receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 14635–14640 (2005).
202. Derudder, E. *et al.* RelB/p50 Dimers Are Differentially Regulated by Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Lymphotoxin- $\beta$  Receptor Activation. *J. Biol. Chem.* **278**, 23278–23284 (2003).
203. Bren, G. D. *et al.* Transcription of the RelB gene is regulated by NF- $\kappa$ B. *Oncogene* **20**, 7722–7733 (2001).
204. Yilmaz, Z. B. RelB is required for Peyer’s patch development: differential regulation of p52-RelB by lymphotoxin and TNF. *EMBO J.* **22**, 121–130 (2003).
205. Voisin, A. & Grinberg-Bleyer, Y. The many-sided contributions of NF- $\kappa$ B to T-cell biology in health and disease. in *International Review of Cell and Molecular Biology* vol. 361 245–300 (Elsevier, 2021).
206. Merico, D., Sharfe, N., Hu, P., Herbrick, J.-A. & Roifman, C. M. RelB deficiency causes combined immunodeficiency. *LymphoSign J.* **2**, 147–155 (2015).
207. Sharfe, N. *et al.* The effects of RelB deficiency on lymphocyte development and function. *J. Autoimmun.* **65**, 90–100 (2015).
208. Hailfinger, S. *et al.* Malt1-dependent RelB cleavage promotes canonical NF- $\kappa$ B activation in lymphocytes and lymphoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 14596–14601 (2011).
209. Zhao, M. *et al.* NF- $\kappa$ B subunits direct kinetically distinct transcriptional cascades in antigen receptor-activated B cells. *Nat. Immunol.* (2023) doi:10.1038/s41590-023-01561-7.
210. De Jesús, T. J. & Ramakrishnan, P. NF- $\kappa$ B c-Rel Dictates the Inflammatory Threshold by Acting as a Transcriptional Repressor. *iScience* **23**, 100876 (2020).
211. Saccani, S., Pantano, S. & Natoli, G. Modulation of NF- $\kappa$ B Activity by Exchange of Dimers. *Mol. Cell* **11**, 1563–1574 (2003).
212. Marienfeld, R. *et al.* RelB Forms Transcriptionally Inactive Complexes with RelA/p65. *J. Biol. Chem.* **278**, 19852–19860 (2003).
213. Bhatt, D. & Ghosh, S. Regulation of the NF- $\kappa$ B-Mediated Transcription of Inflammatory Genes. *Front. Immunol.* **5**, (2014).
214. Ghosh, S., May, M. J. & Kopp, E. B. NF- $\kappa$ B AND REL PROTEINS: Evolutionarily Conserved Mediators of Immune Responses. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 225–260 (1998).
215. Guan, H., Hou, S. & Ricciardi, R. P. DNA Binding of Repressor Nuclear Factor- $\kappa$ B p50/p50 Depends on Phosphorylation of Ser337 by the Protein Kinase A Catalytic Subunit. *J. Biol. Chem.* **280**, 9957–9962 (2005).
216. Elsharkawy, A. M. *et al.* The NF- $\kappa$ B p50:p50:HDAC-1 repressor complex orchestrates transcriptional inhibition of multiple pro-inflammatory genes. *J. Hepatol.* **53**, 519–527 (2010).

217. Rocha, S., Martin, A. M., Meek, D. W. & Perkins, N. D. p53 Represses Cyclin D1 Transcription through Down Regulation of Bcl-3 and Inducing Increased Association of the p52 NF- $\kappa$ B Subunit with Histone Deacetylase 1. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 4713–4727 (2003).
218. Sakurai, H., Chiba, H., Miyoshi, H., Sugita, T. & Toriumi, W. I $\kappa$ B Kinases Phosphorylate NF- $\kappa$ B p65 Subunit on Serine 536 in the Transactivation Domain. *J. Biol. Chem.* **274**, 30353–30356 (1999).
219. Zhong, H., Voll, R. E. & 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* **1**, 661–671 (1998).
220. Harris, J. *et al.* Nuclear Accumulation of cRel following C-Terminal phosphorylation by TBK1/IKK $\epsilon$ . *J. Immunol.* **177**, 2527–2535 (2006).
221. Lévy, R. *et al.* Inherited human c-Rel deficiency disrupts myeloid and lymphoid immunity to multiple infectious agents. *J. Clin. Invest.* **131**, e150143 (2021).
222. Beaussant-Cohen, S. *et al.* Combined immunodeficiency in a patient with c-Rel deficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.* **144**, 606-608.e4 (2019).
223. Starczynowski, D. T. *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* **26**, 2685–2694 (2007).
224. Badran, Y. R. *et al.* Human *RELA* haploinsufficiency results in autosomal-dominant chronic mucocutaneous ulceration. *J. Exp. Med.* **214**, 1937–1947 (2017).
225. Comrie, W. A. *et al.* *RELA* haploinsufficiency in CD4 lymphoproliferative disease with autoimmune cytopenias. *J. Allergy Clin. Immunol.* **141**, 1507-1510.e8 (2018).
226. Barnabei, L. *et al.* Heterozygous *RELA* mutations cause early-onset systemic lupus erythematosus by hijacking the NF- $\kappa$ B pathway towards transcriptional activation of type-I Interferon genes. <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.04.27.046102> (2020) doi:10.1101/2020.04.27.046102.
227. Adeeb, F. *et al.* A Novel *RELA* Truncating Mutation in a Familial Behçet's Disease-like Mucocutaneous Ulcerative Condition. *Arthritis Rheumatol.* **73**, 490–497 (2021).
228. An, J. W. *et al.* Case report: Novel variants in *RELA* associated with familial Behçet's-like disease. *Front. Immunol.* **14**, 1127085 (2023).
229. Moriya, K. *et al.* Human *RELA* dominant-negative mutations underlie type I interferonopathy with autoinflammation and autoimmunity. *J. Exp. Med.* **220**, e20212276 (2023).
230. Boztug, H. *et al.* NF- $\kappa$ B1 Haploinsufficiency Causing Immunodeficiency and EBV-Driven Lymphoproliferation. *J. Clin. Immunol.* **36**, 533–540 (2016).
231. Lorenzini, T. *et al.* Characterization of the clinical and immunologic phenotype and management of 157 individuals with 56 distinct heterozygous NFKB1 mutations. *J. Allergy Clin. Immunol.* **146**, 901–911 (2020).
232. Dieli-Crimi, R. *et al.* Th1-skewed profile and excessive production of proinflammatory cytokines in a NFKB1-deficient patient with CVID and severe gastrointestinal manifestations. *Clin. Immunol.* **195**, 49–58 (2018).
233. Kaustio, M. *et al.* Damaging heterozygous mutations in NFKB1 lead to diverse immunologic phenotypes. *J. Allergy Clin. Immunol.* **140**, 782–796 (2017).
234. Tuijnburg, P. *et al.* Loss-of-function nuclear factor  $\kappa$ B subunit 1 (NFKB1) variants are the most common monogenic cause of common variable immunodeficiency in Europeans. *J. Allergy Clin. Immunol.* **142**, 1285–1296 (2018).
235. Fliegau, M. *et al.* Detrimental NFKB1 missense variants affecting the Rel-homology domain of p105/p50. *Front. Immunol.* **13**, 965326 (2022).
236. Staels, F. *et al.* Common variable immunodeficiency in two kindreds with heterogeneous phenotypes caused by novel heterozygous NFKB1 mutations. *Front. Immunol.* **13**, 973543 (2022).
237. Mandola, A. B. *et al.* Combined immunodeficiency caused by a novel homozygous NFKB1 mutation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **147**, 727-733.e2 (2021).
238. Gonzalez-Granado, L. I. *et al.* Acquired and Innate Immunity Impairment and Severe Disseminated Mycobacterium genavense Infection in a Patient With a NF- $\kappa$ B1 Deficiency.

