

SOMMAIRE

RESUME	1
SUMMARY	3
AVANT-PROPOS	7
CHAPITRE I : IMPORTANCE DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION DANS LE DEVELOPPEMENT, L'ACTIVATION ET LA DIFFERENCIATION DES LYMPHOCYTES T. 9	
1. GENERALITES SUR LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION	9
2. LE DEVELOPPEMENT LYMPHOCYTAIRE T.	13
3. DE L'ETP AUX PRECURSEURS DES LYMPHOCYTES T CD4 ET CD8.	14
3.1. FACTEURS RESPONSABLES DU CHOIX DU LIGNAGE LYMPHOCYTAIRE T CD4 OU CD8 DANS LE THYMUS.	17
3.2. SELECTION POSITIVE : IMPORTANCE DU CONTROLE DE L'EXPRESSION DES GENES <i>CD4</i> ET <i>CD8</i>	18
3.3. SELECTION NEGATIVE ET SORTIE DU THYMUS DES LYMPHOCYTES T NAÏFS	22
4. ACTIVATION ET DIFFERENCIATION DES LYMPHOCYTES T CD4.	23
4.1. LES TH1	25
4.2. LES TH2	28
4.3. LES TH17	30
4.4. LES TREG	32
4.5. LES TFH	34
4.6. AUTRES TYPES CELLULAIRES :	36
4.6.1. Les Tr1	36
4.6.2. Les Th9	37
4.6.3. Les Th22	39
5. DEVENIR DES LYMPHOCYTES T CD4 APRES ACTIVATION : SEULS LES MEILLEURS SURVIVRONT	39
5.1. LA NOTION DE MEMOIRE IMMUNITAIRE	39
5.2. LA MEMOIRE LYMPHOCYTAIRE.	41
5.2.1. Différences entre Tcm et Tem	41
5.2.2. Mémoire au sein des tissus : rôles des Trm	42
5.2.3. Lymphocytes T Mémoires virtuels : des lymphocytes mémoires sans expérience	43
CHAPITRE II : ROLE DES PROTEINES FOXO DANS LE SYSTEME IMMUNITAIRE	44
1. STRUCTURE ET FONCTIONS DES PROTEINES DE TYPE FOXO	44
1.1. DIFFERENTES MODIFICATIONS POST-TRANSCRIPTIONNELLES : PHOSPHORYLATION, ACETYLATION ET METHYLATION	46
2. FOXO1 ET FOXO3 : ACTEURS CLES DANS LA FONCTION ET LE DEVELOPPEMENT DU SYSTEME IMMUNITAIRE	47
2.1. ROLES DE FOXO1 DANS LES CELLULES DU SYSTEME IMMUNITAIRE ADAPTATIF	48
2.1.1. Rôles dans les lymphocytes T CD4	49
2.1.2. Rôles dans les lymphocytes T CD8	52
2.2. ROLES DE FOXO3 DANS LES CELLULES DU SYSTEME IMMUNITAIRE INNE	53
2.2.1. Rôles dans les cellules présentatrices d'antigènes	53
2.2.2. Rôles de Foxo3 dans les lymphocytes T	54
CHAPITRE III : ROLES DES PROTEINES T-BOX DANS LE SYSTEME IMMUNITAIRE ...	56
1. STRUCTURE ET ROLES DES PROTEINES T-BOX	57

2. FONCTIONS DES PROTEINES T-BOX DANS LE SYSTEME IMMUNITAIRE.....	57
2.1. ROLES D'EOMES ET DE T-BET DANS LE DEVELOPPEMENT ET LES FONCTIONS DES LYMPHOCYTES T.....	58
2.1.1. <i>Fonctions dans les lymphocytes T CD8</i>	58
2.1.2. <i>Fonctions dans les lymphocytes T CD4</i>	61
2.2. ROLES D'EOMES ET DE T-BET DANS LE DEVELOPPEMENT ET LES FONCTIONS DES CELLULES NK.....	63
CHAPITRE IV : FACTEURS DE TRANSCRIPTION ET SUSCEPTIBILITE AU MALADIES AUTO-IMMUNES : CAS DE LA SCLEROSE EN PLAQUES ET DE SON MODELE MURIN.	66
1. IDENTIFICATION DES FACTEURS IMPLIQUES DANS LE DEVELOPPEMENT DE LA SCLEROSE EN PLAQUES.	66
1.1. GENES ASSOCIES A LA SUSCEPTIBILITE DE LA SCLEROSE EN PLAQUES : DE LA GENETIQUE AUX ETUDES D'ASSOCIATION PANGENOMIQUES (GWAS).....	66
1.2. UTILITE ET IMPORTANCE DES ETUDES GWAS.....	68
1.3. ROLES DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION T-BOX ET FOXO CHEZ L'HOMME.....	70
2. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA SEP ET L'EAE.....	71
2.1. ROLES DES LYMPHOCYTES T CD4.	71
2.2. ROLES DES LYMPHOCYTES T CD8.	73
2.3. THERAPIES ACTUELLES	74
2.3.1. <i>Interféron Beta</i>	74
2.3.2. <i>L'acétate de Glatiramère</i>	74
2.3.3. <i>Le Natalizumab et le Fingolimod</i>	75
2.3.4. <i>Déplétion des Lymphocytes B : Effets prometteurs dans la SEP</i>	75
OBJECTIFS	77
RESULTATS	79
DISCUSSION	147
RÉFÉRENCES.....	167

Avant-Propos

La mise en place d'une réponse immunitaire appropriée est essentielle pour la protection de l'organisme contre différents pathogènes. Les Lymphocytes T CD4 (LT CD4) jouent un rôle central dans ces réponses de par leurs plasticités et leurs capacités à se différencier en plusieurs sous-types qui permettent de lutter efficacement contre l'agresseur rencontré. Avant de pouvoir exercer leurs fonctions au sein de l'organisme, les lymphocytes T vont passer des étapes successives de développement qui sont régies par l'expression de nombreux facteurs de transcription (FT). Ces étapes sont essentielles à la différenciation du lignage T et à la sélection des lymphocytes T CD4 et CD8 qui, une fois les différentes étapes de maturation dans le thymus effectuées, vont rejoindre la périphérie dans l'attente d'une activation.

Lors d'une infection par un pathogène, les cellules de l'immunité innée vont dans un premier temps être activées par la reconnaissance de molécules associées uniquement aux pathogènes (« Pathogen Associated Molecular Patterns » ou PAMP) par des récepteurs particuliers : les PRR (« Pattern Recognition Receptors »). Ces signaux vont permettre aux cellules présentatrices d'antigènes (APC), de s'activer et de migrer au niveau des organes lymphoïdes secondaires pour activer les Lymphocytes T CD4 et CD8. Cette activation est possible grâce à l'interaction du récepteur des lymphocytes T (TCR) avec un complexe CMH-peptide présent à la surface des APC. Lors de ces réponses immunes, les LT CD4 vont alors, en fonction de l'intensité du signal TCR, des signaux de co-stimulation et du contexte inflammatoire, se différencier en plusieurs sous-populations qui orchestreront et orienteront les réponses immunes de manière adéquate en fonction du type de pathogène rencontré. L'initiation et le maintien des différents lignages de LT CD4 sont contrôlés par les cytokines présentes dans le microenvironnement et par l'expression de facteurs de transcription caractéristiques de chaque lignage. L'expression des différents facteurs de transcription va permettre la mise en place d'un réseau transcriptionnel particulier, permettant à chaque type de LT CD4 d'acquérir ses fonctions effectrices spécifiques. Suite à l'élimination de l'agresseur, une mémoire lymphocytaire va se mettre en place et des LT spécifiques du pathogène vont persister. Ces cellules sont caractérisées par une longue durée de vie, des capacités

à répondre et s'expandre plus rapidement lors d'une réinfection, et par l'expression de FT particuliers qui permettent le maintien de cette population mémoire.

Notre équipe s'intéresse plus particulièrement aux facteurs qui peuvent influencer l'activation, la différenciation et l'acquisition des fonctions effectrices des lymphocytes T CD4. Au cours de ma thèse je me suis intéressé aux rôles des facteurs de transcription Foxo3 et Eomes, deux FT dont le rôle au sein du système immunitaire est bien connu, mais dont les fonctions au sein du compartiment T CD4 restent peu connues.

Ainsi dans ce manuscrit de thèse, nous aborderons le rôle des FT de transcription qui permettent le développement, l'activation et la mise en place des fonctions effectrices de ces différents types de lymphocytes T CD4, ainsi que l'implication des FT Foxo3 et Eomes dans la différenciation des lymphocytes T CD4 pathogènes au cours de processus auto-immuns chez la souris et chez l'Homme.

Chapitre I : Importance des Facteurs de Transcription dans le développement, l'activation et la différenciation des Lymphocytes T.

1. Généralités sur les Facteurs de Transcription

La régulation de l'expression des gènes joue un rôle central dans le développement de chaque type cellulaire, et dans notre cas, dans le développement des cellules du système immunitaire. Cette régulation s'effectue en réponse à des stimuli spécifiques qui vont activer ou réprimer certains gènes, et ce *via* la mobilisation de protéines particulières : les Facteurs de Transcription (FT). Ces protéines et leurs séquences sont extrêmement conservées au cours de l'évolution ce qui suggère qu'elles sont indispensables au développement des organismes. Historiquement, les premiers FT ont été décrits en 1980, et ont été classés en fonction de leur domaine de liaison à l'ADN (également appelé DBD pour « DNA Binding Domain ») (**Figure 1**).

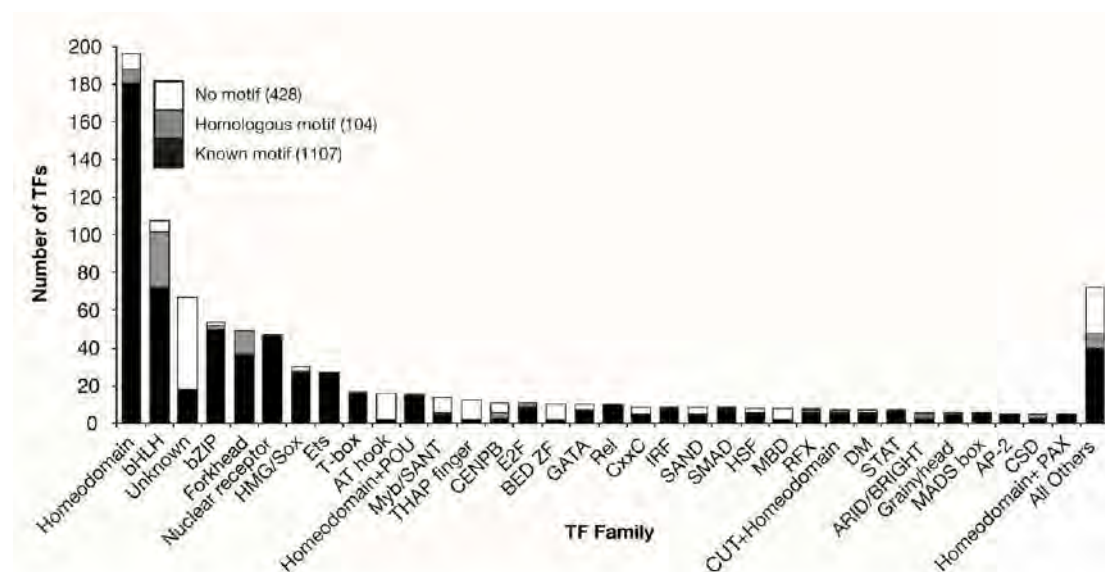


Figure 1 – Classification et quantification des différents Facteurs de Transcription chez les eucaryotes. Liste non exhaustive des principales familles de FT et du nombre de protéines identifiées à ce jour pour chaque famille. Les barres noires représentent le nombre de FT dont on connaît le site de fixation, en gris ceux qui reconnaissent des séquences homologues à d'autres FT de la même famille, et en blanc le nombre de FT dont on ne connaît pas à ce jour le motif d'ADN reconnu. **Adapté de Lambert 2018**

Ce domaine de liaison à l'ADN permet aux FT de se fixer au niveau de motifs de liaison à l'ADN (TFBS pour « Transcription Factor Binding Site ») propres à chaque famille ou sous-famille de FT. En plus de leur capacité à se fixer au niveau de leurs TFBS,

d'autres modes de régulation de la transcription ont été découverts et sont valables pour la plupart des familles de FT.

Tout d'abord, certains facteurs de transcription appartiennent à des complexes et régulent indirectement l'expression de certains gènes en jouant le rôle de co-facteurs. Ensuite, il existe des FT dits « Pionniers », comme les facteurs de la famille **GATA** ou **FOX**, qui vont permettre le remodelage de la chromatine et faciliter l'accès à d'autres FT au niveau de leurs séquences cibles (Zaret and Carroll 2011). Ces facteurs de transcription sont identifiables par leur capacité à accéder aux nucléosomes et à certaines formes de chromatine compactée. D'autres FT, comme les protéines de la famille STAT, peuvent entrer en compétition pour inhiber la fixation d'autres FT. En effet, dans les Treg, STAT5 peut se fixer au niveau du locus de gènes impliqués dans le lignage Th17 pour empêcher STAT3 d'exercer ses fonctions. D'autres facteurs comme RUNX1 peuvent, selon le lignage où ils vont être exprimés, s'associer avec ROR γ T ou Foxp3 et ainsi favoriser la différenciation Th17 ou Treg. Enfin, certains facteurs comme T-bet ou Bcl6 peuvent séquestrer d'autres FT tels que GATA3 ou T-bet pour limiter leurs fixations au niveau de leurs TFBS (**Figure 2**).

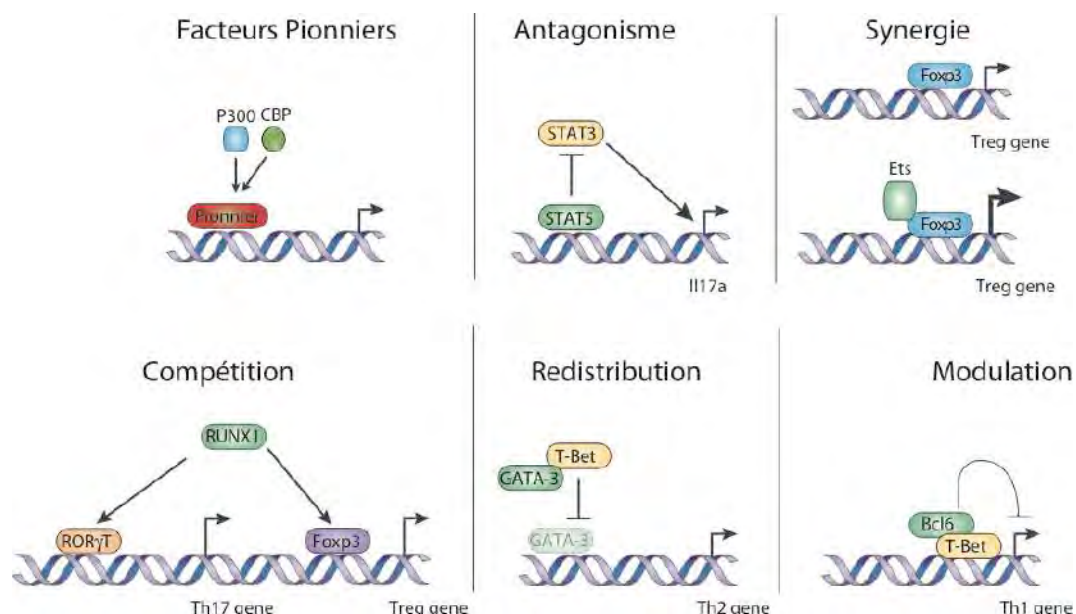


Figure 2 – Schématisation des différents modes d'action des Facteurs de Transcription. Certains FT « pionniers » peuvent remodeler la chromatine afin de faciliter l'accès à d'autres protéines qui vont à leur tour activer la transcription de leurs gènes cibles. Les facteurs STAT peuvent quant à eux, en fonction du type cellulaire, entrer en compétition pour inhiber la transcription de certains gènes. D'autres facteurs peuvent quant à eux amplifier la transcription en jouant le rôle de cofacteurs, comme c'est le cas d'Ets et Foxp3. RUNX1 peut s'associer avec ROR γ T ou Foxp3 pour favoriser la différenciation Th17 ou Treg et par la même occasion inhiber l'un des deux lignages en fonction du contexte cellulaire. T-bet peut quant à lui interagir avec GATA-3 pour l'empêcher de se fixer au niveau de sa séquence cible et réprime donc le programme Th2. Enfin Bcl6 limite l'activité de T-bet au niveau de certains locus Th1.

Le génome est compacté dans le noyau grâce à un complexe d'histones. Deux histones de chaque classe : H2A, H2B, H3 et H4 vont s'associer en octamère et permettent l'enroulement de l'ADN autour d'elles et la formation de nucléosomes. Les nucléosomes vont être reliés entre eux par une histone H1 « Linker » qui permet de sceller les complexes. On distingue plusieurs types de modifications au niveau des histones H3-H4 et H2A-H2B : l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitination, la N-Glycolysation et la sumoylation. L'acétylation et la méthylation des histones font partie des modifications les plus étudiées et les plus comprises à ce jour, mais restent néanmoins complexes car elles peuvent être associées à des états permissifs ou répressifs de la transcription. Si l'acétylation est couramment associée à un état accessible de la chromatine, la méthylation en fonction des résidus, peut être associée à une compaction ou un décompactage de la chromatine.

Ainsi, si l'acétylation des histones est considérée comme une marque permissive, la méthylation peut induire en fonction du résidu, la répression ou l'activation de la transcription. Par exemple les mono-, ou tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (**H3K4me1/H3K4me3**) sont des marques actives, retrouvées respectivement à proximité des enhancers et des régions promotrices. Au contraire, la di- ou tri-méthylation de la lysine 9 (**H3K9me2/H3K9me3**), est associée à la compaction de l'ADN (Goldberg, Allis et al. 2007, Wei, Wei et al. 2009). Une liste non exhaustive des modifications post-traductionnelles des résidus d'histone est listée dans le tableau 1 ainsi que les protéines capables d'induire de telles modifications et leurs localisations (Figure 20, Table 1).