*Front. Immunol.* **9**, 3148 (2019).

239. Sharfe, N. *et al.* NF $\kappa$ B pathway dysregulation due to reduced RelB expression leads to severe autoimmune disorders and declining immunity. *J. Autoimmun.* **137**, 102946 (2023).
240. Klemann, C. *et al.* Clinical and Immunological Phenotype of Patients With Primary Immunodeficiency Due to Damaging Mutations in NFKB2. *Front. Immunol.* **10**, 297 (2019).
241. Chen, K. *et al.* Germline Mutations in NFKB2 Implicate the Noncanonical NF- $\kappa$ B Pathway in the Pathogenesis of Common Variable Immunodeficiency. *Am. J. Hum. Genet.* **93**, 812–824 (2013).
242. Liu, Y. *et al.* Novel NFKB2 Mutation in Early-Onset CVID. *J. Clin. Immunol.* **34**, 686–690 (2014).
243. Kuehn, H. S. *et al.* Novel nonsense gain-of-function NFKB2 mutations associated with a combined immunodeficiency phenotype. *Blood* **130**, 1553–1564 (2017).
244. Grumont, R. J., Rourke, I. J. & Gerondakis, S. Rel-dependent induction of A1 transcription is required to protect B cells from antigen receptor ligation-induced apoptosis. *Genes Dev.* **13**, 400–411 (1999).
245. Köntgen, F. *et al.* Mice lacking the c-rel proto-oncogene exhibit defects in lymphocyte proliferation, humoral immunity, and interleukin-2 expression. *Genes Dev.* **9**, 1965–1977 (1995).
246. Feng, B. *et al.* NF- $\kappa$ B inducible genes BCL-X and cyclin E promote immature B-cell proliferation and survival. *Cell. Immunol.* **232**, 9–20 (2004).
247. Hilliard, B. A. *et al.* Critical roles of c-Rel in autoimmune inflammation and helper T cell differentiation. *J. Clin. Invest.* **110**, 843–850 (2002).
248. Rao, S., Gerondakis, S., Woltring, D. & Shannon, M. F. c-Rel Is Required for Chromatin Remodeling Across the IL-2 Gene Promoter. *J. Immunol.* **170**, 3724–3731 (2003).
249. Lamhamedi-Cherradi, S.-E. *et al.* Transcriptional Regulation of Type I Diabetes by NF- $\kappa$ B. *J. Immunol.* **171**, 4886–4892 (2003).
250. O’Keeffe, M. *et al.* Distinct roles for the NF- $\kappa$ B1 and c-Rel transcription factors in the differentiation and survival of plasmacytoid and conventional dendritic cells activated by TLR-9 signals. *Blood* **106**, 3457–3464 (2005).
251. Grumont, R. *et al.* C-Rel Regulates Interleukin 12 P70 Expression in Cd8+ Dendritic Cells by Specifically Inducing p35 Gene Transcription. *J. Exp. Med.* **194**, 1021–1032 (2001).
252. Fullard, N. *et al.* The c-Rel Subunit of NF- $\kappa$ B Regulates Epidermal Homeostasis and Promotes Skin Fibrosis in Mice. *Am. J. Pathol.* **182**, 2109–2120 (2013).
253. Zheng, Y. *et al.* NF- $\kappa$ B RelA (p65) Is Essential for TNF- $\alpha$ -Induced Fas Expression but Dispensable for Both TCR-Induced Expression and Activation-Induced Cell Death. *J. Immunol.* **166**, 4949–4957 (2001).
254. Li, M., Shillinglaw, W., Henzel, W. J. & Beg, A. A. The RelA(p65) Subunit of NF- $\kappa$ B Is Essential for Inhibiting Double-stranded RNA-induced Cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* **276**, 1185–1194 (2001).
255. 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 (1995).
256. Prendes, M., Zheng, Y. & Beg, A. A. Regulation of Developing B Cell Survival by RelA-Containing NF- $\kappa$ B Complexes. *J. Immunol.* **171**, 3963–3969 (2003).
257. Alcamo, E. *et al.* Requirement for the NF- $\kappa$ B Family Member RelA in the Development of Secondary Lymphoid Organs. *J. Exp. Med.* **195**, 233–244 (2002).
258. Beg, A. A. & Baltimore, D. An Essential Role for NF- $\kappa$ B in Preventing TNF- $\alpha$ -Induced Cell Death. *Science* **274**, 782–784 (1996).
259. Alcamo, E. *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.* **167**, 1592–1600 (2001).
260. Hilliard, B., Samoilova, E. B., Liu, T.-S. T., 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.* **163**, 2937–2943 (1999).
261. Gerondakis, S. *et al.* Unravelling the complexities of the NF- $\kappa$ B signalling pathway