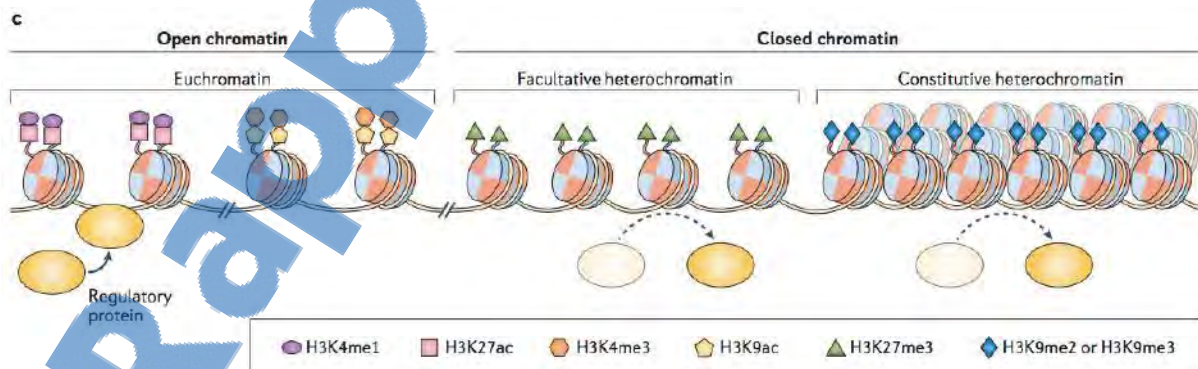


Table 1 Histone post-translational modifications and associated regulatory proteins				
Modification	Primary location	Writers	Erasers	Readers
Activating histone modifications				
H3K4me1	Enhancers and gene body	SETD1A, SETD1B, KMT2A, KMT2B, KMT2C and KMT2D ¹⁶¹	KDM1A and KDM1B ¹⁶²	KAT5 (REF. 163)
H3K4me3	Promoter and TSS	SETD1A, SETD1B, KMT2A, KMT2B, KMT2C and KMT2D ¹⁶¹	KDM2B, KDM5A, KDM5B, KDM5C and KDM5D ¹⁶²	NURF (BPTF) ¹⁶⁴
H3K36me3	Gene body	SETD2 and NSD1 (REF. 162)	KDM4A, KDM4B and KDM4C ¹⁶²	PSIP1 (REF. 165) and MORF4L1 (REF. 64)
H3K9ac	Promoter and TSS	KAT2A and KAT2B ¹⁶⁶	HDACs ¹⁶⁷ , SIRT1 and SIRT6 (REF. 168)	BET family (BRD4) ¹⁶⁹
H3K27ac	Enhancers	p300 and CREBBP ¹⁶⁶	HDACs ¹⁶⁷	BET family (BRD4) ¹⁶⁹
Repressive histone modifications				
H3K9me2	Constitutive and facultative heterochromatin	EHMT1 and EHMT2 ¹⁷⁰	KDM1A, KDM1B, KDM3A, KDM3B, JMJD1C, KDM4A, KDM4B, KDM4C, KDM4D, KDM7A, JHDM1E and JHDM1F ¹⁶²	CBX5 (REF. 171)
H3K9me3	Constitutive heterochromatin	SUV39H1, SUV39H2 (REFS 172,173) and SETDB1 (REF. 58)	KDM4A, KDM4B, KDM4C and KDM4D ¹⁶²	CBX5 (REF. 171)
H3K27me3	Facultative heterochromatin	PRC2 (EZH2) ⁶³	KDM6B and KDM6A ¹⁶²	PRC1 (CBX proteins, BMI1) and PRC2 (EED) ⁶³

Figure 20 – Représentation schématique des différents états de compaction et décompactage de l'ADN ainsi que la liste des modifications post-traductionnelles associées à chaque état. Les modifications pro-traductionnelles telles que H3K4me1/ H3K4me3, H3K27Ac et H3K9Ac permettent l'ouverture de la chromatine, la fixation de FT et de la machinerie de transcription au niveau de leurs séquences cibles. Au contraire des marques répressives comme H3K27m3, H3K9me2/H3K9me3 sont plutôt associées à une chromatine condensée qui empêche la transcription des gènes. Les enzymes des modifications post-traductionnelles sont listées dans le tableau 1 et sont composées de « writers » (protéines qui permettent l'ajout de MPTs), d'« erasers » (protéines qui permettent d'enlever des MPTs) et de protéines « readers » qui reconnaissent les MPTs et qui se fixent au niveau de la chromatine, et favorisent le recrutement de FT spécifiques (*Restifo et al., nri 2018*).

Ces modifications épigénétiques sont accompagnées de plusieurs remodelages de la chromatine, et particulièrement lors de la différenciation et l'activation des lymphocytes T. Dans les Lymphocytes T CD4 (LT CD4) naïfs par exemple, la chromatine est hautement compactée dans le noyau sous forme d'hétérochromatine alors que lors de l'activation des LT CD4 on observe une décondensation de l'hétérochromatine, et l'apparition d'euchromatine dans le noyau. Ces changements de conformation de la chromatine se déroulent grâce à la translocation dans le noyau de nombreux facteurs de transcription, et l'activation de remodeleurs de la chromatine. Il existe 5 familles de modeleurs : Le complexe SWI/SNF, CHD, ISWI, INO80 et SWR1 (qui sont caractérisés par un domaine d'hydrolyse de l'ATP commun aux 4 familles et de séquences flanquantes qui varient pour chaque famille. On retrouve au niveau de ces remodeleurs, bromo- et de chromodomaines, qui permettent de reconnaître soit les lysines acétylées au niveau de la queue des histones et leur fixation au niveau de lysines méthylées respectivement (Taverna, Li et al. 2007). D'un point de vue

mécanistique, ces protéines utilisent l'ATP pour repositionner les nucléosomes, et ainsi moduler la transcription des gènes, par exemple lors de l'activation des LT. Par exemple il a été montré que le complexe SWI/SNF s'associe rapidement à la chromatine lors du développement des LT dans le thymus ou encore l'engagement du TCR (Zhao, Wang et al. 1998 , Chi, Wan et al. 2002, Gebuhr, Kovalev et al. 2003). Ce complexe hautement conservé dans l'évolution et on ne dénote pas loin de 15 sous-unités chez l'Homme en fonction du type cellulaire et possèdent plusieurs fonctions comme par exemple une activité de type hélicase (pour les sous-unité BRG1 et BRM), d'attachement à l'ADN (BAF205a, BAF205b et BAF200) ou encore de coactivateur comme c'est le cas pour la sous-unité SYT (Wang, Cote et al. 1996, Masliah-Planchon, Bieche et al. 2015). Ainsi ces complexes en plus de déplacer les nucléosomes pour favoriser l'accès au FT peuvent également participer activement au recrutement de certains FT ou d'autres remodeleurs de la chromatine (Wang, Xue et al. 1996 , Hassan, Neely et al. 2001, Tarakhovsky 2010).

Ainsi, compte tenu du rôle crucial des facteurs de transcription tout au long du développement et de la différenciation cellulaire et leur impact sur le remodelage de la chromatine et la transcription des gènes, nous évoquerons par la suite, l'influence des facteurs de transcription dans le développement, l'activation et la différenciation des lymphocytes T CD4.

2. Le développement lymphocytaire T.

Le développement des Lymphocytes T s'effectue dans le thymus à partir d'un réservoir de cellules pluripotentes qui possèdent des propriétés d'auto-renouvellement permettant de reconstituer le stock de cellules immunitaires tout au long de notre vie. Elles proviennent de cellules souches hématopoïétiques (CSH) qui se trouvent dans des niches au niveau de la moelle osseuse à l'état de quiescence. En fonction des besoins en cellules hématopoïétiques ou en condition de stress, les CSH vont progressivement entamer leurs différenciations, ce qui va se traduire par une perte progressive de la capacité d'auto-renouvellement et une orientation vers le lignage hématopoïétique. Ce processus est hautement hiérarchisé : une fois la différenciation engagée, la CSH va dans un premier temps devenir une CSH à longue durée de vie (LT-HSC) et va entamer sa migration vers le thymus *via* la voie sanguine. Elle va

ensuite effectuer une première division cellulaire pour donner naissance à deux cellules filles : une LT-HSC et une « ST-HSC » (Pour Short Term Hematopoietic Stem Cell) qui se différenciera plus tard en progéniteur multipotent (MPP).

Ces deux dernières, peuvent se différencier en cellules du système immunitaire mais n'ont plus de capacités d'auto-renouvellement. La perte de pluripotence s'accompagne de modifications dans le profil d'expression de facteurs de transcription qui vont séquentiellement activer et réprimer des gènes clés pour la génération de lignages T grâce à la différenciation du MPP en LMPP (Lymphoid Primed Multipotent Progenitor) et non-T.

3. De l'ETP aux précurseurs des lymphocytes T CD4 et CD8.

Le développement du lignage T s'effectue à partir d'une cellule ETP (Early T-cell-lineage Progenitor), qui provient de cellules LMPP émigrantes dans le thymus. Ces cellules sont caractérisées par l'expression de SCA-1, c-Kit et FLT3 et du récepteur aux chimiokines CCR9 qui lui permet de migrer dans le thymus au niveau de la jonction cortico-médullaire. Ces ETPs vont alors passer vers un stade « Double Négatif » (DN), stade où elles n'expriment pas les corécepteurs CD4/CD8. Le stade DN peut être subdivisé en quatre stades qui se déroulent dans le cortex thymique : le stade DN1 (CD44⁺ CD25⁻), DN2 (CD44⁺ CD25⁺), DN3 (CD44⁻ CD25⁺), DN4 (CD44⁻ CD25⁻) pour finalement arriver au stade Double Positif (DP) qui sera marqué par l'expression des deux corécepteurs du TCR, CD4 et CD8 (**Figure3**).

De façon importante, la perte de pluripotence n'apparaît réellement qu'après la transition DN2-DN3 puisqu'au stade DN2a et DN2b, les progéniteurs peuvent se différencier en monocytes, cellules dendritiques et mastocytes (stade ETP/DN2a) ou aux NK et LT $\gamma\delta$ (stade DN2b).

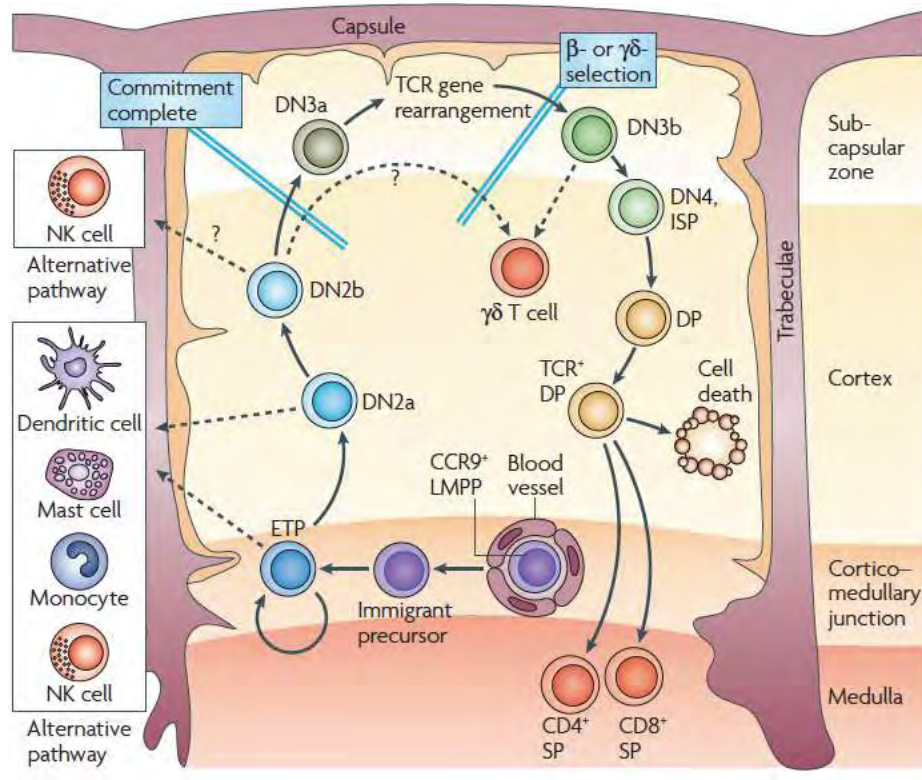


Figure 3 - Développement thymique des lymphocytes T. Les différentes étapes de la sélection thymique sont représentées sur ce schéma. Les LMPPs rentrent dans le thymus par voie sanguine grâce à l'expression de CCR9. Ces LMPP vont se différencier en ETP puis subir différentes étapes de maturation dans le cortex. Entre le stade ETP et DN2, les cellules expriment la chaîne β du TCR. Au stade DN3 se déroule la sélection β grâce à l'expression du pré-TCR α du TCR permettant de vérifier la fonctionnalité de la chaîne β du TCR réarrangée. Si un signal peut être transmis via le pré-TCR, les cellules sont sélectionnées et passent au stade ISP puis DN4. C'est au stade DP que va s'effectuer une première sélection de LT qui ont un TCR fonctionnel, et dans la médulla va se dérouler la sélection négative, ou élimination des cellules auto-réactives. (Ronthenberg et al., nri 2008)

C'est durant la transition DN-DP que sont observés les changements majeurs dans l'expression des gènes caractéristiques du lignage T. Parmi les FT essentiels pour le choix du lignage T, la voie Notch est la plus décrite. En effet, beaucoup de gènes cibles des lymphocytes T sont activés par la voie Notch1 comme par exemple *Ptcr*a et *Cd25* qui codent respectivement pour la pré-chaîne alpha du TCR et la chaîne alpha du récepteur à l'IL-2 qui sont nécessaires pour le passage du stade DN2 à DN3 et au stade DP (Deftos and Bevan 2000). Même si la surexpression de Notch1 est capable d'induire le développement ectopique des lymphocytes T, cette voie n'agit pas seule (Robey, Chang et al. 1996, Pui, Allman et al. 1999). En effet, d'autres FT ont été découverts et coopèrent avec la voie Notch pour soutenir le programme de différenciation des lymphocytes T (**Figure 4**). Lors de la transition ETP-DN2, deux FT apparaissent indispensables : TCF1 et GFI1 (Yucel, Karsunky et al. 2003). TCF1 va

se fixer au niveau de régions régulatrices de *Cd3g* et *Cd3e* et induire leur expression (*Cd3g* et *Cd3e* codent respectivement pour les chaînes γ et ϵ , qui en association avec la chaîne ζ et le récepteurs α/β du TCR, forment le complexe TCR-CD3), alors que GFI1 va quant à lui inhiber l'expression des protéines ID1 et ID2 permettant ainsi la transition ETP-DN2. Entre le stade DN2 et DN3, on assiste à une prolifération accrue de thymocytes grâce à la production d'IL-7 et de SCF par les cTECs. De plus, l'expression des enzymes RAG (RAG1 et RAG2) est initiée et ce, de façon Notch1-RBPJ dépendante.

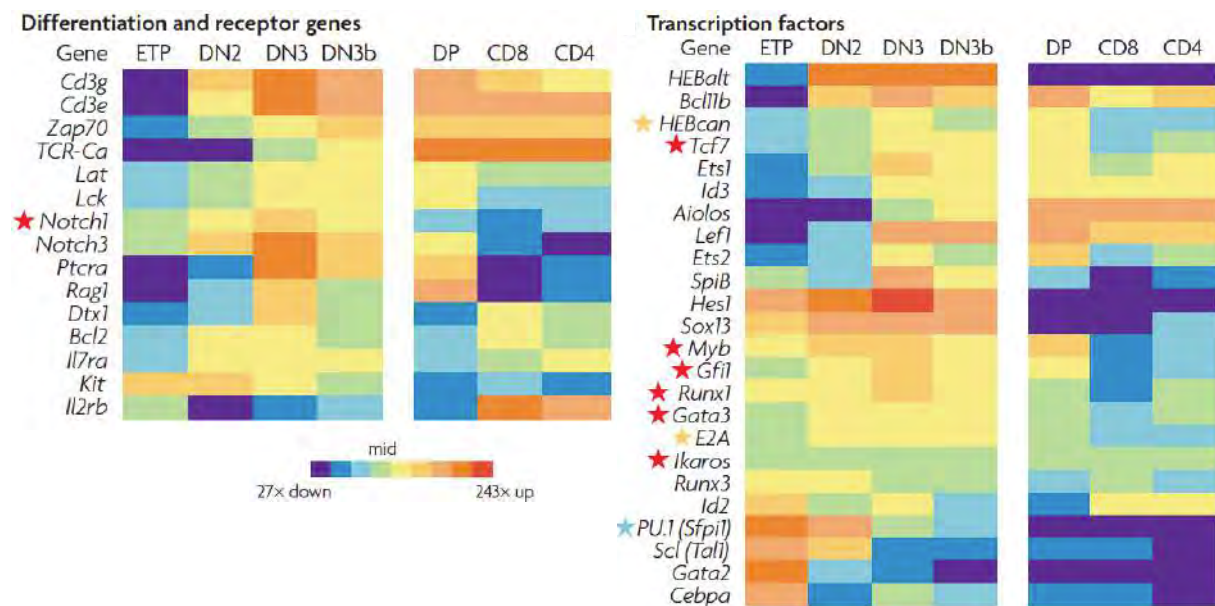


Figure 4 - Profil d'expression de différents gènes impliqués dans le développement et la sélection du lignage T en fonction des différents stades de différenciation. « Heatmap » représentant le niveau d'expression de récepteurs et FT impliqués dans le développement des LT dans le Thymus et comparaison du niveau d'expression de ces gènes durant les différents stades de différenciation des thymocytes. Les étoiles rouges représentent les gènes essentiels au développement des lymphocytes T, les étoiles orange les gènes qui ont des rôles partiellement redondants et l'étoile bleue, PU.1, un gène qui en fonction du stade auquel il est exprimé joue un rôle activateur ou répresseur du lignage T. L'expression des ARNm a été normalisée par rapport à l'expression du gène de la β -actin (Rothenberg et al., nri 2008)

L'expression de RAG va permettre le réarrangement des gènes codant pour les différents segments des chaînes β , γ et δ du TCR (Mombaerts, Iacomini et al. 1992, Shinkai, Rathbun et al. 1992). Une fois ce processus engagé, la cellule est définitivement engagée vers le lignage T. Le complexe RAG1-RAG2 va permettre, par des mécanismes de cassures et ligatures d'ADN, la recombinaison des fragments V, D et J de la chaîne β , γ ou δ du TCR. Cette étape va générer de façon aléatoire environ 10^{18} TCR grâce aux mécanismes de diversité combinatoire (assemblage aléatoire

des segments V, D et J) et aux mécanismes de diversité jonctionnelle (ajout aléatoire de nucléotides par la TdT pour coller des différents segments) (Cabaniols, Fazilleau et al. 2001, Naito, Tanaka et al. 2011). Durant cette étape, la prolifération est fortement diminuée grâce aux FT E2A et HEB. Ces facteurs vont activer l'expression des gènes SOCS1 et SOCS3 qui vont agir négativement sur la signalisation médiée par l'IL-7/IL-7R. En parallèle ils vont activer des gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire comme *Cdk6* (Schwartz, Engel et al. 2006, Wojciechowski, Lai et al. 2007).

Une fois cette étape complétée, la chaîne β du TCR est adressée à la membrane et s'assemble avec la pré-chaîne invariante α du TCR (pT α) qui va permettre la β -sélection : c'est-à-dire conserver uniquement les thymocytes qui ont un TCR capable de signaler, les LT non sélectionnés mourront par apoptose. Les cellules DN3 qui ont passé la sélection- β vont alors réprimer l'expression des enzymes RAG1/2 afin d'éviter que le deuxième allèle du TCR β se réarrange, puis la cellule va passer au stade DN4-iSP (pour Simple Positif immature) puis au stade DP. Durant cette étape, les cellules vont exprimer à leur surface le corécepteur CD8 mais pas CD4, puis vont passer au stade DP où ils vont exprimer à la fois les corécepteurs CD4 et CD8. L'expression des enzymes RAG1/2 va durant cette transition ré-augmenter afin d'initier le réarrangement des segments V et J de la chaîne α du TCR. Le processus de réarrangement de la chaîne α est le même que pour la chaîne β à l'exception du fait que les 2 allèles des gènes du TCR α peuvent subir un réarrangement de leurs segments V et J permettant ainsi d'augmenter les chances/probabilités que les thymocytes aient au moins un TCR α/β fonctionnel (Heath and Miller 1993, Padovan, Casorati et al. 1993). Ce phénomène de réarrangement de deux TCR fonctionnels survient à une fréquence supérieure à 50% dans les thymocytes et favoriserait le développement de maladies auto-immunes (Hardardottir, Baron et al. 1995, Alam and Gascoigne 1998). Une fois passés au stade DP, les thymocytes vont choisir le lignage CD4 ou CD8.

3.1. Facteurs responsables du choix du lignage lymphocytaire T CD4 ou CD8 dans le thymus.

L'interaction dans le cortex thymique entre les thymocytes DP et les cTECs va induire la sélection positive des cellules DP ainsi que le choix du lignage CD4 ou CD8. La sélection positive permet de sélectionner tout thymocyte ayant correctement réarrangé

son TCR c'est-à-dire, capable d'induire une signalisation lorsqu'il interagit avec un complexe CMH-peptide exprimé à la surface des cTECs. Ce processus est néanmoins finement régulé car le TCR doit avoir une avidité suffisante mais pas trop importante pour le complexe CMH-peptide. En effet, si l'interaction est inexistante ou trop faible, les thymocytes mourront par négligence au bout de quelques jours, et si le signal induit est trop fort, les thymocytes seront éliminés par AICD (Activation-Induced Cell Death) lors de la sélection négative qui sera discutée plus tard. Les thymocytes sélectionnés positivement vont ensuite subir un choix de lignage pour aboutir à la formation de deux populations : les lymphocytes T CD4 (LT CD4) et les lymphocytes T CD8 (LT CD8). Plusieurs modèles ont été proposés quant à l'aboutissement du choix de lignage. Le premier est que l'engagement du TCR avec un des deux corécepteurs va instruire les thymocytes et le choix du lignage (modèle instructif) : l'interaction du TCR/CD4 avec un complexe CMH-II-peptide donnera des LT CD4 tandis qu'une interaction TCR/CD8 avec un complexe CMH-I-peptide donnera des LT CD8 (Borgulya, Kishi et al. 1991, Robey, Fowlkes et al. 1991). Le second modèle proposé est le modèle sélectif, qui lui, propose que le choix du lignage soit indépendant des signaux induits lors de l'interaction du TCR avec le complexe CMH-peptide (Baron, Hafen et al. 1994, Itano, Kioussis et al. 1994). Ces deux modèles, bien qu'intéressants, restent assez difficiles à démontrer, et récemment, un nouveau modèle a été proposé : c'est la force du signal du TCR qui va déterminer le choix du lignage.

3.2. Sélection positive : importance du contrôle de l'expression des gènes *CD4* et *CD8*.

L'expression des corécepteurs CD4 et CD8 est finement régulée par des éléments cis-régulateurs et/ou répresseurs situés à proximité de leurs gènes respectifs. Ces gènes sont activés dans les thymocytes au stade DP et leur expression doit être soit maintenue soit réprimée en fonction du choix de lignage. Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires régulant l'expression de ces corécepteurs, les zones de régulations du gène *Cd4* et du locus *Cd8* (comprenant les gènes *CD8B* et *CD8A*) ont été mutées (Ellmeier, Sunshine et al. 1997, Ellmeier, Sunshine et al. 1998). Ces mutations ont permis l'identification de plusieurs zones « enhancer » et d'une zone « silencer » au niveau du gène *Cd4* et d'au moins cinq zones « enhancer » au niveau du locus *Cd8* (Sawada and Littman 1991, Siu, Wurster et al. 1994, Kioussis and

Ellmeier 2002). La zone « silencing » de *Cd4* a été la plus étudiée car elle joue un rôle crucial dans le confinement de l'expression de CD4 par les lymphocytes T CD4, alors que les « enhancer » de *Cd4* sont actifs à la fois dans les LT CD4 et les LT CD8 (Sawada and Littman 1991). Cette zone répressive est activement réprimée dans les CD8 et les thymocytes DN par plusieurs FT : le complexe MYB/HES1, SAF (Kim and Siu 1999) et surtout les protéines de type RUNX (Taniuchi, Osato et al. 2002) (**Figure 5**). En effet, RUNX1 et RUNX3 ont des rôles redondants mais spécifiques pour chaque type cellulaire dans la répression de *Cd4*. En effet, la délétion de RUNX3, mais pas de RUNX1 dans les DP induit l'expression de CD4 par les LT CD8 sortant du thymus alors que la délétion de RUNX1 mais pas de RUNX3 induit l'expression de CD4 dans les thymocytes DN (Taniuchi, Osato et al. 2002). En plus de leurs rôles répresseurs dans les CD4 SP, les protéines RUNX pourraient également être impliquées dans la différenciation des thymocytes vers le lignage CD8 et ce *via* une voie de signalisation dépendante de l'IL-7, une cytokine essentielle pour la survie des LT CD8 (Woolf, Xiao et al. 2003, Yu, Erman et al. 2003). Dans les LT CD8 périphériques, RUNX3 se fixe sur un enhancer de *Cd8* pour promouvoir son expression (Sato, Ohno et al. 2005).

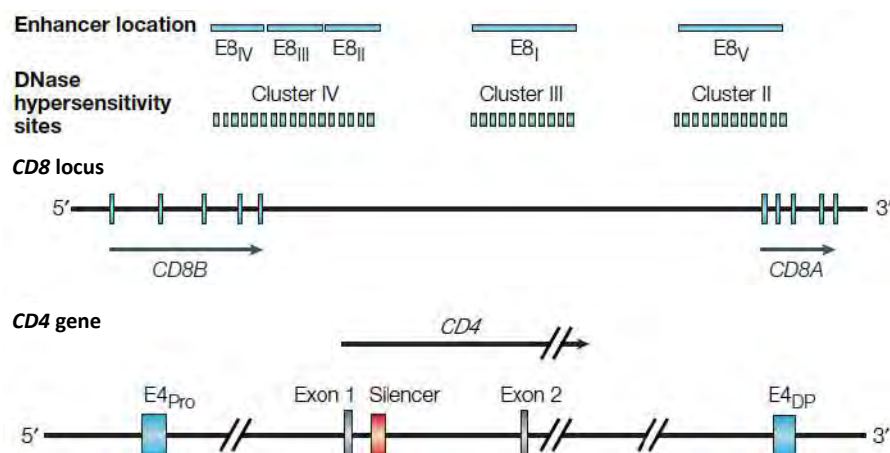


Figure 5 - Représentation schématique des éléments cis-régulateurs de l'expression des gènes *CD4* et *CD8*. (A) Les régions régulant l'expression du locus *CD8* (E8_I à E8_V) sont représentées en bleu et les zones sensibles à la DNase I sont représentées en vert. (B) Pour la région codant pour *CD4* est représentée en plus une zone de « silencing » en rouge située entre l'exon 1 et l'exon 2 de *CD4*. (Adapté de Bosselut, nri 2004)

Si les protéines de type RUNX sont les actrices majeures de l'inhibition de la différenciation CD4, ThPOK et GATA-3, quant à elles, jouent le rôle inverse. En effet, GATA-3 est un FT appartenant à la famille des FT à doigts de zinc qui joue elle-même un rôle important lors du développement des thymocytes. Son expression augmente

progressivement au cours de la maturation des thymocytes : il est très peu exprimé dans les DN et son expression augmente dans les CD4 SP et les thymocytes qui viennent de s'orienter dans le lignage T CD4 ($CD4^+CD8^{low}$) (Hernandez-Hoyos, Anderson et al. 2003). De plus, la surexpression de GATA-3 module positivement la proportion de CD4 SP dans le thymus tandis que sa répression inhibe la différenciation des LT CD4 suggérant ainsi que GATA-3 est un FT clé dans la différenciation CD4 (Pai, Truitt et al. 2003). En plus de GATA-3, ThPOK, un autre FT à doigts de zinc est lui aussi nécessaire pour l'orientation des thymocytes vers le lignage CD4. L'implication de ce FT a été découverte dans une souche de souris présentant une mutation spontanée donnant lieu à une absence de LT CD4 périphériques. Cette mutation dans l'un des domaines à doigt de zinc de la protéine empêche l'interaction de ThPOK avec sa séquence cible 5'-CCCTCCC-3' et donc le développement des LT CD4 (Dave, Allman et al. 1998, He, He et al. 2005). L'expression de ThPOK dans le thymus est également très contrôlée : ThPOK est fortement exprimé dans les CD4 SP mais est absent au stade DN, DP et CD8 SP, suggérant alors que ce FT est exprimé suite à l'engagement CMH-II-peptide. De façon intéressante, il a été montré que les thymocytes GATA-3KO n'expriment plus Th-POK et que, GATA-3 se fixe au niveau de régions régulatrices à proximité du locus de *Thpok* pour induire son expression (Wang, Wildt et al. 2008). Néanmoins, ThPOK lui-même n'est pas capable d'induire l'expression des gènes spécifiques du lignage LT CD4 mais permet plutôt d'inhiber le lignage CD8. En effet, ThPOK à lui seul n'est pas suffisant pour induire l'expression adéquate de CD4, cependant il inhibe l'expression de CD8 ainsi que l'action de RUNX3 qui lui, est directement responsable de la répression de CD4. Enfin, deux autres FT participent également au développement du lignage T CD4, il s'agit de TOX et de Myb, qui sont impliqués dans la régulation de l'expression de GATA-3 dans les thymocytes (Wang and Bosselut 2009). L'ensemble des voies régulant le lignage CD4-CD8 est représenté ci-dessous (**Figure 6**).

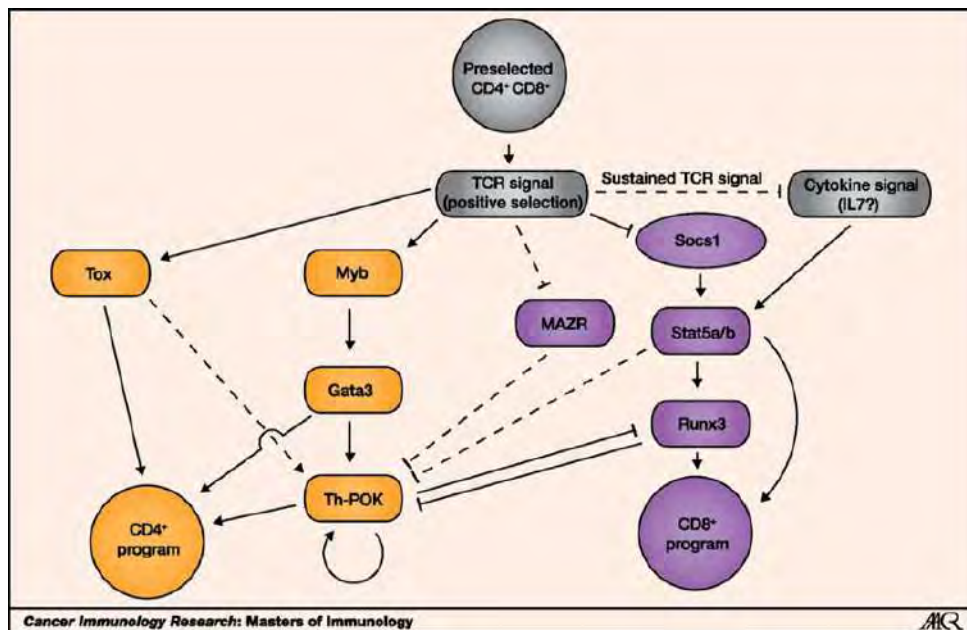


Figure 6 - Choix du lignage CD4⁺/CD8⁺ et FT associés au choix de lignage. Après avoir été sélectionnés positivement, les thymocytes DP vont subir une étape de choix de lignage qui est hautement dépendant de l'intensité du signal du TCR et de sa durée. Ce signal TCR va conduire à l'expression des facteurs de transcription TOX, GATA3 et Th-POK pour les CD4 et des FT STATs et RUNXs qui vont eux guider le lignage CD8. En plus de cette orientation des lignages, certains FT comme Th-POK et RUNX3 vont s'inhiber mutuellement pour empêcher la différenciation du lignage opposé et sceller la différenciation CD4 ou CD8 SP (Harald von Boehmer 2014 cancer immunology research)

Dès lors, une question reste toujours en suspens : si les FT énoncés précédemment n'initient pas le choix du lignage mais au contraire inhibent la différenciation du lignage opposé, quel est l'élément déclencheur du choix de lignage ? De nombreux éléments pointent vers la force du signal TCR comme élément déclencheur du choix CD4 SP vs CD8 SP (Seong, Chamberlain et al. 1992, Itano, Salmon et al. 1996). Cette observation vient du fait que la signalisation induite lors de l'engagement du TCR avec le co-récepteur CD4 n'induit pas la même force du signal que lorsque c'est le corécepteur CD8 qui est engagé. Ce phénomène est dû au fait que la tyrosine kinase LCK a une affinité plus forte pour la molécule CD4 que pour la molécule CD8. En plus de l'intensité du signal TCR, la durée de signalisation joue également un rôle prépondérant, puisqu'un signal TCR de faible durée oriente préférentiellement les thymocytes vers le lignage CD8 alors qu'un signal de forte intensité et de durée prolongée donnera plutôt des CD4. Cette observation est associée au fait qu'un signal TCR de longue durée induit l'arrêt de transcription de CD8 mais pas de CD4. Ainsi, lors de la sélection positive, on assiste dans un premier temps à l'apparition d'une population CD4⁺CD8^{faible}.

Cette population se différenciera en CD4 SP grâce à l'expression des FT GATA-3, ThPOK, TOX et Myb, si le signal TCR est prolongé et de forte intensité. Par contre, si le signal TCR est interrompu ou de trop faible intensité, l'expression de RUNX3 sera alors dé-réprimée et orientera la cellule $CD4^+CD8^{\text{faible}}$ vers le lignage CD8. Il a été montré *in vitro*, qu'en plus de l'intensité du signal du TCR et de sa durée, l'IL-7 en se fixant sur son récepteur (IL-7R) permet d'augmenter l'expression de RUNX3 et donc, de faire pencher la balance vers le lignage CD8 (Yu, Erman et al. 2003). En conclusion l'orientation du lignage T CD4 ou CD8 est un processus finement régulé par l'action combinée et séquentielle de FT clefs qui s'expriment sous l'influence de signaux reçus par les thymocytes et l'action du microenvironnement qui va déterminer le devenir du thymocyte (**Figure 7**).

Néanmoins, une autre étape de sélection est nécessaire avant que les LT naïfs puissent rejoindre la périphérie : il s'agit de la sélection négative

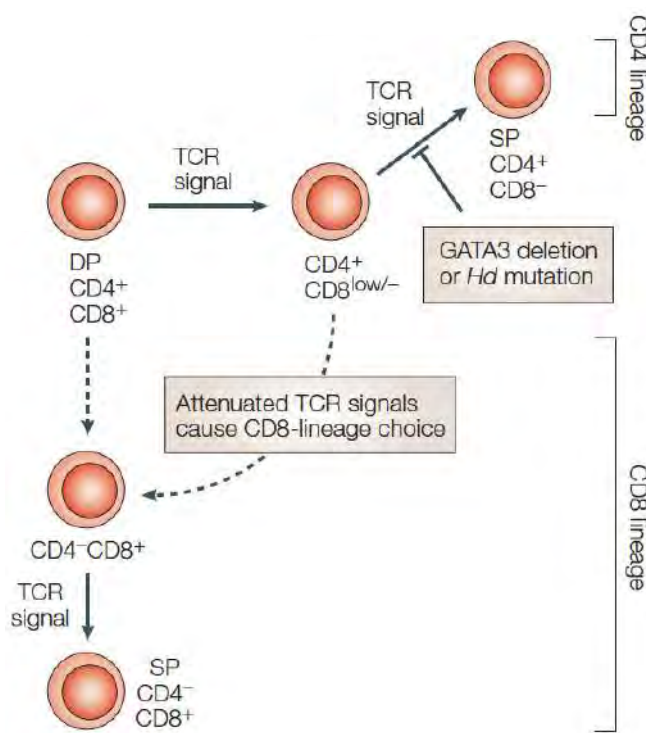


Figure 7 - La force du signal TCR, un argument faisant pencher la balance CD4/CD8 SP. Les thymocytes DP vont pouvoir, en fonction de leurs interactions avec les cellules présentatrices d'antigènes, se différencier en LT SP CD4 ou CD8. Une interaction de forte intensité et de durée entre le CMH-II-TCR couplée à l'engagement de la molécule CD4 va déterminer le choix du lignage CD4 SP, alors qu'une perte/interruption de signal ou un signal de faible intensité donnera lieu au lignage CD8.

3.3. Sélection négative et sortie du thymus des lymphocytes T naïfs

Une fois le choix de lignage effectué dans le cortex thymique, les LT SP CD4 et CD8 expriment le récepteur au chimiokine CCR7 qui va permettre leur migration au niveau de la médulla thymique. Cette migration est possible grâce à la sécrétion de

CCL19/CCL21 par les mTECs. Les mTECs jouent un rôle majeur dans la sélection négative. En effet, suite à la sélection positive, beaucoup de LT auto-réactifs, c'est-à-dire capables de reconnaître des antigènes exprimés par les cellules du soi, sont présents et doivent être éliminés afin d'éviter la mise en place de réactions auto-immunes. Une des propriétés uniques de ce type cellulaire réside dans l'expression des FT AIRE (AutoImmune REgulator) et Fezf2 (Forebrain Embryonic Zinc Finger-Like Protein 2) qui permettent aux mTECs de produire des antigènes exogènes (également appelés antigènes spécifiques des tissus ou TSA) qui vont être présentés aux LT CD4 et CD8 (Finnish-German 1997, Nagamine, Peterson et al. 1997, Takaba, Morishita et al. 2015). Ainsi, si un LT est capable d'engager son TCR au contact de ces antigènes et que le signal induit est trop soutenu, il sera éliminé par apoptose, ou sera rendu anergique (Gallegos and Bevan 2004).

En plus des mTECs, les DCs résidentes ou migratoires présentes dans la médulla thymique participent à la sélection négative. Ces DCs n'expriment pas AIRE mais peuvent quand même présenter des TSA aux LT. En effet, il a été montré que les DCs résidentes du thymus sont capables de présenter des TSA issus des mTECs par cross-présentation unidirectionnelle. Ce dernier mécanisme pourrait être dû à un phénomène de trogocytose (échange de membrane entre les DC et les mTECs) ou par clairance de corps apoptotiques de mTECs par les DC et recyclages des antigènes. Même si AIRE permet d'exprimer pas moins de 4000 antigènes exogènes dans le thymus, ce mécanisme n'est pas parfait. Certains antigènes ne sont pas présents et pourraient permettre à des LT auto-réactifs d'échapper à la sélection négative. Il a été montré que certains antigènes exogènes pouvaient rejoindre la médulla thymique via le réseau sanguin et également que certaines DC sont capables de migrer de la périphérie vers le thymus et de transférer leurs antigènes aux DCs résidentes afin qu'elles puissent induire l'apoptose des LT spécifiques de peptides du soi (Bonasio, Scimone et al. 2006, Koble and Kyewski 2009, Hinterberger, Aichinger et al. 2010, Hadeiba and Butcher 2013).

4. Activation et différenciation des lymphocytes T CD4.

Les LT ayant successivement passés les étapes de sélections positive et négative vont maintenant rejoindre la périphérie. Cette migration se fait grâce à l'expression du

récepteur à la sphingosine-1 phosphate (S1P₁) à la surface des LT SP et d'un gradient de S1P produit par les péricytes et certaines cellules hématopoïétiques présentes dans le flux sanguin (Pappu, Schwab et al. 2007). En plus de l'expression de S1P₁ à la surface des LT, il a été montré l'importance de l'intégrine CD62L et du récepteur aux chimiokines CXCR4 pour la sortie des LT naïfs du thymus. En effet l'axe CXCR4-CXCL12 va servir de chimio-répulsif et pousser les lymphocytes hors du thymus, alors que CD62L va permettre l'attachement des LT aux cellules endothéliales pour favoriser leur extravasion (Vianello, Kraft et al. 2005). De façon intéressante, CD62L et S1P₁ sont deux récepteurs qui sont régulés par un seul et unique FT critique pour le développement, la migration et la différenciation des LT dont nous reparlerons plus tard : Foxo1 (Fabre, Carrette et al. 2008, Kerdiles, Beisner et al. 2009).