- using mouse knockout and transgenic models. *Oncogene* **25**, 6781–6799 (2006).
262. Campbell, I. K., Gerondakis, S., O'Donnell, K. & Wicks, I. P. Distinct roles for the NF- $\kappa$ B1 (p50) and c-Rel transcription factors in inflammatory arthritis. *J. Clin. Invest.* **105**, 1799–1806 (2000).
263. Das, J. *et al.* A critical role for NF- $\kappa$ B in Gata3 expression and TH2 differentiation in allergic airway inflammation. *Nat. Immunol.* **2**, 45–50 (2001).
264. Artis, D. *et al.* Dendritic Cell-Intrinsic Expression of NF- $\kappa$ B1 Is Required to Promote Optimal Th2 Cell Differentiation. *J. Immunol.* **174**, 7154–7159 (2005).
265. Artis, D. *et al.* NF- $\kappa$ B1 Is Required for Optimal CD4<sup>+</sup> Th1 Cell Development and Resistance to *Leishmania major*. *J. Immunol.* **170**, 1995–2003 (2003).
266. Weih, D. S., Yilmaz, Z. B. & Weih, F. Essential Role of RelB in Germinal Center and Marginal Zone Formation and Proper Expression of Homing Chemokines. *J. Immunol.* **167**, 1909–1919 (2001).
267. Burkly, L. *et al.* Expression of relB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells. *Nature* **373**, 531–536 (1995).
268. 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).
269. Guerin, S. *et al.* RelB reduces thymocyte apoptosis and regulates terminal thymocyte maturation. *Eur. J. Immunol.* **32**, 1–9 (2002).
270. 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.* **175**, 2102–2110 (2005).
271. Zanetti, M., Castiglioni, P., Schoenberger, S. & Gerlioni, M. The Role of *rel B* in Regulating the Adaptive Immune Response. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **987**, 249–257 (2003).
272. Caamaño, J. H. *et al.* Nuclear Factor (NF)- $\kappa$ B2 (p100/p52) Is Required for Normal Splenic Microarchitecture and B Cell-mediated Immune Responses. *J. Exp. Med.* **187**, 185–196 (1998).
273. Franzoso, G. *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.* **187**, 147–159 (1998).
274. 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.* **172**, 752–756 (2004).
275. Grossmann, M. *et al.* The combined absence of the transcription factors Rel and RelA leads to multiple hemopoietic cell defects. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 11848–11853 (1999).
276. Grossmann, M. The anti-apoptotic activities of Rel and RelA required during B-cell maturation involve the regulation of Bcl-2 expression. *EMBO J.* **19**, 6351–6360 (2000).
277. Grumont, R. *et al.* The Mitogen-Induced Increase in T Cell Size Involves PKC and NFAT Activation of Rel/NF- $\kappa$ B-Dependent c-myc Expression. *Immunity* **21**, 19–30 (2004).
278. Wan, Y. Y. & DeGregori, J. The Survival of Antigen-Stimulated T Cells Requires NF $\kappa$ B-Mediated Inhibition of p73 Expression. *Immunity* **18**, 331–342 (2003).
279. Saibil, S. D. *et al.* CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T Cell Survival Is Regulated Differentially by Protein Kinase C $\theta$ , c-Rel, and Protein Kinase B. *J. Immunol.* **178**, 2932–2939 (2007).
280. Zheng, Y., Vig, M., Lyons, J., Van Parijs, L. & Beg, A. A. Combined Deficiency of p50 and cRel in CD4<sup>+</sup> T Cells Reveals an Essential Requirement for Nuclear Factor  $\kappa$ B in Regulating Mature T Cell Survival and In Vivo Function. *J. Exp. Med.* **197**, 861–874 (2003).
281. Aronica, M. A. *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* **163**, 5116–5124 (1999).
282. Corn, R. A. *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.* **171**, 1816–1824 (2003).
283. McCracken, S. A., Hadfield, K., Rahimi, Z., Gallery, E. D. & Morris, J. M. NF- $\kappa$ B-regulated suppression of T-bet in T cells represses Th1 immune responses in pregnancy. *Eur. J. Immunol.* **37**, 1386–1396 (2007).
284. Marsland, B. J., Soos, T. J., Späth, G., Littman, D. R. & 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.* **200**, 181–189 (2004).
285. Molinero, L. L., Cubre, A., Mora-Solano, C., Wang, Y. & Alegre, M.-L. T cell receptor/CARMA1/NF- $\kappa$ B signaling controls T-helper (Th) 17 differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 18529–18534 (2012).
286. Brüstle, A. *et al.* The NF- $\kappa$ B regulator MALT1 determines the encephalitogenic potential of Th17 cells. *J. Clin. Invest.* **122**, 4698–4709 (2012).
287. 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 (2010).
288. Sica, A. *et al.* Interaction of NF- $\kappa$ B and NFAT with the Interferon- $\gamma$  Promoter. *J. Biol. Chem.* **272**, 30412–30420 (1997).
289. Ruan, Q. *et al.* The Th17 immune response is controlled by the Rel–ROR $\gamma$ –ROR $\gamma$ T transcriptional axis. *J. Exp. Med.* **208**, 2321–2333 (2011).
290. Reinhard, K. *et al.* c-Rel promotes type 1 and type 17 immune responses during *Leishmania major* infection. *Eur. J. Immunol.* **41**, 1388–1398 (2011).
291. Tang, W. *et al.* The Oncoprotein and Transcriptional Regulator Bcl-3 Governs Plasticity and Pathogenicity of Autoimmune T Cells. *Immunity* **41**, 555–566 (2014).
292. Medoff, B. D. *et al.* CARMA1 Is Critical for the Development of Allergic Airway Inflammation in a Murine Model of Asthma. *J. Immunol.* **176**, 7272–7277 (2006).
293. Blonska, M., Joo, D., Zweidler-McKay, P. A., Zhao, Q. & Lin, X. CARMA1 Controls Th2 Cell-Specific Cytokine Expression through Regulating JunB and GATA3 Transcription Factors. *J. Immunol.* **188**, 3160–3168 (2012).
294. Ramadas, R. A. *et al.* CARMA1 Is Necessary for Optimal T Cell Responses in a Murine Model of Allergic Asthma. *J. Immunol.* **187**, 6197–6207 (2011).
295. Gregorczyk, I., Jasińska-Mikołajczyk, A. & Maślanka, T. Blockade of NF- $\kappa$ B 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. *Molecules* **26**, 3117 (2021).
296. Schmidt-Supprian, M. *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.* **173**, 1612–1619 (2004).
297. Donovan, C. E. *et al.* NF-kappa B/Rel transcription factors: c-Rel promotes airway hyperresponsiveness and allergic pulmonary inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **163**, 6827–6833 (1999).
298. Henriksson, J. *et al.* Genome-wide CRISPR Screens in T Helper Cells Reveal Pervasive Crosstalk between Activation and Differentiation. *Cell* **176**, 882–896.e18 (2019).
299. Li-Weber, M., Giaisi, M., Baumann, S., Pálfi, K. & Krammer, P. H. NF- $\kappa$ B synergizes with NF-AT and NF-IL6 in activation of the IL-4 gene in T cells. *Eur. J. Immunol.* **34**, 1111–1118 (2004).
300. Early, S. B., Huyett, P., Brown-Steinke, K., Borish, L. & Steinke, J. W. Functional analysis of –351 interleukin-9 promoter polymorphism reveals an activator controlled by NF- $\kappa$ B. *Genes Immun.* **10**, 341–349 (2009).
301. Jash, A. *et al.* Nuclear Factor of Activated T Cells 1 (NFAT1)-induced Permissive Chromatin Modification Facilitates Nuclear Factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)-mediated Interleukin-9 (IL-9) Transactivation. *J. Biol. Chem.* **287**, 15445–15457 (2012).
302. Xiao, X. *et al.* OX40 signaling favors the induction of TH9 cells and airway inflammation. *Nat. Immunol.* **13**, 981–990 (2012).
303. Xiao, X. *et al.* Guidance of super-enhancers in regulation of IL-9 induction and airway inflammation. *J. Exp. Med.* **215**, 559–574 (2018).
304. Bonadies, N. *et al.* PU.1 is regulated by NF- $\kappa$ B through a novel binding site in a 17 kb upstream enhancer element. *Oncogene* **29**, 1062–1072 (2010).
305. Zhou, Q. *et al.* Loss-of-function mutations in TNFAIP3 leading to A20 haploinsufficiency cause an early-onset autoinflammatory disease. *Nat. Genet.* **48**, 67–73 (2016).

306. Harusato, A. *et al.* IL-36 $\gamma$  signaling controls the induced regulatory T cell–Th9 cell balance via NF $\kappa$ B activation and STAT transcription factors. *Mucosal Immunol.* **10**, 1455–1467 (2017).
307. Wu, X. *et al.* SGK1 enhances Th9 cell differentiation and airway inflammation through NF- $\kappa$ B signaling pathway in asthma. *Cell Tissue Res.* **382**, 563–574 (2020).
308. He, Z. *et al.* Regulation of Th17 Differentiation by IKK $\alpha$ -Dependent and -Independent Phosphorylation of ROR $\gamma$ t. *J. Immunol.* **199**, 955–964 (2017).
309. Li, L. *et al.* Transcriptional regulation of the Th17 immune response by IKK $\alpha$ . *J. Exp. Med.* **208**, 787–796 (2011).
310. Chen, G. *et al.* The NF- $\kappa$ B Transcription Factor c-Rel Is Required for Th17 Effector Cell Development in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Immunol.* **187**, 4483–4491 (2011).
311. Powolny-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 (2011).
312. Visekruna, A. *et al.* c-Rel is crucial for the induction of Foxp3<sup>+</sup> regulatory CD4<sup>+</sup> T cells but not T<sub>H</sub> 17 cells. *Eur. J. Immunol.* **40**, 671–676 (2010).
313. Gerondakis, S. *et al.* Rel-deficient T cells exhibit defects in production of interleukin 3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 3405–3409 (1996).
314. Okamoto, K. *et al.* I $\kappa$ B $\zeta$  regulates TH17 development by cooperating with ROR nuclear receptors. *Nature* **464**, 1381–1385 (2010).
315. Chang, M., Lee, A. J., Fitzpatrick, L., Zhang, M. & Sun, S.-C. NF- $\kappa$ B1 p105 Regulates T Cell Homeostasis and Prevents Chronic Inflammation. *J. Immunol.* **182**, 3131–3138 (2009).
316. Cardinez, C. *et al.* Gain-of-function *IKBKB* mutation causes human combined immune deficiency. *J. Exp. Med.* **215**, 2715–2724 (2018).
317. Luu, M. *et al.* Transcription factor c-Rel mediates communication between commensal bacteria and mucosal lymphocytes. *J. Leukoc. Biol.* **111**, 1001–1007 (2022).
318. Chen, G. *et al.* Regulation of the IL-21 Gene by the NF- $\kappa$ B Transcription Factor c-Rel. *J. Immunol.* **185**, 2350–2359 (2010).
319. Liu, W.-H. *et al.* A miR-155–Peli1–c-Rel pathway controls the generation and function of T follicular helper cells. *J. Exp. Med.* **213**, 1901–1919 (2016).
320. Vasanthakumar, A. *et al.* The TNF Receptor Superfamily-NF- $\kappa$ B Axis Is Critical to Maintain Effector Regulatory T Cells in Lymphoid and Non-lymphoid Tissues. *Cell Rep.* **20**, 2906–2920 (2017).
321. Lu, C. *et al.* p50 suppresses cytotoxic T lymphocyte effector function to regulate tumor immune escape and response to immunotherapy. *J. Immunother. Cancer* **8**, e001365 (2020).
322. Di Pilato, M. *et al.* Targeting the CBM complex causes Treg cells to prime tumours for immune checkpoint therapy. *Nature* **570**, 112–116 (2019).
323. Heuser, C. *et al.* Prolonged IKK $\beta$  Inhibition Improves Ongoing CTL Antitumor Responses by Incapacitating Regulatory T Cells. *Cell Rep.* **21**, 578–586 (2017).
324. 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.* **202**, 3008–3019 (2019).
325. Rosenbaum, M. *et al.* Bcl10-controlled Malt1 paracaspase activity is key for the immune suppressive function of regulatory T cells. *Nat. Commun.* **10**, 2352 (2019).
326. Isomura, I. *et al.* c-Rel is required for the development of thymic Foxp3<sup>+</sup> CD4 regulatory T cells. *J. Exp. Med.* **206**, 3001–3014 (2009).
327. Long, M., Park, S.-G., Strickland, I., Hayden, M. S. & Ghosh, S. Nuclear Factor- $\kappa$ B Modulates Regulatory T Cell Development by Directly Regulating Expression of Foxp3 Transcription Factor. *Immunity* **31**, 921–931 (2009).
328. Oh, H. *et al.* An NF- $\kappa$ B Transcription-Factor-Dependent Lineage-Specific Transcriptional Program Promotes Regulatory T Cell Identity and Function. *Immunity* **47**,



450-465.e5 (2017).