Les lymphocytes T CD4 font partie de l'immunité adaptative qui, contrairement à l'immunité innée qui elle répond instantanément lors de la rencontre avec un pathogène, l'immunité adaptative, nécessite plus de temps pour se mettre en place mais présente l'avantage d'être spécifique. En effet, la mise en place d'une réponse adaptative nécessite la capture d'antigènes exogènes par les cellules de l'immunité innée et leur migration dans les organes lymphoïdes secondaires où sont stockés les LT. Pour qu'un lymphocyte T CD4 soit activé, il faut au préalable que l'antigène soit apprêté et présenté via le CMH-II par l'APC. Les LT CD4, en fonction du microenvironnement dans lequel ils se trouvent, ont la capacité de se différencier en différentes sous-populations de LT effecteurs qui permettent la mise en place d'une réponse adaptée et spécifique au type de pathogène rencontré. Étant donné que la sélection dans le thymus est un processus drastique donnant naissance à un faible nombre de LT, et que, la génération aléatoire des TCR engendre un répertoire très vaste, le nombre de LT spécifique d'un antigène donné est très faible. La mise en place d'une réponse T CD4 nécessite donc une phase d'expansion clonale permettant de générer une population lymphocytaire conséquente à partir d'un ou plusieurs clones spécifiques de l'antigène afin de monter une réponse adaptative de qualité. Ainsi les premières études décrivaient l'existence de deux sous-populations distinctes de LT CD4 les Th1 et Th2, identifiables par leurs capacités à sécréter des cytokines pro-inflammatoires différentes (Mosmann, Cherwinski et al. 1986). Plus récemment, de nouvelles sous-populations de LT CD4 se sont ajoutées au paradigme Th1/Th2 : les Th17, les Tfh, les Th9, les Treg, et les Tr1 (**Figure 8**).

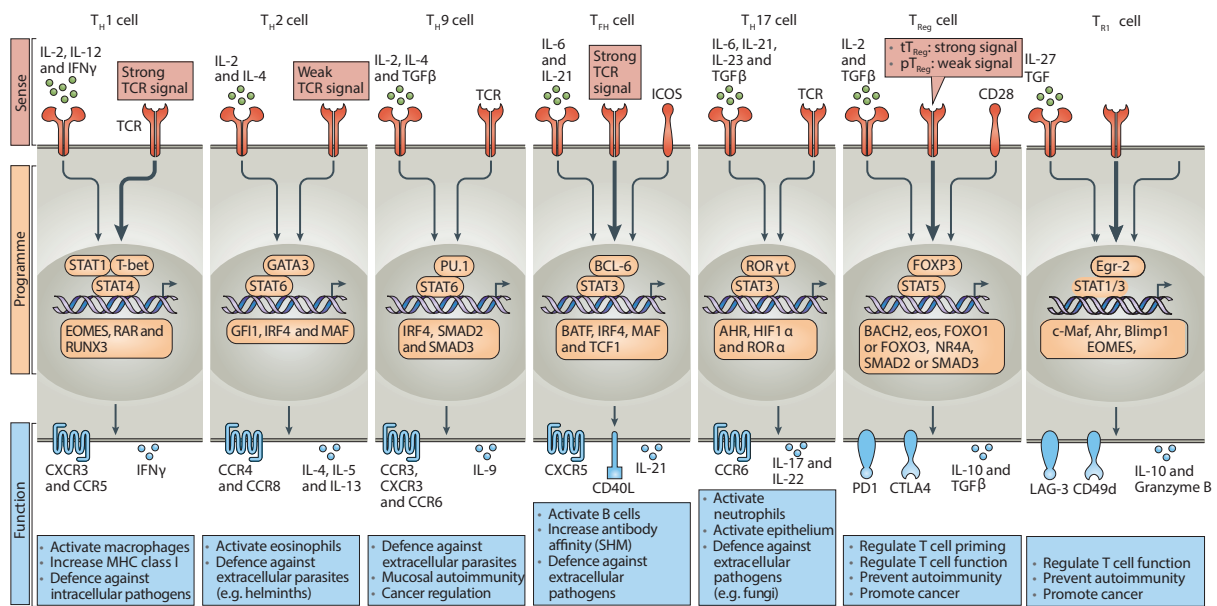


Figure 8 - Principaux sous-types de Lymphocytes T CD4 et leurs fonctions associées. Ce schéma représente les principales sous-populations de LT CD4 effecteurs et régulateurs, avec en rouge les signaux nécessaires à la polarisation de chaque sous-population, en orange, les facteurs de transcription clés pour la mise en place du programme de différenciation, et en bleu les principales cytokines produites ainsi que les fonctions effectrices de chaque type de LT CD4. *Adapté de (DuPage & Bluestone 2016 Nri)*

Ces cellules se différencient à partir d'un LT CD4 naïf en réponse à trois signaux : 1) l'interaction du TCR avec le complexe CMH-II-peptide, 2) l'engagement de molécule de co-stimulation tels que CD28 qui interagit avec B7.1 et B7.2 exprimés par les APC et enfin, 3) la présence de cytokines dans le microenvironnement qui va orienter la différenciation des LT en activant un programme génétique propre à chaque sous-population. Chaque sous-population de lymphocyte T exprime un FT de transcription clé nécessaire à la mise en place du lignage : il s'agit des « Master Regulator » que nous détaillerons pour chacune des sous-populations. Néanmoins ces FT n'agissent pas seuls et d'autres FT sont nécessaires pour renforcer et maintenir la mise en place des différents lignages.

4.1. Les Th1

Les Lymphocytes Th1 sont des acteurs majeurs de l'immunité antivirale, permettent de lutter efficacement contre les bactéries intracellulaires et sont également importants pour lutter contre les infections à protozoaires. Ces cellules sont caractérisées par la

production d'IFN- γ de TNF- α , d'IL-2 et de la LT α . *In vivo* et *in vitro* la différenciation des Th1 se fait après activation des LT CD4 naïfs par les APC et en présence de deux cytokines majeures : l'IL-12 et l'IFN- γ qui sont produites respectivement par les CPA et par les Th1 (Hsieh, Macatonia et al. 1993, Bradley, Dalton et al. 1996). En 2009, Schulz et collaborateurs ont pu mettre en évidence que la différenciation Th1 est initiée par l'engagement du TCR et la présence d'IFN- γ . En effet, suite à l'activation du TCR, les LT CD4 répriment l'expression de la chaîne β du récepteur à l'IL-12 (Boothby 2009, Schulz, Mariani et al. 2009, Lazarevic, Glimcher et al. 2013). Cette première phase va permettre l'expression du « Master regulator » T-bet par la voie du TCR et également grâce à l'IFN- γ qui va renforcer la transcription de T-bet qui induit l'expression de l'IL-12R via une voie STAT1-dépendante (Lighvani, Frucht et al. 2001, Afkarian, Sedy et al. 2002). Ce FT de la famille T-box est capable d'induire la production d'IFN- γ grâce à sa fixation au niveau de plusieurs sites T-box (5'-TCACACCT-3') présents à la fois dans le promoteur de l'*Ifng* et dans des régions conservées non codantes (CNS) situées à -54, -34, -22, -6 et +18-20 kb en amont et en aval du promoteur (Hatton, Harrington et al. 2006, Balasubramani, Shibata et al. 2010). Il est également responsable de l'induction de l'expression de l'IL12-R β , des FT RUNX3 et HLX qui sont également impliqués dans la production d'IFN- γ et du récepteur aux chimiokines CXCR3 (Lord, Rao et al. 2005, Thieu, Yu et al. 2008, Jenner, Townsend et al. 2009, Zhu, Jankovic et al. 2012).

Lorsque l'IL-12R β est ré-exprimé, l'IL-12 produite par les APC va pouvoir dans un deuxième temps se fixer sur son récepteur et induire la phosphorylation et la dimérisation des protéines STAT4, qui vont alors être transloquées au noyau et amplifier l'expression de gènes Th1 tels que l'*Ifng*, *Hlx* et *Tbx21* (Thieu, Yu et al. 2008). A lui seul, STAT4 est capable d'induire l'expression d'au moins 200 gènes différents et participe aux modifications épigénétiques de plus de 1000 gènes en recrutant au niveau de sa séquence cible 5'TTCC(G/C)GGAA-3' plusieurs DNA-méthyltransférases et des histones désacétylases (Ihle 1996, Zhang, Wang et al. 2005, Wei, Vahedi et al. 2010).

Il semblerait que l'expression de T-bet joue également un rôle crucial dans la stabilisation du lignage Th1 (**Figure 9**). Ainsi, la déficience en T-bet se traduit par une moins bonne production d'IFN- γ dans des modèles infectieux et s'accompagne d'une

augmentation de la production de cytokines de type Th2 et Th17 (Hsieh, Macatonia et al. 1993, Ravindran, Foley et al. 2005, Lazarevic, Chen et al. 2011). En effet, une des fonctions primordiales de T-bet est d'inhiber la mise en place des autres lignages T CD4. Dans les LT CD4 naïfs, GATA3, le FT caractéristique de la différenciation Th2, est déjà exprimé. De plus, le *locus Il4* (Cytokine Th2) et *Ifng* (Cytokine Th1) sont acétylés indiquant que la chromatine est permissive à la fixation des FT et à la transcription (Zheng and Flavell 1997, Avni, Lee et al. 2002).

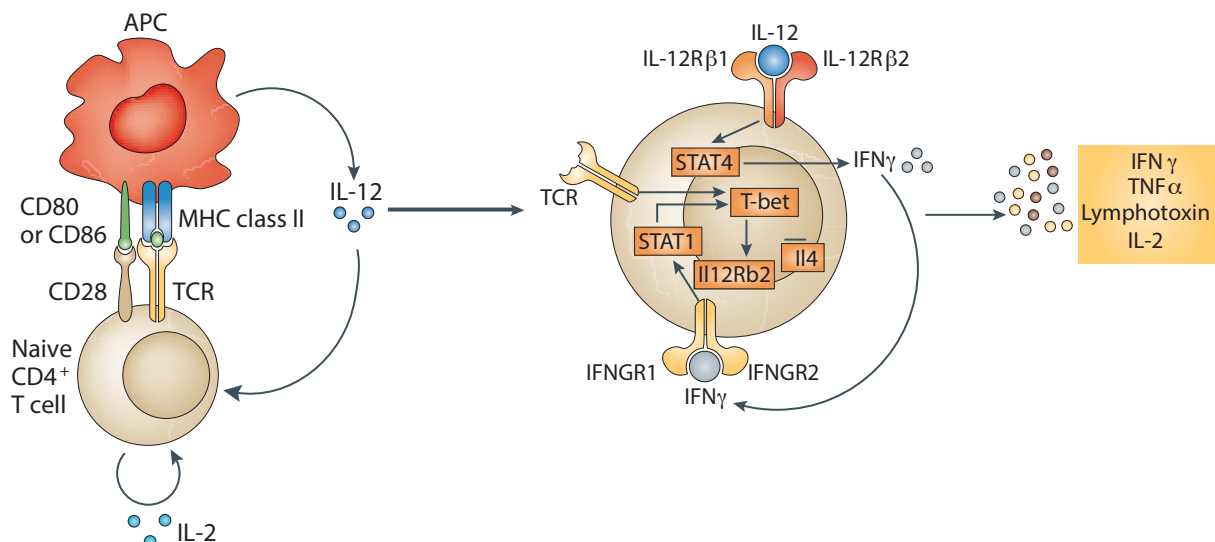


Figure 9 - Développement des LT CD4 en Th1. Les LT CD4 naïfs, peuvent, en présence d'IL-12 et lorsqu'ils sont activés par des cellules présentatrices d'antigènes, se différencier en Th1. Le signal TCR va induire l'expression de T-bet qui lui-même va induire l'expression de l'IL-12Rβ. L'IL-12 va permettre via STAT4 la production d'IFN-γ. L'IFN-γ va à son tour permettre d'amplifier l'expression de T-bet de façon STAT1 dépendante, ce qui va renforcer et verrouiller le lignage Th1. (*Adapté de Dong Nature Review Immunology 2006*)

Il semblerait donc que durant un court laps de temps, le choix du lignage soit neutre et que les FT entrent en compétition pour orienter le choix de lignage. Il a été montré que suite à l'engagement du TCR, T-bet va être phosphorylé au niveau de sa tyrosine 525 ce qui va permettre son interaction avec GATA-3 et inhiber sa fixation au niveau des locus Th2 (Hwang, Szabo et al. 2005). En plus de la séquestration de GATA-3, T-bet va également coopérer avec RUNX3 pour activer la zone répressive du gène *Il4* et va directement modifier l'accessibilité de la chromatine au niveau du locus *Gata3* pour empêcher sa transcription *de novo* (Djuretic, Levanon et al. 2007, Zhu, Jankovic et al. 2012). T-bet joue également un rôle répresseur pour la différenciation des autres sous-populations de LT CD4. Dans les Th17, c'est la phosphorylation de la tyrosine 304 de T-bet qui va séquestrer RUNX1 et l'empêcher de se fixer sur le promoteur de

ROR γ t (Wei, Wei et al. 2009, Lazarevic, Chen et al. 2011). BCL-6, tout comme GATA-3 est exprimé de manière faible dans LT suite à l'engagement du TCR et dans les Th1 en cours de différenciation. Il a été montré que T-bet pouvait s'associer à BCL-6 pour l'empêcher de se fixer sur ses gènes cibles et qu'en même temps, il allait servir de cofacteur à T-bet pour maintenir certains gènes réprimés comme *Tcf7*, *Socs1* et *Socs3* dans les Th1 (Oestreich, Huang et al. 2011).

Enfin, dans les Lymphocytes T régulateurs, T-bet induit l'expression de CXCR3, qui va permettre aux Treg de migrer au niveau de sites inflammatoires médiés par les Th1 et ainsi contrôler la magnitude de la réponse immune (Koch, Tucker-Heard et al. 2009, Tan, Mathis et al. 2016). En effet, la déficience en T-bet dans les LT CD4 Foxp3⁺ est associée à une perte des fonctions régulatrices lors d'une infection par *Toxoplasma gondii* ou lorsque l'on transfère ces Treg dans des souris Scurfy (souris présentant une mutation au niveau du gène Foxp3 et ne disposant plus de Treg) (Duhon, Duhon et al. 2012). De façon intéressante une population de Treg exprimant T-bet a également été identifiée chez l'Homme, suggérant ainsi un rôle important de cette sous-population de Treg.

4.2. Les Th2

Les Th2 jouent un rôle crucial dans les défenses antiparasitaires de type helminthes. Ces cellules sont caractérisées par la production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 et par l'expression du FT GATA-3. Tout comme dans les Th1, le programme Th2 est initié dès l'engagement du TCR en réponse aux cytokines environnantes (**Figure 10**).

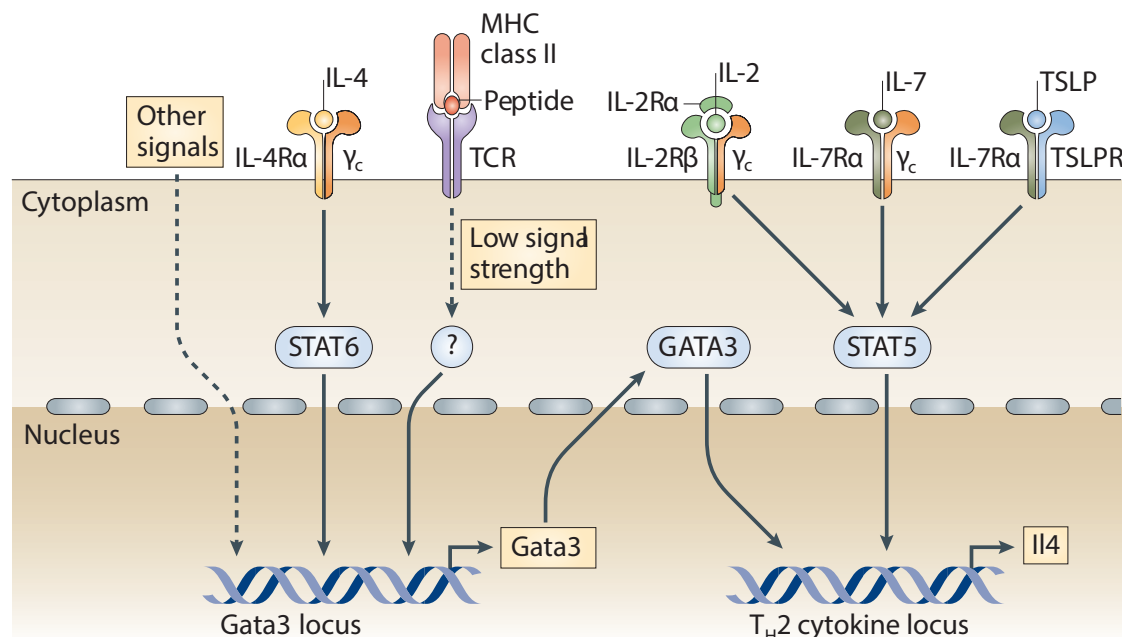


Figure 10 - Développement des LT CD4 en Th2. Les LT CD4 se différencient en Th2 en présence d'IL-4, qui *via* la voie STAT6, va permettre l'expression de GATA3. GATA3 va ensuite se fixer au niveau de certains loci (*Il4*, *Il5*, *Il13* et *Gata3*) afin d'amplifier la différenciation Th2. Au même moment, GATA3 va inhiber l'expression de l'IL-12Rβ ce qui a pour conséquence d'empêcher la différenciation Th1. GATA3 est également induit suite à un faible signal TCR et certaines cytokines comme l'IL-2, l'IL-7 et le TSLP (Thymic Stromal Lymphopoietin) qui activent la voie STAT5 et permettent la production d'IL-4. Enfin, d'autres signaux tels que les voies de l'IL-33 et l'IL-25 sont de puissants inducteurs du lignage Th2 (**W.E.Paul Nature Review Immunol 2010**)

En 1997, l'équipe de Richard Flavell a pu mettre en évidence que l'IL-4 permet l'expression de GATA-3 dans les LT et donc la différenciation Th2 (Zheng and Flavell 1997). L'IL-4, en se fixant sur son récepteur, permet d'activer la voie JAK/STAT6, qui va être transloqué au noyau, se fixer sur sa séquence cible 5'-TTCC(A/T)GGAA-3', pour activer au moins 400 gènes impliqués dans la différenciation des Th2 dont *Gata3* et *Socs1* (Ouyang, Lohning et al. 2000, Elo, Jarvenpaa et al. 2010). En plus de l'IL-4, l'IL-2, via une voie STAT5-dépendante, et le signal du TCR *via* NFAT sont eux aussi capables d'induire l'expression de GATA-3 dans les Th2. S'il semble que GATA-3 et T-bet peuvent tous les deux être induits lors d'une interaction TCR-CMH-peptide, *in vivo*, c'est la force du signal TCR et le temps d'interaction LT/DC qui va orienter l'expression préférentielle des différents FT (van Panhuys, Klauschen et al. 2014). Ainsi un peptide de faible affinité ou à faible dose orientera le LT vers un type Th2 alors qu'une forte stimulation induira un profil Th1 (Hosken, Shibuya et al. 1995, Milner, Fazilleau et al. 2010). L'expression de GATA-3 dans les Th2 va avoir plusieurs conséquences. Dans un premier temps, GATA-3 va amplifier sa propre expression par

un mécanisme IL-4/STAT6 indépendant, et ce, en se fixant directement au niveau d'éléments cis-régulateurs 5'-(A/T)GATA(A/G)-3' du locus *Gata3* (Lee, Takemoto et al. 2000, Ranganath and Murphy 2001). Cette première boucle d'amplification va permettre de stabiliser le lignage. GATA-3 va ensuite se fixer directement au niveau du promoteur de *Il5* et *Il13* et dans une région intragénique du locus *Il4* afin d'initier leur expression (Yagi, Zhu et al. 2011). GATA-3 va également servir d'inhibiteur du lignage Th1 en réprimant l'expression de *Il12rb*, *Stat4*, *Ifng* et *Eomes* en agissant soit directement par fixation au niveau de zones régulatrices de ces gènes ou par interaction avec des FT initiant la transcription du programme Th1, notamment *via* son interaction avec RUNX3 (Usui, Nishikomori et al. 2003, Yagi, Junttila et al. 2010). GATA-3, en plus d'inhiber la différenciation Th1, participe aussi au contrôle des lignages Th17 et Treg.

Les Th17 et les Treg, comme nous le verrons un peu plus tard, sont induits *via* une cytokine commune, le TGF- β , qui permet d'induire la différenciation Treg. Cependant cette cytokine, dans un contexte inflammatoire et en présence d'IL-6, va permettre la différenciation Th17 (Bettelli, Carrier et al. 2006). Le rôle de GATA-3 est de stabiliser le lignage Treg afin d'éviter qu'ils ne s'orientent pas vers le lignage Th17 dans un contexte inflammatoire. On sait maintenant que GATA-3 est nécessaire à la bonne expression du FT Foxp3 indispensable à la différenciation Treg. En effet, GATA-3 va se fixer au niveau du CNS2 du locus *Foxp3* et permettre une expression optimale de la protéine dans les Treg (Wang, Su et al. 2011, Wohlfert, Grainger et al. 2011). De plus, GATA-3 est requis pour l'expression du récepteur à l'IL-7 et pour limiter la production d'IL-17 par les Treg dans un contexte inflammatoire. Enfin, il semblerait que GATA-3 soit capable d'inhiber directement la différenciation Th17 étant donné que GATA-3 peut se fixer au niveau des loci *Il17* et *Rorc* (Wei, Abraham et al. 2011, Wohlfert, Grainger et al. 2011).

4.3. Les Th17

Quelques années après la découverte des Th1 et Th2, une nouvelle sous-population de LT a été découverte : les Th17 (Park, Li et al. 2005). Cette sous-population a été nommée ainsi car elle produit de l'IL-17A et IL-17F, mais peut également produire de l'IL-21 et de l'IL-22. Cette population joue un rôle dans la lutte contre les infections par

des bactéries extracellulaires ou des agents fongiques. La découverte de ce lignage fut possible en étudiant le rôle des Th1 dans le développement des maladies auto-immunes. En effet, dans la Polyarthrite Rhumatoïde (RA) et dans la Sclérose en Plaques (SEP), les Th1 ont très vite été identifiés comme une population pathogène de par leur présence élevée. Dès lors, l'étude de modèles animaux invalidant les principaux médiateurs influençant leur différenciation, à savoir l'IFN- γ , l'IL-12 et STAT1, ont révélé certains paradoxes (Ferber, Brocke et al. 1996, Bettelli, Sullivan et al. 2004, Kebir, Ifergan et al. 2009, Hirota, Duarte et al. 2011).

Dans le modèle de l'Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale (EAE), le modèle murin de SEP, les souris invalidées pour les différentes sous-unités de l'IL-12 présentent des phénotypes opposés. Alors que l'invalidation de la sous-unité p40 de l'IL-12 protège totalement les souris de l'EAE, l'invalidation de la deuxième sous-unité p35, rend les souris plus susceptibles (Oppmann, Lesley et al. 2000, Langrish, Chen et al. 2005). Cette observation permettra d'identifier une nouvelle cytokine, l'IL-23. L'IL-23 et l'IL-12 partagent la même sous-unité p35 mais, contrairement à l'IL-12 qui promeut la différenciation Th1, l'IL-23 quant à elle, permet la production d'IL-17 par une certaine population de LT CD4 : les Th17 (Park, Li et al. 2005).

Tout comme les Th1 et les Th2, la différenciation Th17 nécessite une combinaison de plusieurs cytokines qui va permettre d'induire l'expression du « Master regulator » ROR γ t. Les Th17 peuvent être induits par le TGF- β en association avec l'IL-6, l'IL-21 et l'IL-23 qui signalent respectivement via la voie Smad pour le TGF- β et STAT3 pour l'IL-21, l'IL-6 et l'IL-23. Dans un premier temps, la signalisation IL6/IL6R va entraîner la phosphorylation et la translocation de STAT3 dans le noyau ce qui va permettre la transcription de nombreux gènes dont *Rorc*, *Rora*, *Il17a*, *Il17f*, *Il21*, *Il23r*, *Ahr*, *Irf4*, *Batf* et *Maf* (Durant, Watford et al. 2010, O'Shea, Lahesmaa et al. 2011). L'IL-21 produite va permettre d'amplifier de façon autocrine le lignage Th17 et d'accentuer l'expression de l'IL-23R, celui-ci n'étant pas exprimé à l'état naïf dans les LT CD4. L'axe IL-23/IL23R n'agit qu'en tant que stabilisateur du lignage. ROR γ T et ROR α vont quant à eux participer à la transcription de l'IL-17 (majoritairement l'IL-17F) en se fixant sur de nombreux sites de fixation au niveau du locus ROR (5'-AGGTCA-3') (Ciofani, Madar et al. 2012). Le microenvironnement semble jouer un rôle primordial dans la différenciation Th17 via l'intervention de différents FT tels que AhR ou HIF1 α . En effet,

il a été montré que des métabolites du tryptophane et certaines toxines peuvent être perçus par l'Ahr et participer au développement des Th17 puisque les animaux déficients pour Ahr présentent une EAE moins sévère. De plus, il a également été montré qu'un milieu hypoxique oriente la différenciation Th17 au détriment de la différenciation Treg grâce à l'induction d'IL-6 dépendant d'HIF1 α (Dang, Barbi et al. 2011, Wang, Flach et al. 2014). Dans des conditions de normoxie, le FT HIF1 α est adressé au protéasome pour qu'il y soit dégradé, alors qu'en conditions d'hypoxie on assiste à une accumulation d'HIF1 α . HIF1 α va alors permettre d'induire la transcription de *Rorc* mais va également s'associer avec le FT Foxp3 afin d'assurer son adressage au protéasome et sa dégradation. De ce fait, l'hypoxie et l'environnement dans lequel se trouve le LT CD4 vont favoriser la différenciation Th17 (Pan, Barbi et al. 2012).

4.4. Les Treg

Contrairement aux autres sous-populations de LT précédemment décrites, les LT régulateurs ou Treg, jouent un rôle essentiel dans le contrôle des réponses immunitaires et dans le contrôle des LT auto-réactifs qui auraient pu échapper aux mécanismes de tolérance centrale. Il existe deux types de Treg : les Treg générés dans le thymus (tTreg) et les Treg dits « extrathymique » (pTreg ou iTreg s'ils sont induits *in vitro*) qui se différencient à la périphérie pour limiter ou arrêter l'inflammation. Ces cellules sécrètent majoritairement des cytokines anti-inflammatoires et sont caractérisées par l'expression du FT Foxp3. Foxp3 pour « Forkhead Box Protein 3 » est le FT nécessaire à la différenciation des LT en Treg. En effet, il a été montré que les souris Scurfy qui présentent une mutation non-sens dans le gène *Foxp3* situé sur le chromosome X, crée une forme tronquée et non fonctionnelle de la protéine (Brunkow, Jeffery et al. 2001). La conséquence de cette mutation est un défaut de différenciation des Treg qui ne sont alors plus capables d'inhiber les LT effecteurs et, semble également associée à une production de cytokines pro-inflammatoires. Une maladie similaire à celle retrouvée chez la souris est également observée chez l'Homme, il s'agit du syndrome IPEX pour « Immunodysregulation Poly Endocrinopathy X-linked » (Bennett, Brunkow et al. 2001). Chez ces patients, dès leur plus jeune âge, se développe un grand nombre de désordres immunitaires comme des

dermatites, entéropathies, un diabète, des problèmes thyroïdiens etc... (Bennett, Christie et al. 2001).

Dans les Treg, Foxp3 régule à lui seul plus de 3000 gènes impliqués de façon plus ou moins importante dans la différenciation du lignage et de façon intéressante seulement 10% de ces gènes sont des cibles directes de Foxp3, le reste se faisant par association avec des cofacteurs (Zheng, Josefowicz et al. 2007). De plus, bien qu'il soit capable d'activer l'expression d'un grand nombre de gènes, Foxp3 joue également un rôle répresseur en séquestrant certains cofacteurs ou via des modifications épigénétiques. Par exemple, Foxp3 va activer l'expression du récepteur GITR, CD25 ou CTLA4 grâce au recrutement d'histones acétyl-transférases (HAT) au niveau des promoteurs (Chen, Rowell et al. 2006, Rudra, deRoos et al. 2012). Au contraire, en association avec son co-facteur EOS, Foxp3 va induire la répression des gènes *Il2* et *Ifng* via le recrutement de l'histone-lysine N-méthyl transférase EHMT2 (Pan, Yu et al. 2009). Cette Histone Méthyl Transférase (HMT) va inhiber l'acétylation de l'histone H3 et H4 et induire la méthylation de l'histone H3 sur sa lysine9 (H3K9) et la méthylation des îlots CpG au niveau du promoteur *Il2*, induisant ainsi sa répression génique. L'expression de Foxp3 n'étant pas détectée dans les LT CD4 naïfs, des études ont donc logiquement cherché à comprendre quels étaient les signaux capables d'induire son expression.

Dans le thymus, les tTreg sont induits en quasi-totalité dans la médulla ou au niveau de la jonction cortico-médullaire après engagement du TCR avec un complexe CMH-II-peptide du soi présenté par les mTECs (Jordan, Boesteanu et al. 2001, Ohkura, Hamaguchi et al. 2012). Si l'intensité du signal du TCR dans le thymus permet l'orientation du choix CD4 SP *versus* CD8 SP, il semble également que celui-ci, en combinaison avec d'autres facteurs, soit responsable de la différenciation des tTreg (Kawahata, Misaki et al. 2002). En effet, un signal TCR de moyenne intensité va induire des changements épigénétiques au niveau du locus *Foxp3* et plus précisément une hypométhylation des zones de régulation du gène. Le locus *Foxp3* est composé de 11 exons et de 3 régions non-codantes (CNS1, CNS2 et CNS3) hautement conservées qui, plus que la zone promotrice elle-même, permettent une régulation fine de l'expression de Foxp3 (Josefowicz, Niec et al. 2012). Le CNS1 est localisé dans une région intronique et joue un rôle important dans la génération des pTreg uniquement. En effet, les souris présentant une délétion de cette région du génome sont protégées

du développement d'un syndrome « scurfy-like ». Toutefois, elles présentent bien un défaut de pTreg (Josefowicz, Niec et al. 2012).

L'induction de *Foxp3* via le CNS1 dans les pTreg se fait sous l'effet du TGF- β via une voie SMAD3-dépendante (Josefowicz, Niec et al. 2012). Le CNS2 est lui aussi intergénique et permet le maintien de l'expression de *Foxp3* dans les tTreg. Cette zone est hypométhylée dans les tTreg et permet la fixation de nombreux FT comme REL, CREB-ATF, RUNX1-CBF, ETS1, STAT5 et *Foxp3* lui-même qui vont maintenir la zone hypométhylée pour induire la transcription continue de *Foxp3*. Le CNS3 est, quant à lui, situé entre l'exon 1 et l'exon 2 de *Foxp3* et joue un rôle crucial dans l'activité du promoteur. Il va permettre le recrutement de marques permissives d'histones au niveau du promoteur le fixant ainsi dans un état « prêt pour la transcription » au sein des LT CD4 *Foxp3*⁺ et *Foxp3*⁻ (Ruan, Kameswaran et al. 2009).

Enfin, le promoteur de *Foxp3* est le lieu de fixation de FT qui sont induits par la voie du TCR, par l'IL-2 ou par CD28 comme NFAT, AP-1, FOS et JUN et également les protéines de type FOXO dont nous discuterons le rôle ultérieurement. Lorsque l'expression de *Foxp3* est initiée, celle-ci doit également être maintenue par des signaux présents dans le microenvironnement. Ce maintien et cette stabilisation de l'expression de *Foxp3* sont initiés par l'IL-2 qui, en se fixant sur son récepteur, va activer la protéine STAT5 qui va alors, comme les autres protéines STATs, être phosphorylée et être adressée au noyau. Une fois dans le noyau, STAT5 va alors se fixer sur ses séquences cibles (3'-TTCC(A/T)GGAA-5') situées au niveau du CNS2 et dans la zone promotrice (Chen, Rowell et al. 2006, Rudra, deRoos et al. 2012).

4.5. Les Tfh

Les LT auxiliaires folliculaires ou Tfh, sont des cellules impliquées dans l'activation des lymphocytes B, leur commutation de classe isotypique et également dans la formation des centres germinatifs (CG) dans les organes lymphoïdes secondaires. Ces LT sont caractérisés par l'expression du récepteur aux chimiokines CXCR5 et par l'expression du FT Bcl-6 (B cell lymphoma-6) (Nurieva, Chung et al. 2009). CXCR5 va permettre au pré-Tfh de quitter le paracortex du nœud lymphatique où sont « stockés » les lymphocytes T (zone T), pour se rendre à la bordure de la zone T-B et interagir avec des lymphocytes B. Les Tfh produisent de l'IL-21 et sont également une source non

négligeable d'IL-4 (Sahoo, Alekseev et al. 2015, Belanger and Crotty 2016). La différenciation Tfh est dépendante des cytokines IL-6 et IL-21 qui ont la particularité d'activer le FT STAT3 situé en aval de la signalisation de leurs récepteurs respectifs et induire l'expression de Bcl-6 (Nurieva, Chung et al. 2008). Bcl-6, en tant que « master regulator », va inhiber directement ou indirectement l'activation et l'expression d'autres FT des précédents lignages comme T-bet, GATA-3, ROR γ T, empêchant ainsi la différenciation en Th1, Th2 et Th17 respectivement (Nurieva, Chung et al. 2009, Xie, Amet et al. 2017, Xie, Koh et al. 2017). Les molécules de co-stimulation jouent également un rôle essentiel dans la génération de Tfh. En effet, l'interaction entre ICOS et son ligand (ICOS-L) est indispensable à la génération de Tfh et permet de potentialiser la production d'IL-21 par les Tfh, ainsi que l'expression de Bcl-6 qui lui-même permet l'expression de CXCR5. De ce fait, les souris déficientes pour la molécule ICOS n'ont pas de Tfh et sont incapables de monter une réponse appropriée lors d'une infection par le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) (Bauquet, Jin et al. 2009). En plus de son importance dans l'initiation de la différenciation Tfh, ICOS est requis lors de l'interaction Tfh-LB, pour la migration des Tfh vers la zone B/T et également pour la survie des Tfh (Hutloff, Dittrich et al. 1999). Hormis Bcl-6 et STAT3, d'autres FT sont également requis pour la complète différenciation des Tfh *in vivo*. IRF4, BATF, c-MAF ainsi que des microRNAs sont requis dans l'amplification des signaux aboutissant au verrouillage du lignage Tfh. IRF4 va coopérer avec STAT3 pour induire l'expression de l'IL-21. BATF va quant à lui permettre l'expression de Bcl-6 et c-MAF qui, à leurs tours, vont induire l'expression de l'IL-21 et de la molécule ICOS par les Tfh (Kwon, Thierry-Mieg et al. 2009, Hiramatsu, Suto et al. 2010). Si l'initiation de la différenciation des Tfh est dépendante de l'interaction LT-DC, la complète différenciation des Tfh nécessite une interaction avec les LB. Les pré-Tfh qui expriment CXCR5, Bcl-6 et ICOS vont migrer jusqu'à la zone B grâce à la sécrétion de CXCL12 par les FDC dans les follicules B où se trouvent des LB pré-activés. Dans cette zone, les Tfh et les LB vont échanger des signaux par l'intermédiaire des corécepteurs CD28/CD80-86, CD40L/CD40, ICOS/ICOSL, PD1-PDL1 et SLAP/SLAM (**Figure 11**).

L'interaction B-T va être doublement bénéfique. En effet, l'IL-6 produite par le LB va permettre d'augmenter la production d'IL-21 par les Tfh et l'IL-21 va permettre aux LB de se différencier en plasmocytes. En parallèles l'interaction CD28/CD80-86 et

ICOS/ICOSL va permettre d'induire la survie des Tfh ainsi que la stabilisation du lignage et enfin, l'interaction CD40L/CD40 va induire la survie des LB en activant des molécules anti-apoptotiques comme Bclx (Zhang, Li et al. 1996)

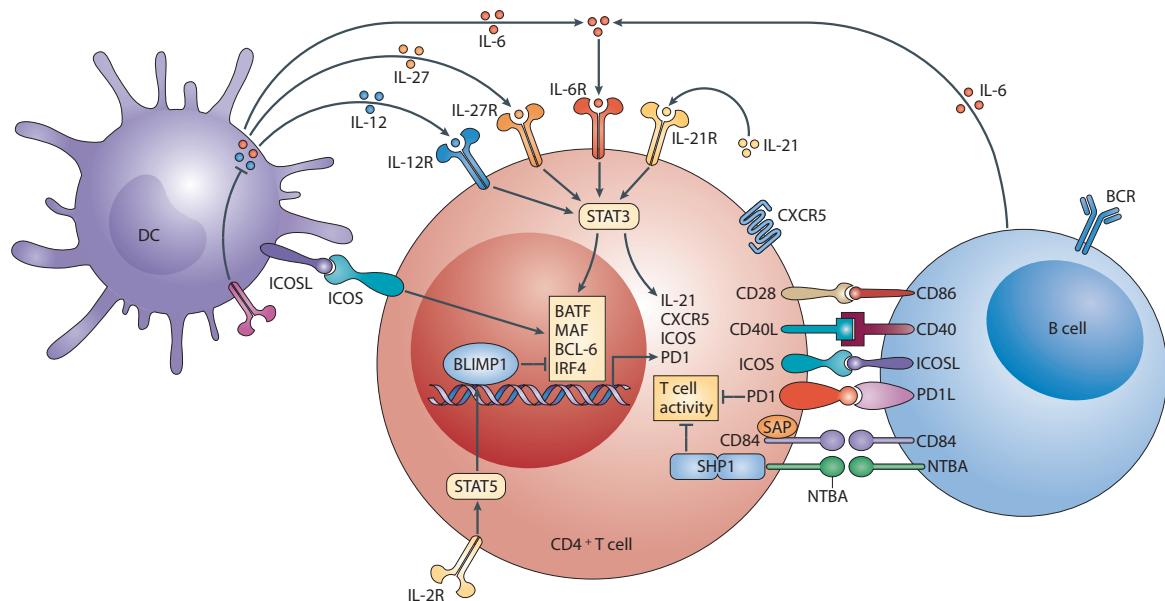


Figure 11 - La différenciation des Tfh. Pour se différencier en Tfh, les LT CD4 doivent interagir avec une cellule présentatrice d'antigènes dans la zone T ou la zone interfolliculaire des organes lymphoïdes secondaires. Ces LT vont alors acquérir l'expression du récepteur aux chimiokines CXCR5 et du facteur de transcription Bcl-6. Ces cellules vont alors migrer au niveau de la bordure T-B ou ils vont interagir avec un LB. Cette différenciation se fait en présence d'IL-6, d'IL-12 et d'IL-21 et vont permettre l'activation de nombreux autres FT indispensables à la différenciation Tfh, tels que BATF, MAF ou IRF4. Enfin, des interactions cellulaires avec les cellules dendritiques et les LB sont nécessaires pour amplifier le lignage Tfh comme CD28/CD80-86, CD40L/CD40, ICOS/ICOSL et SAP/SLAM (*Tangye et al., nri 2013*)

4.6. Autres types cellulaires :

En plus des principales sous-populations décrites précédemment, d'autres types de LT CD4 auxiliaires ont été décrits mais restent moins caractérisés. Nous décrivons ici les rôles respectifs des Tr1, Th9 et Th22 qui furent découverts bien après les Th1, Th2, Th17, Treg et Tfh.