329. Ronin, E. *et al.* The NF- $\kappa$ B RelA Transcription Factor Is Critical for Regulatory T Cell Activation and Stability. *Front. Immunol.* **10**, 2487 (2019).
330. Grinberg-Bleyer, Y. *et al.* NF- $\kappa$ B c-Rel Is Crucial for the Regulatory T Cell Immune Checkpoint in Cancer. *Cell* **170**, 1096-1108.e13 (2017).
331. Li, T. *et al.* c-Rel is a myeloid checkpoint for cancer immunotherapy. *Nat. Cancer* **1**, 507–517 (2020).
332. Rizk, J. *et al.* SMAC mimetics promote NIK-dependent inhibition of CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub> 17 cell differentiation. *Sci. Signal.* **12**, eaaw3469 (2019).
333. Speirs, K., Caamano, J., Goldschmidt, M. H., Hunter, C. A. & Scott, P. NF- $\kappa$ B2 Is Required for Optimal CD40-Induced IL-12 Production but Dispensable for Th1 Cell Differentiation. *J. Immunol.* **168**, 4406–4413 (2002).
334. Xiao, X. *et al.* The Costimulatory Receptor OX40 Inhibits Interleukin-17 Expression through Activation of Repressive Chromatin Remodeling Pathways. *Immunity* **44**, 1271–1283 (2016).
335. Grinberg-Bleyer, Y. *et al.* The Alternative NF- $\kappa$ B Pathway in Regulatory T Cell Homeostasis and Suppressive Function. *J. Immunol.* **200**, 2362–2371 (2018).
336. Li, J. *et al.* Role of the NF- $\kappa$ B Family Member RelB in Regulation of Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cells In Vivo. *J. Immunol.* **200**, 1325–1334 (2018).
337. Baik, S., Sekai, M., Hamazaki, Y., Jenkinson, W. E. & Anderson, G. Relb acts downstream of medullary thymic epithelial stem cells and is essential for the emergence of RANK<sup>+</sup> medullary epithelial progenitors. *Eur. J. Immunol.* **46**, 857–862 (2016).
338. Giordano, 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.* **111**, 11115–11120 (2014).
339. Ma, A. & Malynn, B. A. A20: linking a complex regulator of ubiquitylation to immunity and human disease. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 774–785 (2012).
340. Lin, L., Spoor, M. S., Gerth, A. J., Brody, S. L. & Peng, S. L. Modulation of Th1 Activation and Inflammation by the NF- $\kappa$ B Repressor Foxj1. *Science* **303**, 1017–1020 (2004).
341. Krishna, S. *et al.* Chronic Activation of the Kinase IKK $\beta$  Impairs T Cell Function and Survival. *J. Immunol.* **189**, 1209–1219 (2012).
342. Greve, B. *et al.* I $\kappa$ B Kinase 2/ $\beta$  Deficiency Controls Expansion of Autoreactive T Cells and Suppresses Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Immunol.* **179**, 179–185 (2007).
343. Brettingham-Moore, K. H. GM-CSF promoter chromatin remodelling and gene transcription display distinct signal and transcription factor requirements. *Nucleic Acids Res.* **33**, 225–234 (2005).
344. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC). Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat. Genet.* **45**, 1353–1360 (2013).
345. Mitterski, B. *et al.* Inhibitors in the NF $\kappa$ B cascade comprise prime candidate genes predisposing to multiple sclerosis, especially in selected combinations. *Genes Immun.* **3**, 211–219 (2002).
346. Leibowitz, S. M. & Yan, J. NF- $\kappa$ B Pathways in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis and the Therapeutic Implications. *Front. Mol. Neurosci.* **9**, (2016).
347. Kaltschmidt, B., Baeuerle, P. A. & Kaltschmidt, C. Potential involvement of the transcription factor NF- $\kappa$ B in neurological disorders. *Mol. Aspects Med.* **14**, 171–190 (1993).
348. Yan, J. & Greer, J. NF- $\kappa$ B, a Potential Therapeutic Target for the Treatment of Multiple Sclerosis. *CNS Neurol. Disord. - Drug Targets* **7**, 536–557 (2008).
349. Achiron, A., Feldman, A., Mandel, M. & Gurevich, M. Impaired Expression of Peripheral Blood Apoptotic-Related Gene Transcripts in Acute Multiple Sclerosis Relapse. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1107**, 155–167 (2007).
350. Satoh, J., Misawa, T., Tabunoki, H. & Yamamura, T. Molecular Network Analysis of T-Cell Transcriptome Suggests Aberrant Regulation of Gene Expression by NF- $\kappa$ B As a Biomarker for Relapse of Multiple Sclerosis. *Dis. Markers* **25**, 27–35 (2008).