4.6.1. Les Tr1

Les Tr1 représentent un sous-type de LT régulateurs qui permettent de contrôler des réponses immunitaires exacerbées ou inappropriées grâce à la production d'IL-10, de TGF- β , l'expression de molécules co-inhibitrices telles que CTLA-4, GITR ou PD-1 et de molécules cytotoxiques comme Granzyme B (Groux, O'Garra et al. 1997, Magnani,

Alberigo et al. 2011). Contrairement aux Treg, ces cellules n'expriment que de façon transitoire Foxp3 après engagement du TCR et co-expriment à leur surface CD49b et LAG-3 (Gagliani, Magnani et al. 2013). Il apparaît que la différenciation de ces cellules soit différente de celle des Treg conventionnels (Levings, Gregori et al. 2005). *In vitro* et *in vivo*, ces cellules se différencient en présence d'IL-27 et d'IL-10 qui, en se fixant sur leurs récepteurs respectifs, vont activer les protéines STAT1 et STAT3. STAT3 semble important pour la différenciation Tr1 car sa surexpression augmente la proportion de Tr1 (Stumhofer, Silver et al. 2007, Schmetterer, Neunkirchner et al. 2015). Enfin, la voie STAT3 permet d'induire l'expression de HIF-1 α qui, comme nous l'avons vu précédemment, permet la séquestration et la dégradation de Foxp3 (Pan, Barbi et al. 2012). Contrairement aux Treg où l'expression de Foxp3 est suffisante pour induire leur différenciation, la différenciation Tr1 nécessite quant à elle une pléiade de FT. Par exemple c-Maf et l'Ahr sont induits par l'IL-27 et vont permettre la production d'IL-10 et de granzyme B. La différenciation des Tr1 va aussi nécessiter l'expression de Blimp-1 et du FT Eomesodermin (Eomes) qui va directement transactiver le promoteur *Il10* et induire sa production (Vasanthakumar and Kallies 2013, Zhang, Lee et al. 2017). Chez la souris, l'expression d'autres FT comme BATF et IRF1 est également induite de manière IL-27-dépendante et favorise l'induction du programme Tr1 (Karwacz, Miraldi et al. 2017). De façon intéressante, ces cellules semblent être localisées dans les tissus mais la question du lieu de génération de ces cellules reste en suspens. En effet, lors de transplantations d'îlots pancréatiques, les Tr1 semblent s'accumuler dans la rate mais on ne sait pas si cet organe est un réservoir de Tr1 dans ces conditions ou alors leur lieu de différenciation (Gagliani, Jofra et al. 2013). Ces cellules, dont le rôle reste élué à ce jour, semblent néanmoins prometteuses dans le cadre de la Maladie du greffon contre l'hôte (GvHD). En effet, la génération *in vitro* de Tr1 est actuellement utilisée en thérapie pour réduire les risques que le greffon ne s'attaque à l'hôte (Bacchetta, Lucarelli et al. 2014).

4.6.2. Les Th9

Les Th9 sont caractérisés par la production d'IL-9, d'IL-21 et d'IL-10. Initialement l'IL-9 était considérée comme une cytokine de type Th2 car il avait été montré que la culture de Th2 en présence d'IL-2, d'IL-4 et de TGF- β permettait la production d'IL-9 par ces cellules (Schmitt, Germann et al. 1994). Ce n'est qu'en 2008 que Dardalhon

et collaborateurs ont pu mettre en évidence les mécanismes permettant la production d'IL-9 par les LT CD4 non différenciés toujours grâce au même cocktail de cytokines. Ils ont ainsi démontré que l'IL-4, grâce à l'activation des FT STATs dans les Th9, permet de limiter l'expression de Foxp3. En parallèle, l'IL-4 *via* une voie dépendante de STAT6, permettrait la transcription du gène *Il9* (Dardalhon, Awasthi et al. 2008, Goswami, Jabeen et al. 2012). Le TGF- β et STAT6 vont également permettre d'inhiber l'expression de T-bet qui réprime le gène *Il9* mais également d'activer la majorité des gènes du lignage Th9 dont le gène *Il9* lui-même (Tamiya, Ichiyama et al. 2013, Wang, Pan et al. 2013). En effet, certains FT, à savoir IRF4/IRF8 et BATF sont des cibles directes de STAT6 dans les Th9 (Jabeen, Goswami et al. 2013, Humblin, Thibaudin et al. 2017). IRF4, en se fixant sur le promoteur *Il9*, joue un rôle important dans la sécrétion d'IL-9 et sa déficience dans les LT induit une baisse de sécrétion d'IL-9 (Staudt, Bothur et al. 2010, Jabeen, Goswami et al. 2013).

Un autre FT semble jouer un rôle clé dans la différenciation des Th9 : il s'agit du PU.1. PU.1 est un FT à domaine ETS qui se lie à des séquences riches en purines grâce à son domaine « PU-Box » et qui, sous l'influence du signal TCR, du TGF- β et de l'IL-2, est exprimé dans les Th9. La déficience en PU.1 induit une réduction de la sécrétion d'IL-9 *via* un défaut de recrutement d'histones acétyl-transférases au niveau du promoteur *Il9* et dont la déficience permet une plasticité accrue des Th9 à se réorienter vers le lignage Th2 (Chang, Zhang et al. 2005, Chang, Sehra et al. 2010). En plus des FT PU.1, IRF4 et des protéines STATs, d'autres médiateurs solubles ou molécules de co-stimulations permettent d'amplifier la différenciation des Th9 (**Figure 12**). D'un point de vue physiologique, ces cellules participent à l'immunité antiparasitaire et anti-tumorale mais leurs fonctions précises restent encore à être mieux définies (Purwar, Schlapbach et al. 2012, Licona-Limon, Henao-Mejia et al. 2013, Pang, Zhang et al. 2018).

Enfin ces cellules semblent jouer un rôle délétère dans un bon nombre de maladies médiées par les LT telles que l'asthme allergique, la PR et l'EAE (Jager, Dardalhon et al. 2009, Bassil, Orent et al. 2014, Ciccia, Guggino et al. 2015, Buttrick, Wang et al. 2018).

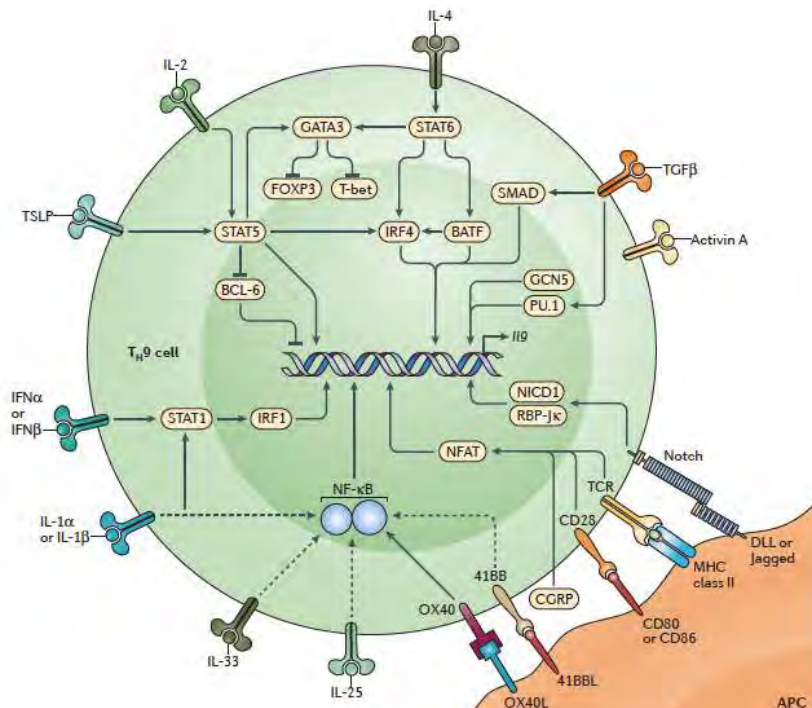


Figure 12 – Principaux signaux impliqués dans la différenciation Th9.

La différenciation Th9 nécessite l'activation de STAT5 via l'IL-2, de STAT6 via l'IL-4 ainsi que du TGF- β via la voie Smad. Bien que ces 3 signaux soient suffisants pour la différenciation Th9, d'autres signaux comme les cytokines IL-1, IL25 et IL-33 qui activent la voie NF- κ B, et les cytokines responsables de l'activation du facteur de transcription IRF-1 (IFNs et IL-1 β) sont également importants. Enfin, des signaux provenant de l'interaction entre les LT CD4 et les APC participent au programme Th9 comme l'interaction OX40-OX40L, 41BB-41BBL et Notch-DLL/Jagged. (Kaplan et al., nri 2015)

4.6.3. Les Th22

En 2009 apparaît une nouvelle population de LT auxiliaires différents du lignage Th17, caractérisée par la sécrétion de grandes quantités d'IL-22 : ce sont les Th22 (Duhén, Geiger et al. 2009, Trifari, Kaplan et al. 2009). *In vitro*, ces cellules se différencient en présence de TNF- α et d'IL-6, participent aux mécanismes de cicatrisation grâce à la prolifération des kératinocytes et de production de peptides antimicrobiens au niveau de la peau de par la production d'IL-22 et ils expriment des récepteurs aux chimiokines CCR6, CCR4 et CCR10 qui leur permettent de migrer au niveau de la peau (Boniface, Bernard et al. 2005, Duhén, Geiger et al. 2009, Eyerich, Eyerich et al. 2009). D'un point de vue transcriptionnel, l'Ahr et ROR γ t semblent important pour la production d'IL-22 (Plank, Kaiko et al. 2017).

5. Devenir des lymphocytes T CD4 après activation : seuls les meilleurs survivront

5.1. La notion de mémoire immunitaire

Suite à l'activation des LT, ces derniers vont subir une phase d'expansion clonale et de différenciation en sous-population adaptée à l'agression que l'on appelle la phase de *d'expansion*. La phase d'expansion dure quelques jours (environ 96h) et

s'accompagne de modifications d'expression de certains récepteurs de surface. L'expression de CD62L et CCR7 diminue, alors que celle de CD44 et de récepteurs aux chimiokines augmentent et vont permettre aux LT CD4 de migrer vers leurs tissus cibles (Ahmed and Gray 1996). Une fois l'agent infectieux éliminé au niveau des tissus, une phase de *contraction* va se mettre en place. Durant cette phase, un grand nombre de LT CD4 va mourir pour ne laisser place qu'à une population dite mémoire, qui va entrer en quiescence en attendant une deuxième rencontre avec l'antigène : c'est ce qu'on appelle la mémoire immunologique (**Figure 13**) :

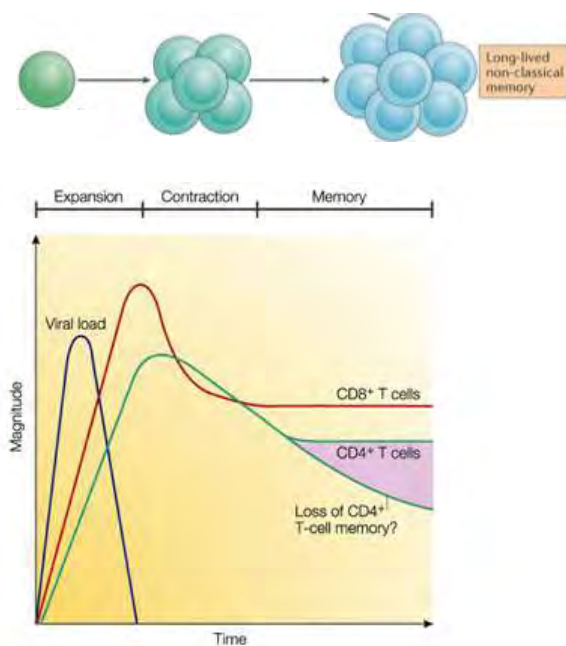


Figure 13 - Représentation des différentes phases durant une réponse immunitaire. Lors d'une réponse immunitaire, les lymphocytes T CD4 et CD8 vont s'activer dans le but d'éliminer le pathogène. Cette réponse immunitaire se déroule en 3 phases. Lors de la phase d'expansion, les LT spécifiques de peptides antigéniques vont s'amplifier de façon clonale pendant 96h : C'est la phase d'expansion. Lorsque le pathogène est éliminé, 90% des LT meurent durant la phase appelée phase de contraction, pour laisser place, dans la phase mémoire à un pool de LT mémoires capables de répondre plus rapidement et plus finement lors d'une réponse immunitaire secondaire. (**Adapté de Kaech et al., 2002 nri et Oxenius et al., 2016 nri**)

La différenciation des LT mémoires dépend du temps d'interaction du complexe TCR-CMH-II-peptide alors que l'avidité du TCR ne semble pas être impliquée. En effet, lors de la phase mémoire, des LT CD4 ayant des TCR de forte et faible avidité peuvent être retrouvés dans le lot de LT CD4 mémoires (Malherbe, Hausl et al. 2004). La génération de LT CD4 présentant deux TCR transgéniques (LLO118 et LLO56) spécifiques d'un peptide de *Listeria monocytogenes* a pu mettre en évidence le rôle primordial du temps de dissociation du complexe TCR-CMH-II-peptide dans la mise en place de la réponse immunitaire mémoire, et qu'un long temps de dissociation entre le TCR et le complexe CMH-II-peptide allait générer préférentiellement des LT mémoires. Le travail de Weber et collaborateurs a pu mettre en évidence que, pour un même peptide, les deux TCR (qui présentent seulement quelques acides aminés de

différence dans les régions CDR du TCR) déclenchent des réponses opposées. Les CD4 LLO118 permettent une réponse primaire augmentée alors que les CD4 LL56 permettent de monter une réponse secondaire plus efficace (Weber, Li et al. 2012). En plus du signal TCR, la mise en place de la mémoire immunitaire nécessite l'interaction avec des molécules de co-stimulation CD40L et CD28 avec CD40 et CD80/86 exprimés sur les CPA (Grewal, Xu et al. 1995, Pagan, Pepper et al. 2012).

5.2. La mémoire lymphocytaire.

Les LT CD4 mémoires peuvent être subdivisés en fonction de leurs capacités de réponses lors de réponses secondaires, en fonction de leur distribution dans les tissus, leurs capacités migratoires et des différents lignages. Au départ, les LT CD4 mémoires ont été divisés en deux sous-types par Sallusto et collaborateurs : les T centraux mémoires (Tcm) et les T effecteurs mémoires (Tem) (Sallusto, Lenig et al. 1999). De nos jours d'autres populations de LT mémoires ont été décrites, il s'agit des LT résidants mémoires (Trm) et des LT CD8 virtuels mémoires. Ces populations cellulaires sont identifiables grâce à une combinaison de molécules de surface et possèdent des fonctions spécifiques que nous allons aborder par la suite. En plus de cette signature phénotypique, les LT CD4 mémoires possèdent une capacité de survie accrue en présence d'IL-7, d'IL-2 ou d'IL-15 et aux signaux initiés par les CPA, comme par exemple l'interaction OX40-OX40L qui promeut la mémoire en condition Th2 (Soroosh, Ine et al. 2006, Doms, Wolslegel et al. 2007, Purton, Tan et al. 2007)

5.2.1. Différences entre Tcm et Tem.

Les Tcm sont caractérisés par l'expression des marqueurs CD44, CD62L et CCR7 ($CD44^{high}$, $CD62L^{high}$, $CCR7^{+}$), et sont capables de re-circuler entre les organes lymphoïdes secondaires *via* le réseau sanguin grâce à l'expression des marqueurs de « homing » CCR7 et CD62L et servent de deuxième ligne de défense lors d'infections. Comme ces cellules ont déjà été au contact d'un antigène pour lequel ils sont spécifiques, ils ont la capacité de proliférer plus rapidement que des LT naïfs spécifiques du même antigène afin de répondre de façon plus fine lors d'une réinfection. Contrairement aux TEM, ils n'ont pas la capacité de produire des cytokines pro-inflammatoires car les locus des gènes sont hypo-acétylés, donc non permissifs

pour la transcription. En revanche, après activation, ils sont capables de produire de grandes quantités d'IL-2 qui va permettre leur prolifération. Etant localisés dans les organes lymphoïdes secondaires, certains TCM exprimant CXCR5 vont pouvoir apporter de l'aide aux lymphocytes B mais peuvent aussi migrer au niveau de la zone d'infection où, en fonction des cytokines pro-inflammatoires produites localement, ils pourront se différencier en cellules effectrices adaptées à l'infection. Les Tem sont eux localisés préférentiellement dans la rate et peuvent rejoindre les tissus non-lymphoïdes où ils vont être capables de produire très rapidement des cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN- γ ou l'IL-4 grâce à l'expression du programme transcriptionnel des différents lignages de LT. Ils circulent *via* les réseaux sanguins et lymphatiques et n'expriment que peu les marqueurs CD62L, CCR7 mais expriment CD44. Enfin, ces cellules ont des capacités moindres à proliférer comparé aux TCM (Crotty, Johnston et al. 2010).

5.2.2. Mémoire au sein des tissus : rôles des Trm

Initialement découverts dans les LT CD8 grâce à l'expression de CD103, Les Trm n'expriment ni CD62L, ni CCR7 et d'un point de vue moléculaire, ces cellules, doivent réprimer l'expression des FT de type T-box tels qu'Eomes et T-bet afin de devenir des Trm (Mackay, Wynne-Jones et al. 2015). Ces cellules mémoires résident dans les tissus non-lymphoïdes et sont retrouvées en abondance dans la peau et les muqueuses où ils vont permettre une réponse immédiate en cas de réinfections (Turner, Bickham et al. 2014). Dans les LT CD8, les Trm sont caractérisés par l'expression des molécules d'adhésion CD69 et CD103 qui facilitent leur rétention dans l'épithélium. Alors que les LT CD8 sont localisés au niveau intra-épithélial, les CD4 Trm sont eux localisés au niveau des sous-muqueuses et dans le derme (Gebhardt, Whitney et al. 2011, Yang, Yu et al. 2011). Récemment cette propriété non-migratoire des Trm a été remise en question car des Trm sont également présents au niveau des organes lymphoïdes secondaires, partagent des marqueurs identiques aux Trm et sont issus des tissus non-lymphoïdes (Ugur, Schulz et al. 2014, Beura, Wijeyesinghe et al. 2018) .

5.2.3. *Lymphocytes T Mémoires virtuels : des lymphocytes mémoires sans expérience*

Ces Lymphocytes T CD8 mémoires (LT CD8 VM) ont été observés pour la première fois dans des souris axéniques et n'ayant jamais été en contact avec des antigènes exogènes (Haluszczak, Akue et al. 2009). Il en existe deux sortes, les « Innate memory T cells » qui se développent dans le thymus sous l'influence thymocytes bystander qui expriment le FT PLZF et qui produisent de l'IL-4 nécessaire pour l'expression d'Eomes et l'expansion de ces cellules, et les « Virtual Memory CD8 T cells » qui eux se développent dans le thymus et en périphérie (White, Cross et al. 2017). La présence de signaux cytokiniques particuliers permettent à ces cellules de proliférer et d'acquérir le même phénotype que des cellules activées ($CD44^{\text{High}}CD122^{\text{High}}CD49d^{\text{low}}$). De façon intéressante, l'IL-15 semble nécessaire au développement des LT CD8 VM et l'expression du FT Eomes semble être l'un des FT clés du lignage (White, Cross et al. 2016). D'autres cytokines comme l'IL-4 ou les Interférons de type 1 permettent aux LT CD8 VM de s'expandre dans le thymus et en périphérie (Haluszczak, Akue et al. 2009, Weinreich, Odumade et al. 2010, Martinet, Tonon et al. 2015). D'un point de vue fonctionnel, ces cellules sont capables de produire, et ce, de façon indépendante de l'antigène, de grandes quantités d'IFN- γ et possèdent des fonctions cytotoxiques qui permettent d'établir une première ligne de défense et préparer un environnement pro-Th1.

Chapitre II : Rôle des protéines Foxo dans le système immunitaire

Les facteurs de transcription Foxo (Forkhead Box class O) appartiennent à la grande famille de protéines de type « Forkhead » et ont été très conservés au cours de l'évolution, depuis les invertébrés jusqu'aux mammifères. Ce FT a été initialement découvert chez *Caenorhabditis elegans* et nommé « Dauer Formation-16 » (DAF-16). Chez les mammifères, la sous-famille Foxo comprend 4 membres : Foxo1 (FKHR), Foxo3 (FKHRL1), Foxo4 (AFX1) et Foxo6. Alors que Foxo1, Foxo3 et Foxo4 sont ubiquitaires, l'expression de Foxo6 est restreinte au cerveau (Jacobs, van der Heide et al. 2003).

Ces protéines jouent des rôles essentiels dans la régulation du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et l'apoptose et sont régulées par des signaux du microenvironnement tels que le stress oxydatif, la présence/absence de nutriments ou encore un état inflammatoire. Ces protéines ont été identifiées comme gènes suppresseurs de tumeurs grâce à leurs effets sur la croissance cellulaire et dans l'arrêt du cycle cellulaire. En plus de leurs fonctions suppressives, ces protéines jouent également des rôles primordiaux dans le système immunitaire, où deux isoformes majeures sont exprimées : Foxo1 et Foxo3.

1. Structure et fonctions des protéines de type Foxo

D'un point de vue structurel, les facteurs Foxo possèdent un domaine de fixation à l'ADN de type « Forkhead » d'environ 100 acides aminés ultra-conservé qui reconnaît une séquence consensus « core » de huit paires de bases : 5'-TTGTTT(A/G)C-3' (ou sa séquence complémentaire 3'-AACAAA(T/C)G-5'). Cette séquence est appelée séquence « ForkHead Response Element » (FHRE) ou « Foxo Binding Site » (FBS). En plus du domaine Forkhead, ces protéines possèdent : une séquence d'import nucléaire (NLS), une séquence d'export nucléaire (NES) et un domaine de transactivation (TA) (Calnan and Brunet 2008).

L'activité des protéines Foxo est très finement régulée par des modifications post-traductionnelles (PMT) sur plusieurs résidus comme par exemple, les sérines, lysines et thréonines (**Figure 14**).

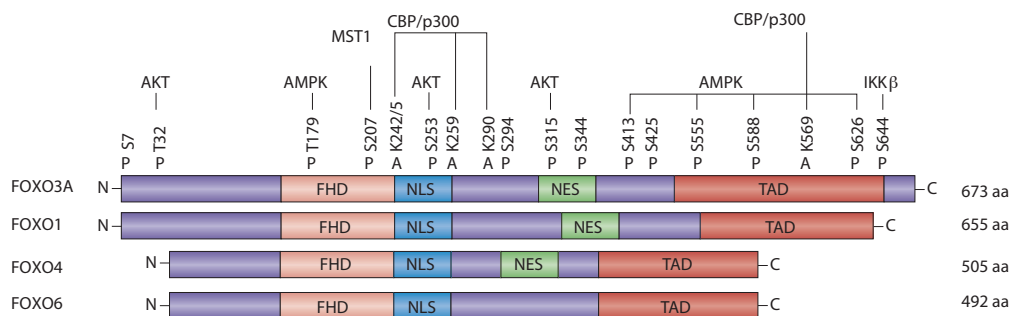


Figure 14 - Structure des différentes protéines Foxo : Les protéines Foxo sont composées d'un domaine de fixation (FHD), une séquence d'import de la protéine dans le noyau (NLS), une séquence d'export du noyau (NES) et d'un domaine de transactivation (TAD). Seule la protéine Foxo6 ne possède pas de NES. L'activité des protéines Foxo est finement régulée par modifications post-traductionnelles, essentiellement par acétylation (**A**) et phosphorylation (**P**) par différentes kinases (AKT, AMPK, IKK- β etc ...) ou acétyl-transférases (CBP/p300, MST1 etc ...). *Eijkelenboom et al., Nri 2013*

Ces PMT vont permettre, en fonction du résidu concerné, la translocation ou l'exclusion des protéines Foxo au niveau du noyau. Parmi les modifications possibles, les protéines Foxo peuvent être phosphorylées, acétylées, méthylées ou encore ubiquitylées, et peuvent induire l'activation ou l'inhibition des protéines Foxo (**Figure 15**). Toutes ces PMT constituent le « Foxo CODE » et seront abordées brièvement pour Foxo1 et Foxo3 dans cette partie (Calnan and Brunet 2008).

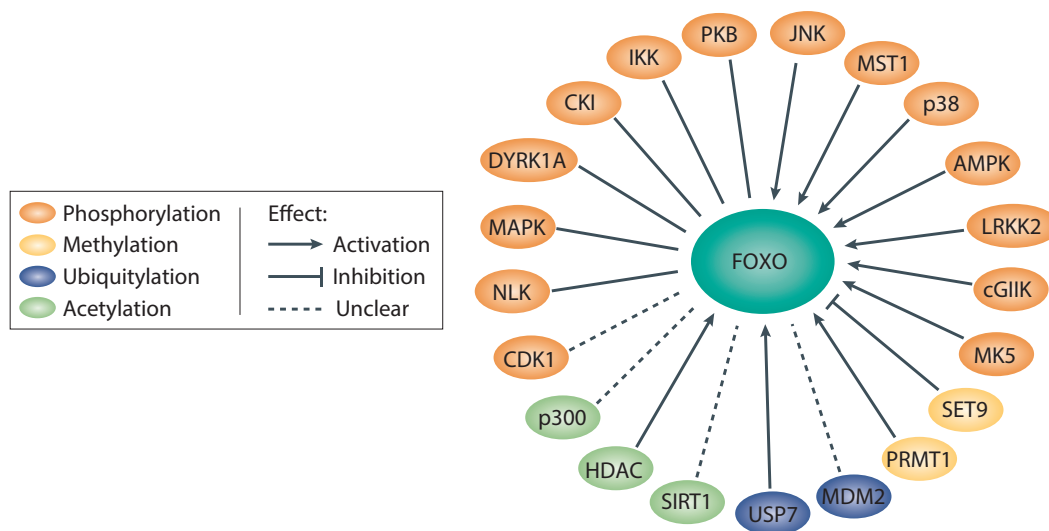


Figure 15 - Modifications post-traductionnelles et leurs effets sur les protéines Foxo. Les protéines Foxo peuvent subir plusieurs modifications post-traductionnelles (PTM) affectant l'activation ou l'inhibition des protéines Foxo. Par exemple la phosphorylation par AKT, IKK, CDK1 ou AMPK induisent l'exclusion des Foxo du noyau, alors que la phosphorylation par JNK et MST1 permet aux Foxo de rester nucléaires. *Burgering et al., 2013 Nature Reviews Molecular Biology*

1.1. Différentes modifications post-traductionnelles : Phosphorylation, Acétylation et Méthylation

L'acétylation est une des principales PMT régulant l'activité des protéines Foxo. En réponse à la présence d'insuline ou de facteurs de croissance, la voie PI3K-Akt est activée et va permettre l'inhibition des protéines Foxo et leur séquestration dans le cytoplasme (Brunet, Bonni et al. 1999). En particulier, la phosphorylation de la Thréonine 24 (T24) et des Sérines 256 et 319 (S256 et S319) pour Foxo1 et de la Thréonine 32 (T24) et des Sérines 256 et 319 (S253 et S315) pour Foxo3 va permettre la génération de sites de fixation pour la protéine chaperonne 14-3-3 (Biggs, Meisenhelder et al. 1999, Kashii, Uchida et al. 2000). 14-3-3, en interagissant avec les protéines Foxo, va permettre leur exclusion du noyau et prévenir leur réentrée, probablement via la modification de la conformation de la protéine et la modification de la charge de la protéine (Rena, Woods et al. 2002, Obsilova, Vecer et al. 2005). D'autres PMT sur les résidus S322 et S325 permettent de potentialiser la séquestration Foxo1 dans le cytoplasme en augmentant l'interaction de Foxo1 avec la machinerie d'exportation (Ran et Exportin/Crm1) et va permettre dans un second temps la dégradation des protéines Foxo via le protéasome (Rena, Woods et al. 2002). En plus de la voie PI3K-Akt, d'autres kinases vont permettre d'inhiber l'action de ces FT. C'est le cas, notamment de IKK- β , SGK1 et de certaines cyclines qui vont phosphoryler les Foxo sur différents résidus tels que les sérines S644 et S249 pour Foxo3 par exemple.

La relocalisation des facteurs Foxo se fait grâce à l'action de phosphatases comme PP2A (Protein Phosphatase 2A) qui va permettre d'enlever les marques posées par Akt et SGK (Rinner, Mueller et al. 2007). En réponse au stress oxydatif, les kinases Mst1 et Jnk1 vont permettre la relocalisation des Foxo, et ce, même en présence de marques permettant la rétention cytoplasmique des protéines (Brunet, Sweeney et al. 2004). Il existe une hiérarchie entre les différentes PMT qui permet la relocalisation des protéines Foxo dans le noyau, et ce, même en présence de phosphorylations inhibitrices. Par exemple pour Foxo3, la phosphorylation de la sérine 207 (S207) par Mst1 permet de déstabiliser l'interaction de Foxo3 avec 14-3-3 et permet ainsi de ré-importer la protéine dans le noyau (Lehtinen, Yuan et al. 2006). Jnk1, quant à lui, phosphoryle Foxo4 sur les thréonines 447 et 451 (T447 et T451) et permet également la relocation nucléaire de la protéine, et ce, en dépit de l'action d'Akt/SGK1.

L'acétylation est une autre des principales PMT que peuvent subir les protéines Foxo, modifiant ainsi leurs localisations subcellulaires. Cette PMT se fait *via* des protéines acétylases. Les premières protéines capables d'acétyler les protéines Foxo furent identifiées par technique de double hybride : il s'agit de CBP/p300. CBP et p300 sont des histones acetyltransférases qui jouent des rôles en tant que co-activateurs de la transcription. Chez la souris, CBP/p300 est capable d'acétyler Foxo1 sur ses lysines 242, 245 et 262 (K242, K245 et K262). Cette acétylation de Foxo1 conduit à une diminution de la transcription cible des protéines Foxo (Daitoku, Hatta et al. 2004). Comme toute protéine acétylée, les FT Foxo peuvent être désacétylés. Chez *C.elegans* la protéine homologue des protéines Foxo, Daf-16 est désacétylée par une désacétylase NAD-dépendante Sir2 (pour Silent Information Regulaor 2) (Tissenbaum and Guarente 2001). Cette découverte a permis de mettre en évidence que chez la souris et chez l'Homme, les orthologues de Sir2 (SIRT1 et SIRT2) sont capables de désacétyler les FT Foxo1, Foxo3 et Foxo4 et ainsi inhiber l'activité transcriptionnelle des protéines Foxo (Daitoku, Hatta et al. 2004, Motta, Divecha et al. 2004).

Enfin les protéines Foxo peuvent aussi être méthylées *via* la protéine SET9 ou PRMT1. Par exemple SET9 méthyle Foxo3 au niveau du domaine de fixation à l'ADN et inhibe ainsi la fixation de Foxo3 sur ses séquences cibles, et PRMT1 méthyle Foxo1 sur les arginines 248 et 250 (R248, R250) et inhibe également la fonction de Foxo1 (Yamagata, Daitoku et al. 2008, Xie, Hao et al. 2012)

2. Foxo1 et Foxo3 : Acteurs clés dans la fonction et le développement du système immunitaire

Le rôle des protéines Foxo a tout d'abord été étudié en fonction de l'expression de chacune des protéines. En effet, même si ces protéines sont ubiquitaires, leur niveau d'expression varie de façon cellule-spécifique (**Figure 16**).

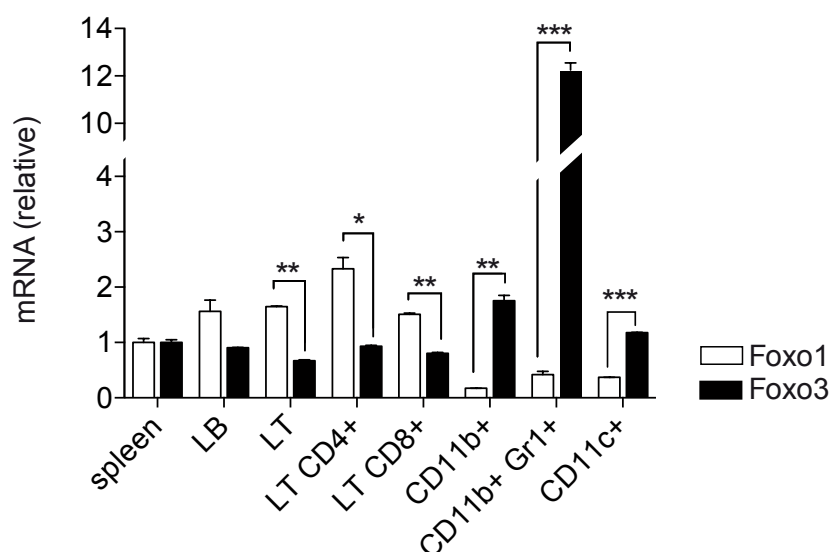


Figure 16 - Expression relative de Foxo1 et Foxo3 dans les cellules du système immunitaire. L'expression des transcrits de Foxo1 (Barres blanches) et Foxo3 (Barres noires) a été analysée par RT-qPCR à l'état basal dans les Lymphocytes B (LB), Lymphocytes T (LT CD4 et CD8), les macrophages (CD11b⁺), les Granulocytes (CD11b⁺ Gr1⁺) et les cellules dendritiques (CD11c⁺). **Adapté de Dejean et al., 2011 Antioxydants & Redox signaling**

En effet, l'analyse de l'expression notamment de Foxo1 et Foxo3 au sein du SI a mis en évidence que l'expression de Foxo1 est restreinte aux cellules lymphoïdes alors que celle de Foxo3 est plutôt spécifique des cellules myéloïdes, même si des rôles respectifs de ces deux FT ont été décrits dans les compartiments opposés. Notons cependant que cette étude a été effectuée sur des souris non immunisées, à l'état basal dans des souris C57BL/6. On sait néanmoins que la régulation de l'expression des facteurs Foxo est un processus dynamique et que par exemple, les protéines Foxo peuvent être réprimées très rapidement après engagement du TCR dans les LT. Cette translocation hors du noyau permet donc l'activation ou la répression des gènes cibles des protéines Foxo, alors même que la protéine est présente (Ouyang, Liao et al. 2012). Suite à cette exclusion nucléaire, les protéines Foxo vont être ré-adressées au noyau ou elles pourront exercer leurs rôles de facteurs de transcription.

2.1. Rôles de Foxo1 dans les cellules du système immunitaire adaptatif

Les premiers travaux portant sur l'étude des facteurs Foxo ont permis de mettre en évidence le rôle crucial des protéines Foxo dans l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire dans des lignées cellulaires non-lymphoïdes. Ces propriétés pro-apoptotiques et antiprolifératives des facteurs Foxo ont été par la suite étudiées dans les cellules du système immunitaire où ces deux mécanismes biologiques s'appliquent lors de l'initiation et lors de l'arrêt d'une réponse immunitaire.

2.1.1. Rôles dans les lymphocytes T CD4

In vitro, l'activation des Lymphocytes T via leurs TCR et/ou via les récepteurs aux cytokines, va permettre l'entrée en prolifération et la survie des LT. Suite à l'engagement du TCR, Foxo1 va être phosphorylé sur ses résidus T24, S256 et S319 par la voie PI3K-AKT, entraînant ainsi son exclusion nucléaire. Ainsi, l'importance de l'inactivation de Foxo1 via la voie PI3K-AKT a pu être mise en évidence dans les LT Vav1-/- où est observé un défaut de cette voie. Il en résulte une moins bonne exclusion nucléaire de Foxo1 et un blocage du cycle cellulaire (Charvet, Canonigo et al. 2006). Le même phénotype est observé dans des LT où la protéine a été mutée de façon à rester exclusivement nucléaire, démontrant ainsi un rôle important de l'inactivation de Foxo1 dans le contrôle de la prolifération des LT (Fabre, Lang et al. 2005).

La génération de souris déficientes pour Foxo1 dans les lymphocytes T a révélé que ces souris présentaient un défaut du nombre de LT naïfs en périphérie, et que ce phénotype était dû à un défaut d'expression des protéines de « homing » des LT. En effet, les LT déficients pour Foxo1 présentent des niveaux moins élevés de CCR7, récepteur aux chimiokines nécessaire à la migration des LT au niveau de la zone T dans les organes lymphoïdes secondaires, de CD62L, une lectine indispensable à l'adhésion des LT au niveau des HEV (High Endothelial Veunules) et d'une diminution de l'expression de S1P₁, récepteur impliqué dans la sortie des LT des organes lymphoïdes secondaires (Gubbels Bupp, Edwards et al. 2009, Kerdiles, Beisner et al. 2009, Ouyang, Beckett et al. 2009). Ce défaut de migration s'accompagne également d'une diminution de l'expression du facteur de transcription Klf2 qui régule positivement l'expression des gènes *Sell* et *Edg1* codant respectivement pour CD62L et S1P₁. Des expériences de ChIP ont pu mettre en évidence que Foxo1 était capable de se fixer directement au niveau du promoteur de Klf2, suggérant ainsi que le contrôle de la migration des LT par Foxo1 se fait de façon Foxo1-Klf2 dépendante, alors que la régulation de *ccr7* est directe (Fabre, Lang et al. 2005, Kerdiles, Beisner et al. 2009, Kim, Ouyang et al. 2013).

En plus du défaut de migration des LT, les LT CD4 naïfs déficients pour Foxo1 présentent un défaut de survie comparé aux LT CD4 WT lorsqu'ils sont transférés dans un hôte WT. Ce défaut de survie est associé à une baisse du niveau d'expression de

la protéine anti-apoptotique Bcl2 ainsi qu'une diminution de l'expression de la chaîne α du récepteur à l'IL-7, récepteur indispensable à la survie des LT CD4 et CD8.

Tout comme *ccr7* et *Klf2*, l'IL-7R α est une cible directe de Foxo1, puisque Foxo1 est capable d'activer son expression en se fixant au niveau d'un enhancer situé à -3,5kb du gène *Il7ra* (Kerdiles, Beisner et al. 2009, Ouyang, Beckett et al. 2009).