351. Yan, J. *et al.* Increased constitutive activation of NF- $\kappa$ B p65 (RelA) in peripheral blood cells of patients with progressive multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **320**, 111–116 (2018).
352. Gillard, G. O. *et al.* DMF, but not other fumarates, inhibits NF- $\kappa$ B activity in vitro in an Nrf2-independent manner. *J. Neuroimmunol.* **283**, 74–85 (2015).
353. Gerdes, S., Shakeri, K. & Mrowietz, U. Dimethylfumarate inhibits nuclear binding of nuclear factor  $\kappa$ B but not of nuclear factor of activated T cells and CCAAT/enhancer binding protein  $\gamma$  in activated human T cells. *Br. J. Dermatol.* **156**, 838–842 (2007).
354. Peng, H. *et al.* Dimethyl Fumarate Inhibits Dendritic Cell Maturation via Nuclear Factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and Extracellular Signal-regulated Kinase 1 and 2 (ERK1/2) and Mitogen Stress-activated Kinase 1 (MSK1) Signaling. *J. Biol. Chem.* **287**, 28017–28026 (2012).
355. De Bosscher, K. *et al.* Glucocorticoid-mediated repression of nuclear factor- $\kappa$ B-dependent transcription involves direct interference with transactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 13504–13509 (1997).
356. Auphan, N., DiDonato, J. A., Rosette, C., Helmberg, A. & Karin, M. Immunosuppression by Glucocorticoids: Inhibition of NF- $\kappa$ B Activity Through Induction of I $\kappa$ B Synthesis. *Science* **270**, 286–290 (1995).
357. Eggert, M. *et al.* Changes in the activation level of NF-kappa B in lymphocytes of MS patients during glucocorticoid pulse therapy. *J. Neurol. Sci.* **264**, 145–150 (2008).
358. Dale, E., Davis, M. & Faustman, D. L. A role for transcription factor NF- $\kappa$ B in autoimmunity: possible interactions of genes, sex, and the immune response. *Adv. Physiol. Educ.* **30**, 152–158 (2006).
359. Chen, X. *et al.* IKK $\alpha$  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 (2015).
360. Anderson, K. *et al.* Mice deficient in PKC  $\theta$  demonstrate impaired *in vivo* T cell activation and protection from T cell-mediated inflammatory diseases. *Autoimmunity* **39**, 469–478 (2006).
361. Evaristo, C. *et al.* Cutting Edge: Engineering Active IKK $\beta$  in T Cells Drives Tumor Rejection. *J. Immunol.* **196**, 2933–2938 (2016).
362. Miggelbrink, A. M. *et al.* CD4 T-Cell Exhaustion: Does It Exist and What Are Its Roles in Cancer? *Clin. Cancer Res.* **27**, 5742–5752 (2021).
363. Clavijo, P. E. & Frauwirth, K. A. Anergic CD8<sup>+</sup> T Lymphocytes Have Impaired NF- $\kappa$ B Activation with Defects in p65 Phosphorylation and Acetylation. *J. Immunol.* **188**, 1213–1221 (2012).
364. Wei, S. C. *et al.* Distinct Cellular Mechanisms Underlie Anti-CTLA-4 and Anti-PD-1 Checkpoint Blockade. *Cell* **170**, 1120–1133.e17 (2017).
365. Arasanz, H. *et al.* PD1 signal transduction pathways in T cells. *Oncotarget* **8**, 51936–51945 (2017).
366. Karyampudi, L. *et al.* PD-1 Blunts the Function of Ovarian Tumor-Infiltrating Dendritic Cells by Inactivating NF- $\kappa$ B. *Cancer Res.* **76**, 239–250 (2016).
367. Fenwick, C. *et al.* Tumor suppression of novel anti-PD-1 antibodies mediated through CD28 costimulatory pathway. *J. Exp. Med.* **216**, 1525–1541 (2019).
368. Lalle, G., Twardowski, J. & Grinberg-Bleyer, Y. NF- $\kappa$ B in Cancer Immunity: Friend or Foe? *Cells* **10**, 355 (2021).
369. Gowrishankar, K. *et al.* Inducible but Not Constitutive Expression of PD-L1 in Human Melanoma Cells Is Dependent on Activation of NF- $\kappa$ B. *PLOS ONE* **10**, e0123410 (2015).
370. Capece, D. *et al.* Cancer secretome and inflammation: The bright and the dark sides of NF- $\kappa$ B. *Semin. Cell Dev. Biol.* **78**, 51–61 (2018).
371. Pichler, A. C. *et al.* TCR-independent CD137 (4-1BB) signaling promotes CD8<sup>+</sup>-exhausted T cell proliferation and terminal differentiation. *Immunity* **56**, 1631–1648.e10 (2023).
372. Zhang, H. *et al.* A chimeric antigen receptor with antigen-independent OX40 signaling mediates potent antitumor activity. *Sci. Transl. Med.* **13**, eaba7308 (2021).
373. Yap, T. A. *et al.* First-in-Human Phase I/II ICONIC Trial of the ICOS Agonist Vopratelimab Alone and with Nivolumab: ICOS-High CD4 T-Cell Populations and Predictors

- of Response. *Clin. Cancer Res.* **28**, 3695–3708 (2022).
374. Solinas, C., Gu-Trantien, C. & Willard-Gallo, K. The rationale behind targeting the ICOS-ICOS ligand costimulatory pathway in cancer immunotherapy. *ESMO Open* **5**, e000544 (2020).
375. Ward-Kavanagh, L. K., Lin, W. W., Šedý, J. R. & Ware, C. F. The TNF Receptor Superfamily in Co-stimulating and Co-inhibitory Responses. *Immunity* **44**, 1005–1019 (2016).
376. Steinbrecher, K. A., Harmel-Laws, E., Sitcheran, R. & Baldwin, A. S. Loss of Epithelial RelA Results in Deregulated Intestinal Proliferative/Apoptotic Homeostasis and Susceptibility to Inflammation. *J. Immunol.* **180**, 2588–2599 (2008).
377. Schmidt-Supprian, M. *et al.* Mature T Cells Depend on Signaling through the IKK Complex. *Immunity* **19**, 377–389 (2003).
378. Erben, U. *et al.* A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **7**, 4557–4576 (2014).
379. Oh, H. *et al.* *fu. Immunity* **47**, 450-465.e5 (2017).
380. Aksoy, P., Aksoy, B. A., Czech, E. & Hammerbacher, J. *Viable and efficient electroporation-based genetic manipulation of unstimulated human T cells.* <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/466243> (2018) doi:10.1101/466243.
381. Annunziato, F., Cosmi, L., Liotta, F., Maggi, E. & Romagnani, S. The phenotype of human Th17 cells and their precursors, the cytokines that mediate their differentiation and the role of Th17 cells in inflammation. *Int. Immunol.* **20**, 1361–1368 (2008).
382. Cosmi, L. *et al.* Human interleukin 17–producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor. *J. Exp. Med.* **205**, 1903–1916 (2008).
383. Hwang, S., Cobb, D. A., Bhadra, R., Youngblood, B. & Khan, I. A. Blimp-1–mediated CD4 T cell exhaustion causes CD8 T cell dysfunction during chronic toxoplasmosis. *J. Exp. Med.* **213**, 1799–1818 (2016).
384. Aubert, R. D. *et al.* Antigen-specific CD4 T-cell help rescues exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 21182–21187 (2011).
385. Rangachari, M. *et al.* Bat3 promotes T cell responses and autoimmunity by repressing Tim-3–mediated cell death and exhaustion. *Nat. Med.* **18**, 1394–1400 (2012).
386. Zhu, C. *et al.* Tim-3 adaptor protein Bat3 is a molecular checkpoint of T cell terminal differentiation and exhaustion. *Sci. Adv.* **7**, eabd2710 (2021).
387. Malandro, N. *et al.* Clonal Abundance of Tumor-Specific CD4 + T Cells Potentiates Efficacy and Alters Susceptibility to Exhaustion. *Immunity* **44**, 179–193 (2016).
388. Goding, S. R., Wilson, K. A., Rosinsky, C. & Antony, P. A. PD-L1–Independent Mechanisms Control the Resistance of Melanoma to CD4+ T Cell Adoptive Immunotherapy. *J. Immunol.* **200**, 3304–3311 (2018).
389. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
390. Sarkar, S. *et al.* Regulation of pathogenic IL-17 responses in collagen-induced arthritis: roles of endogenous interferon-gamma and IL-4. *Arthritis Res. Ther.* **11**, R158 (2009).
391. Ng, H. P., Paul Banga, J. & Kung, A. W. C. Development of a Murine Model of Autoimmune Thyroiditis Induced with Homologous Mouse Thyroid Peroxidase. *Endocrinology* **145**, 809–816 (2004).
392. Kong, Y. M. Experimental Autoimmune Thyroiditis in the Mouse. *Curr. Protoc. Immunol.* **78**, (2007).
393. Wang, W. *et al.* Leptin receptor antagonist attenuates experimental autoimmune thyroiditis in mice by regulating Treg/Th17 cell differentiation. *Front. Endocrinol.* **13**, 1042511 (2022).
394. Barin, J. G. *et al.* Thyroid-Specific Expression of IFN- $\gamma$  Limits Experimental Autoimmune Thyroiditis by Suppressing Lymphocyte Activation in Cervical Lymph Nodes. *J. Immunol.* **170**, 5523–5529 (2003).
395. Liu, H., Li, Y., Zhu, Y., Ma, L. & Xue, H. Notch Signaling Pathway Promotes Th17 Cell Differentiation and Participates in Thyroid Autoimmune Injury in Experimental Autoimmune Thyroiditis Mice. *Mediators Inflamm.* **2023**, 1–10 (2023).

396. Powrie, F., Leach, M. W., Mauze, S., Caddie, L. B. & Coffman, R. L. Phenotypically distinct subsets of CD4<sup>+</sup> T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 *scid* mice. *Int. Immunol.* **5**, 1461–1471 (1993).
397. Izcue, A., Coombes, J. L. & Powrie, F. Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation. *Immunol. Rev.* **212**, 256–271 (2006).
398. Woodward, A. L. *et al.* An obligate role for T-cell receptor  $\alpha\beta$ <sup>+</sup> T cells but not T-cell receptor  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> T cells, B cells, or CD40/CD40L interactions in a mouse model of atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **107**, 359–366 (2001).
399. Jin, H., He, R., Oyoshi, M. & Geha, R. S. Animal Models of Atopic Dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* **129**, 31–40 (2009).
400. Villemain, C. *et al.* The heightened importance of the microbiome in cancer immunotherapy. *Trends Immunol.* **44**, 44–59 (2023).
401. Round, J. L. & Mazmanian, S. K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 313–323 (2009).
402. Schwabe, R. F. & Jobin, C. The microbiome and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 800–812 (2013).
403. Munteanu, C. & Schwartz, B. The relationship between nutrition and the immune system. *Front. Nutr.* **9**, 1082500 (2022).
404. Rahman, M. M. & McFadden, G. Modulation of NF- $\kappa$ B signalling by microbial pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 291–306 (2011).
405. Kawai, T. & Akira, S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int. Immunol.* **21**, 317–337 (2009).
406. Zhang, S., Paul, S. & Kundu, P. NF- $\kappa$ B Regulation by Gut Microbiota Decides Homeostasis or Disease Outcome During Ageing. *Front. Cell Dev. Biol.* **10**, 874940 (2022).
407. Lee, Y. K., Menezes, J. S., Umesaki, Y. & Mazmanian, S. K. Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 4615–4622 (2011).
408. Bianchimano, P. *et al.* Mining the microbiota to identify gut commensals modulating neuroinflammation in a mouse model of multiple sclerosis. *Microbiome* **10**, 174 (2022).
409. Johanson, D. M. *et al.* Experimental autoimmune encephalomyelitis is associated with changes of the microbiota composition in the gastrointestinal tract. *Sci. Rep.* **10**, 15183 (2020).
410. Cox, L. M. *et al.* Gut Microbiome in Progressive Multiple Sclerosis. *Ann. Neurol.* **89**, 1195–1211 (2021).
411. Jangi, S. *et al.* Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis. *Nat. Commun.* **7**, 12015 (2016).
412. Zhang, H., Sparks, J. B., Karyala, S. V., Settlage, R. & Luo, X. M. Host adaptive immunity alters gut microbiota. *ISME J.* **9**, 770–781 (2015).
413. Sutherland, D. B., Suzuki, K. & Fagarasan, S. Fostering of advanced mutualism with gut microbiota by Immunoglobulin A. *Immunol. Rev.* **270**, 20–31 (2016).
414. Zheng, D., Liwinski, T. & Elinav, E. Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Res.* **30**, 492–506 (2020).
415. Kawamoto, S. *et al.* The Inhibitory Receptor PD-1 Regulates IgA Selection and Bacterial Composition in the Gut. *Science* **336**, 485–489 (2012).
416. Proietti, M. *et al.* ATP-Gated Ionotropic P2X7 Receptor Controls Follicular T Helper Cell Numbers in Peyer’s Patches to Promote Host-Microbiota Mutualism. *Immunity* **41**, 789–801 (2014).
417. He, B. *et al.* Resetting microbiota by *Lactobacillus reuteri* inhibits T reg deficiency–induced autoimmunity via adenosine A2A receptors. *J. Exp. Med.* **214**, 107–123 (2017).
418. Koshida, K. *et al.* Dysfunction of Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cells Induces Dysbiosis of Gut Microbiota via Aberrant Binding of Immunoglobulins to Microbes in the Intestinal Lumen. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 8549 (2023).
419. Labarta-Bajo, L. *et al.* CD8 T cells drive anorexia, dysbiosis, and blooms of a commensal with immunosuppressive potential after viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **117**,

24998–25007 (2020).

420. Gu, M. *et al.* Host innate and adaptive immunity shapes the gut microbiota biogeography. *Microbiol. Immunol.* **66**, 330–341 (2022).
421. Fukata, M. *et al.* The Myeloid Differentiation Factor 88 (MyD88) Is Required for CD4<sup>+</sup> T Cell Effector Function in a Murine Model of Inflammatory Bowel Disease. *J. Immunol.* **180**, 1886–1894 (2008).
422. Gelman, A. E., Zhang, J., Choi, Y. & Turka, L. A. Toll-Like Receptor Ligands Directly Promote Activated CD4<sup>+</sup> T Cell Survival. *J. Immunol.* **172**, 6065–6073 (2004).
423. Chang, J. *et al.* MyD88 is essential to sustain mTOR activation necessary to promote T helper 17 cell proliferation by linking IL-1 and IL-23 signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 2270–2275 (2013).
424. Wang, S. *et al.* MyD88 Adaptor-Dependent Microbial Sensing by Regulatory T Cells Promotes Mucosal Tolerance and Enforces Commensalism. *Immunity* **43**, 289–303 (2015).
425. Grainger, D. J. & Metcalfe, J. C. Tamoxifen: Teaching an old drug new tricks? *Nat. Med.* **2**, 381–385 (1996).
426. Behjati, S. & Frank, M. The Effects of Tamoxifen on Immunity. *Curr. Med. Chem.* **16**, 3076–3080 (2009).
427. Komi & Lassila. Antioestrogens Enhance Tumour Necrosis Factor Receptor 2 (TNF-R2) Expression and TNF-R2-Mediated Proliferation in Activated T Cells. *Scand. J. Immunol.* **48**, 254–260 (1998).
428. Bebo, B. F. *et al.* Treatment with selective estrogen receptor modulators regulates myelin specific T-cells and suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glia* **57**, 777–790 (2009).
429. Zhao, B. *et al.* The NF- $\kappa$ B Genomic Landscape in Lymphoblastoid B Cells. *Cell Rep.* **8**, 1595–1606 (2014).
430. de Oliveira, K. A. P. *et al.* A roadmap of constitutive NF- $\kappa$ B activity in Hodgkin lymphoma: Dominant roles of p50 and p52 revealed by genome-wide analyses. *Genome Med.* **8**, 28 (2016).
431. Wong, D. *et al.* Extensive characterization of NF- $\kappa$ B binding uncovers non-canonical motifs and advances the interpretation of genetic functional traits. *Genome Biol.* **12**, R70 (2011).
432. Adelaja, A. *et al.* Six distinct NF $\kappa$ B signaling codons convey discrete information to distinguish stimuli and enable appropriate macrophage responses. *Immunity* **54**, 916–930.e7 (2021).
433. Hoffmann, A. & Baltimore, D. Circuitry of nuclear factor kappaB signaling. *Immunol. Rev.* **210**, 171–186 (2006).
434. Cheng, Q. J. *et al.* NF- $\kappa$ B dynamics determine the stimulus specificity of epigenomic reprogramming in macrophages. *Science* **372**, 1349–1353 (2021).
435. Hoffmann, A., Levchenko, A., Scott, M. L. & Baltimore, D. The I $\kappa$ B-NF- $\kappa$ B Signaling Module: Temporal Control and Selective Gene Activation. *Science* **298**, 1241–1245 (2002).
436. Behar, M. & Hoffmann, A. Understanding the temporal codes of intra-cellular signals. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **20**, 684–693 (2010).
437. Baud, V. & Karin, M. Is NF- $\kappa$ B a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat. Rev. Drug Discov.* **8**, 33–40 (2009).
438. Takada, Y., Singh, S. & Aggarwal, B. B. Identification of a p65 Peptide That Selectively Inhibits NF- $\kappa$ B Activation Induced by Various Inflammatory Stimuli and Its Role in Down-regulation of NF- $\kappa$ B-mediated Gene Expression and Up-regulation of Apoptosis. *J. Biol. Chem.* **279**, 15096–15104 (2004).
439. Xu, S. Internalization, Trafficking, Intracellular Processing and Actions of Antibody-Drug Conjugates. *Pharm. Res.* **32**, 3577–3583 (2015).
440. Fu, Z., Li, S., Han, S., Shi, C. & Zhang, Y. Antibody drug conjugate: the “biological missile” for targeted cancer therapy. *Signal Transduct. Target. Ther.* **7**, 93 (2022).
441. Gray, A. G., Morgan, J., Linch, D. C. & Huehns, E. R. Uptake of antibody directed cytotoxic liposomes by CD3 on human T cells. *Clin. Exp. Immunol.* **72**, 168–173 (1988).
442. Edwards, K. A. *et al.* Engineering liposomes as detection reagents for CD4<sup>+</sup> T-cells.

*Anal. Methods* **4**, 3948 (2012).

443. Xie, F. *et al.* Liposomal T cell engager and re-director for tumor cell eradication in cancer immunotherapy. *mAbs* **14**, 2115205 (2022).

444. Liu, P., Chen, G. & Zhang, J. A Review of Liposomes as a Drug Delivery System: Current Status of Approved Products, Regulatory Environments, and Future Perspectives. *Molecules* **27**, 1372 (2022).

445. Sercombe, L. *et al.* Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. *Front. Pharmacol.* **6**, (2015).

446. Mitchell, M. J. *et al.* Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **20**, 101–124 (2021).

447. Ojha, S. & Kumar, B. A review on nanotechnology based innovations in diagnosis and treatment of multiple sclerosis. *J. Cell. Immunother.* **4**, 56–64 (2018).

448. Schmid, D. *et al.* T cell-targeting nanoparticles focus delivery of immunotherapy to improve antitumor immunity. *Nat. Commun.* **8**, 1747 (2017).

449. Yan, H. *et al.* Suppression of NF- $\kappa$ B activity via nanoparticle-based siRNA delivery alters early cartilage responses to injury. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, (2016).

450. Legut, M. *et al.* A genome-scale screen for synthetic drivers of T cell proliferation. *Nature* **603**, 728–735 (2022).

451. Seo, H. *et al.* BATF and IRF4 cooperate to counter exhaustion in tumor-infiltrating CAR T cells. *Nat. Immunol.* **22**, 983–995 (2021).

452. Kober-Hasslacher, M. *et al.* c-Rel gain in B cells drives germinal center reactions and autoantibody production. *J. Clin. Invest.* **130**, 3270–3286 (2020).

453. Gilmore, T. D. & Gerondakis, S. The c-Rel Transcription Factor in Development and Disease. *Genes Cancer* **2**, 695–711 (2011).

454. Gilmore, T. D., Cormier, C., Jean-Jacques, J. & Gapuzan, M.-E. Malignant transformation of primary chicken spleen cells by human transcription factor c-Rel. *Oncogene* **20**, 7098–7103 (2001).

455. Gilmore, T. D., Kalaitzidis, D., Liang, M.-C. & Starczynowski, D. T. The c-Rel transcription factor and B-cell proliferation: a deal with the devil. *Oncogene* **23**, 2275–2286 (2004).