Foxo1 joue également un rôle important dans la différenciation et l'activation des LT effecteurs et régulateurs. En effet, les souris déficientes pour Foxo1 présentent un nombre plus faible de cellules Foxp3⁺ dans le thymus et en périphérie lors de leurs premières semaines de vie, puis le nombre de pTreg devient identique aux WT dans les souris adultes (Kerdiles, Stone et al. 2010, Ouyang, Beckett et al. 2010). De façon intéressante, la double déficience en Foxo1 et Foxo3 (Foxo1^{-/-}Foxo3^{-/-}) réduit encore plus drastiquement le nombre de Treg, suggérant un rôle redondant ou coopératif de ces deux FT dans le maintien et la différenciation du lignage Treg (van der Vos and Coffey 2008, Harada, Harada et al. 2010, Kerdiles, Stone et al. 2010). De plus, il a également été montré par co-immunoprécipitation que les protéines Smad et STAT, FT nécessaires à l'expression de Foxp3, sont des cofacteurs de Foxo1 et Foxo3. Des analyses *in silico* montrent 3 sites potentiels de fixation des protéines Foxo (FBS) dans le locus *Foxp3* : un FBS situé dans la région promotrice et deux autres au niveau du CNS2. Par la suite, des expériences de ChIP et de gènes rapporteurs ont pu mettre en évidence que Foxo1 et Foxo3 pouvaient se fixer au niveau du FBS localisé dans le promoteur et à un seul des deux FBS sur le CNS2 du gène *Foxp3* (Harada, Harada et al. 2010, Ouyang, Beckett et al. 2010). Cependant les protéines Foxo ne sont pas les seuls acteurs qui contrôlent l'expression de Foxp3 car une proportion non-négligeable de pTreg subsistent dans les souris doubles déficientes pour Foxo1 et Foxo3 (Foxo1^{-/-}Foxo3^{-/-}) et ces pTreg présentent une légère diminution de l'expression de Foxp3 (Kerdiles, Stone et al. 2010). Néanmoins, ces pTreg semblent non fonctionnels puisqu'ils ne peuvent pas limiter le développement d'auto-inflammation. Ce mécanisme peut être dû au niveau plus faible de Foxp3 lui-même mais également au contrôle de l'expression de CTLA4 par Foxo1 qui est capable de se fixer au niveau de la région -193bp en amont du TSS de *Ctla4* (Kerdiles, Stone et al. 2010, Ouyang, Liao et al. 2012).

En plus de son rôle important dans les Treg, Foxo1 participe également au programme de différenciation des Tfh. En effet, la délétion de Foxo1 dans les LT CD4

induit une accumulation de Tfh CXCR5⁺PD1⁺ et est associée à une augmentation de la formation de centres germinatifs. Les facteurs Foxo sont capables de réguler positivement ou négativement l'expression de Bcl6 en se fixant sur une région régulatrice située à -0,5kb du TSS, démontrant donc un rôle clé des Foxo dans l'induction du lignage Tfh (Oestreich, Mohn et al. 2012). Néanmoins, une autre étude montre que Foxo1 joue au contraire un rôle de régulateur négatif du lignage Tfh. En effet, le développement du lignage Tfh nécessite une interaction B-T et l'engagement de molécules de co-stimulation dont ICOS avec ICOSL qui active la voie PI3K-AKT. Or, on sait que cette voie de signalisation permet de phosphoryler les protéines Foxo et d'induire leur inactivation par exclusion nucléaire. L'interaction ICOS-ICOSL induit la diminution de l'expression de Foxo1 et ce *via* sa phosphorylation, son ubiquitination par l'ubiquitine ligase ITCH qui va induire son adressage au protéasome et sa dégradation quelques minutes après l'interaction ICOS-ICOSL (Xiao, Eto et al. 2014). De façon intéressante, ITCH interagit avec Foxo1 mais pas avec Foxo3 suggérant ainsi des rôles potentiellement différents des facteurs Foxo dans la régulation des Tfh (Xiao, Eto et al. 2014). De plus, les souris déficientes pour Foxo3 ne présentent pas de défaut de formation de CG (Xiao, Eto et al. 2014). En revanche, la délétion de Foxo1 dans les LT induit une augmentation de l'expression de Bcl6 et une augmentation de la différenciation en Tfh (Stone, Pepper et al. 2015). De façon intéressante, l'analyse par ChIP-sequencing des sites de fixation de Foxo1 dans les LT CD4 montre que de nombreux gènes importants pour la différenciation Tfh sont des cibles directes de Foxo1, comme par exemple *Cxcr5*, *Batf*, *Cxcr4*, *Irf4*, et *Icos* qui possèdent au moins 1 site de fixation Foxo à proximité du TSS ou à quelques Kb du promoteur de ces gènes (Kerdiles, Beisner et al. 2009, Stone, Pepper et al. 2015, Essig, Hu et al. 2017).

Enfin, Foxo1 joue également un rôle prépondérant dans les lignages Th1, Th17 et Th9. Dans les Th17, deux études montrent que Foxo1 régule négativement l'expression du gène *Il23r* et qu'en présence de forts niveaux de sels, la serine thréonine kinase SGK1 phosphoryle Foxo1, induisant son exclusion nucléaire et une augmentation de l'expression de l'IL-23R et donc, une meilleure différenciation Th17 lorsque Foxo1 est inactivée (Wu, Yosef et al. 2013). Une autre étude a quant à elle mis en évidence que Foxo1 pouvait former un complexe avec ROR γ T pour directement inhiber sa fixation au niveau de l'ADN limitant ainsi l'expression d'IL-17A et d'IL-23R

et donc, le développement du lignage Th17. Dans les Th9, il a été montré par des expériences de Chip-Sequencing et des expériences de gènes rapporteurs que Foxo1 pouvait se fixer au niveau des gènes *Ii9* et *Irf4* et que cette fixation permet l'activation de l'expression de ces deux gènes dans les Th9. Cette étude a également pu mettre en évidence que Foxo1 contrôle négativement la production d'IFN- γ , puisque les LT CD4 Foxo1^{-/-} produisent plus d'IFN- γ et il a également été montré que les LT régulateurs issus de souris Foxo1^{fl/fl}xFoxp3Cre présentent un défaut de capacités suppressives et produisent de fortes quantités d'IFN- γ *in vitro et in vivo* (Ouyang, Liao et al. 2012, Buttrick, Wang et al. 2018)

2.1.2. Rôles dans les lymphocytes T CD8

Compte tenu du rôle important des facteurs Foxo dans les LT CD4, le rôle de Foxo1 dans les LT CD8 a également été adressé. L'utilisation de LT CD8 déficients pour Foxo1 montre un rôle de ce FT dans la régulation de la différenciation en effecteurs versus mémoires des LT CD8. Dans les LT CD8 naïfs, l'engagement du TCR va entraîner la différenciation des LT CD8 en effecteurs grâce à la phosphorylation et l'exclusion du noyau de Foxo1 de façon PI3K-AKT-mTOR dépendante et grâce à l'augmentation de l'expression de T-bet. Dans les LT CD8 Foxo1KO, on observe une augmentation de l'expression de *Tbx21* comparé aux CD8 WT, cependant il n'a pas pu être mis en évidence que *Tbx21* est une cible directe de Foxo1 malgré la présence de 3 sites putatifs de fixation des facteurs Foxo au niveau du promoteur *Tbx21* (Rao, Li et al. 2012, Hess Michelini, Doedens et al. 2013). Si l'exclusion de Foxo1 est nécessaire pour que les LT CD8 puissent entrer en phase effectrice, Foxo1 semble aussi requis pour la mise en place de la mémoire CD8. En effet, Foxo1 régule directement l'expression de *Tcf7* qui code pour la protéine TCF-1, et d'Eomes qui sont tous deux nécessaires pour la différenciation en LT CD8 mémoires (Paley and Wherry 2010, Zhou, Yu et al. 2010, Hess Michelini, Doedens et al. 2013, Tejera, Kim et al. 2013). Dans un modèle d'infection par le virus MCMV, Foxo1 est nécessaire pour l'expansion et la survie des LT spécifiques de l'épitope M45 du MCMV. En plus de cette capacité accrue à entrer en apoptose, les LT Foxo1KO sont plus sensibles à l'anergie et présentent des quantités de transcrits de EGR2, Grail, Cbl-b et ITCH qui sont tous impliqués dans la mise en place de l'anergie dans les LT

CD8 (Delpoux, Michelini et al. 2018). Enfin la délétion de Foxo1 à différents temps durant une infection LCMV (Foxo1^{fl/fl}xRosa25Cre-ERT2) montre que l'expression de Foxo1 est nécessaire tout au long de l'infection pour la différenciation des LT CD8 en LT CD8 mémoire et le maintien / la survie de ces LT CD8 post-infection (Utzschneider, Delpoux et al. 2018).

Ainsi, la régulation spatiotemporelle de Foxo1 va permettre l'activation ou l'inhibition de nombreux gènes et ainsi instruire le développement des différents sous-types de LT CD4 ou encore, la transition des LT CD8 effecteurs en LT mémoires. L'ensemble des gènes régulés par Foxo1 dans les LT sont récapitulés sur la figure ci-dessous.

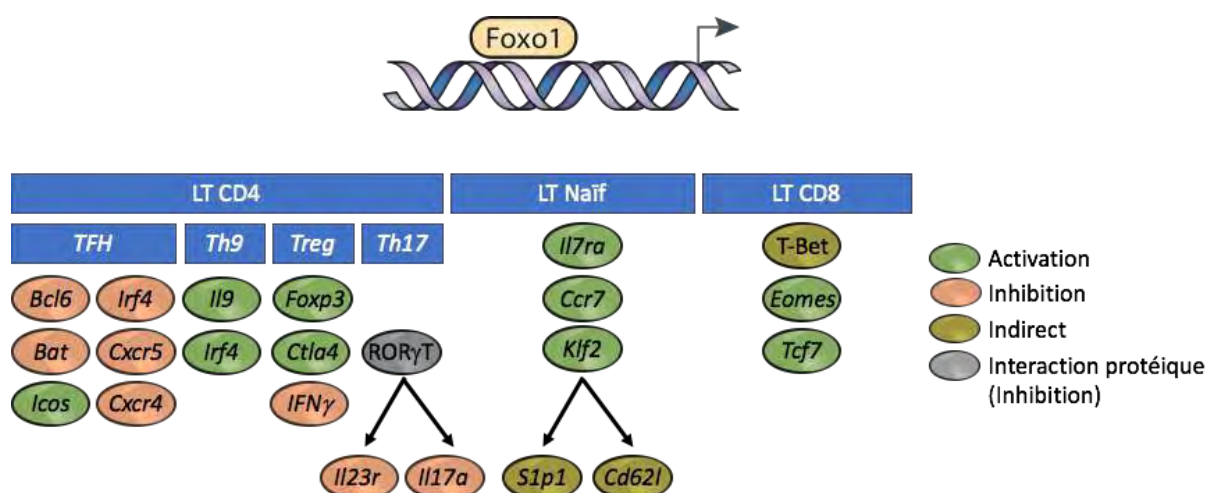


Figure 17 – Schéma récapitulatif des principales cibles de Foxo1 dans les lymphocytes T CD4 et CD8.

2.2. Rôles de Foxo3 dans les cellules du système immunitaire inné

2.2.1. Rôles dans les cellules présentatrices d'antigènes

Contrairement à Foxo1, le rôle de Foxo3 a surtout été étudié dans les cellules myéloïdes où son expression est la plus élevée. Bien que les souris Foxo3^{-/-} ne présentent aucun phénotype particulier à l'état basal, l'étude du rôle de Foxo3 durant une infection LCMV montre qu'il joue un rôle prépondérant durant les réponses immunes (Dejean, Beisner et al. 2009). En effet, les souris Foxo3^{-/-} présentent une réponse lymphocytaire T CD4 et T CD8 exacerbée comparée aux souris Foxo3^{WT} avec néanmoins la même cinétique de réponse au virus LCMV. Des expériences de chimères hématopoïétiques et de transferts de LT montrent que ce phénotype est dépendant du compartiment myéloïde. Plus particulièrement, les cellules dendritiques

(DC) issues de souris *Foxo3*^{-/-} permettent d'accroître la survie des LT *in vitro* et *in vivo*. Cette survie accrue des LT est associée à une augmentation de la production d'IL-6, de TNF- α et de CCL2 (MCP-1) par les DC. L'augmentation de la réponse lymphocytaire est dépendante uniquement de l'IL-6 puisque le traitement des souris avec un anticorps anti-IL-6R α à J-1 et J+4 durant l'infection LCMV permet de diminuer le nombre de LT CD4 et LT CD8 (Dejean, Beisner et al. 2009).

En plus de son rôle dans le contrôle de la production de cytokines pro-inflammatoires dans les DC, *Foxo3* régule également négativement la production d'Interféron de type I par les macrophages soulignant encore son rôle crucial dans les réponses antivirales (Litvak, Ratushny et al. 2012). Les macrophages *Foxo3*^{-/-} présentent un taux basal plus élevé d'ARNm d'IRF7. Cette augmentation d'IRF7 est associée à une sécrétion plus élevée d'IFN de type I par les macrophages *Foxo3*^{-/-} stimulés avec de l'acide Polyinosinic-Polycytidylic (PIC), un substitut chimique mimant l'ARN double brin (ARNdb). De façon intéressante, des sites de fixation pour les facteurs *Foxo* sont présents au niveau du promoteur d'*Irf7* et l'analyse par ChIP-seq montre une fixation de *Foxo3* au niveau de ces sites. De plus *Foxo3* forme également un complexe avec le corépresseur NCOR2 (Nuclear co-repressor 2) et l'histone déacétylase HDAC3 et permet l'inhibition du gène *Irf7*. Dans les monocytes humains, FOXO3 contrôle également la production d'IL-10 et de TNF- α de façon TGF- β 1-dépendante (Lee, Espeli et al. 2013).

2.2.2. Rôles de *Foxo3* dans les lymphocytes T

Le rôle de *Foxo3* dans les cellules du système immunitaire adaptatif n'a que peu été étudié car *Foxo3* est peu ou pas exprimé à l'état basal dans les LT CD4 et les LT CD8. Néanmoins, il est requis pour l'apoptose des LT via le contrôle transcriptionnel de l'expression de *PUMA*, *Bim*, *Trail* et *FasI* (Brunet, Bonni et al. 1999, Charvet, Canonigo et al. 2006). FOXO3 participerait également à l'apoptose des LT CD4 chez des patients infectés par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH). De façon intéressante d'autres virus comme le HLTV-1 (Human T Lymphotropic Virus Type 1) inhiberaient l'activité de FOXO3 pour permettre la survie des LT CD4 infectés (Dabrowska, Kim et al. 2008 , Olganier, Sze et al. 2014).

Foxo3 est également requis dans l'apoptose des LT CD8 lors d'une infection par le virus LCMV puisque les LT CD8 Foxo3^{-/-} présentent des niveaux moins élevés de la protéine Bim et on observe une augmentation de la quantité de LT CD8 spécifiques du virus sans changement dans la proportion de SLECs ou MPECs suggérant donc que Foxo3 participe à l'apoptose des LT CD8 lors d'une infection virale (Sullivan, Kim et al. 2012, Sullivan, Kim et al. 2012).

Pour conclure les facteurs Foxo exercent des rôles redondants mais également spécifiques dans les cellules du système immunitaire (SI), et cette régulation dépend du niveau d'expression et du moment où les facteurs Foxo sont exprimés. Leur régulation dynamique permet l'activation ou la répression de nombreux gènes impliqués dans la migration, la survie et la différenciation des cellules du système immunitaire.

Chapitre III : Rôles des protéines T-box dans le système immunitaire

Les FT appartenant à la famille T-box jouent des rôles pléiotropes chez tous les métazoaires. Découvert par Dobrovolskaïa-Zavadskaïa et collaborateurs en 1927, le premier membre de la famille T-box, le gène *T* (aussi connu sous le nom de *Brachyury* ou *T-box Transcription factor T*) joue un rôle essentiel dans la formation des membres chez les métazoaires, et également le développement du mésoderme et de la notochorde chez les vertébrés (Russ, Wattler et al. 2000). 50 ans plus tard, le séquençage du gène *T* permit la classification de cette protéine parmi les FT de transcription et la découverte de nombreuses protéines possédant le même site de fixation à l'ADN. Aujourd'hui, 5 sous-familles ont été identifiées : la sous-famille T, Tbx1, Tbx2, Tbx6 et Tbr1 qui jouent des rôles spécifiques et complémentaires au cours de l'embryogénèse et du développement de certains organes (**Figure 18**). La sous-famille Tbr1 nous intéresse plus particulièrement car elle comprend les gènes *Tbx21* (qui code pour le FT T-bet), *Tbr2* (qui code pour le FT Eomes) et *Tbr1* (qui code pour le FT T-box Brain). Ces gènes (à l'exception de Tbr1) jouent des rôles essentiels dans le système immunitaire.

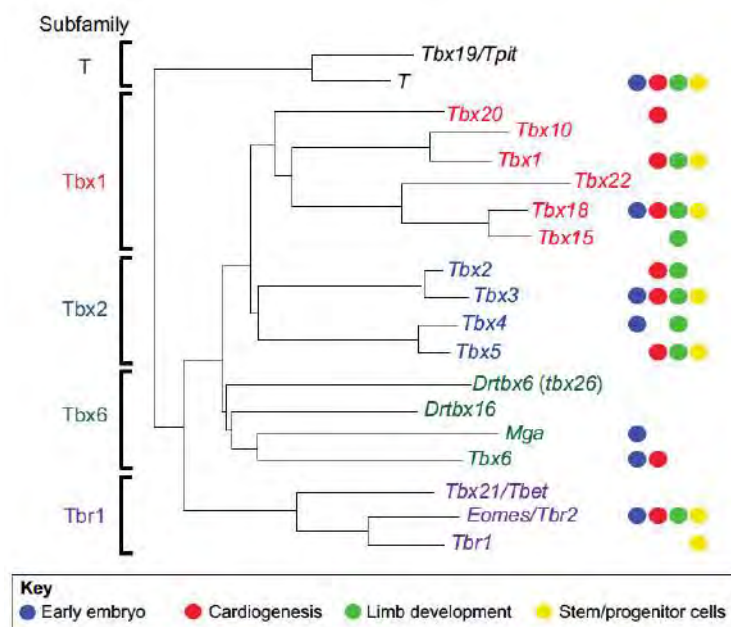


Figure 18 – Arbre phylogénétique de la famille T-box chez les vertébrés.

Tous les gènes représentés sur cet arbre, à l'exception de *Drtbx6* et *Drtbx16* sont présents chez l'Homme et la souris. La famille T-box est décomposée en 5 sous-familles qui jouent des rôles dans l'**embryogénèse**, la **cardiogenèse**, le **développement des membres** et dans les **cellules souches**. (Adapté de Papaioannou et al., 2014)

1. Structure et rôles des protéines T-box

Tous les facteurs de transcription T-box possèdent un domaine de fixation à l'ADN hautement conservé, également appelé le domaine T-box d'environ 180-200 acides aminés et se fixe sur une séquence consensus 5'-AGGTG(T/A)(G/T)AAA-3' appelé le T-box Binding Element (TBE). D'un point de vue structurel, ces FT sont caractérisés par un domaine de transactivation, une séquence d'import dans le noyau (NLS) et un domaine de fixation à l'ADN de taille variable entre les différents facteurs T-box. Néanmoins les protéines T-bet et Eomes n'ont toujours pas de structures complètement identifiées contrairement à certains autres FT de type T-box (Pearce, Mullen et al. 2003, Papaioannou 2014) (**Figure 19**).

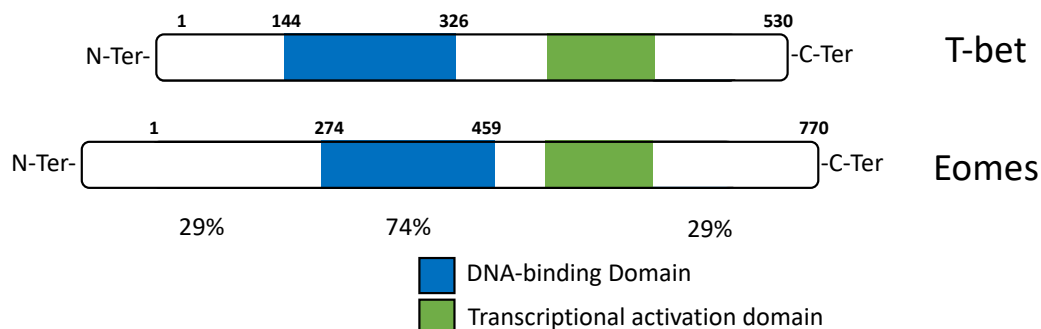


Figure 19 – Structure des protéines de type T-box. Les FT T-bet et Eomes sont composés d'un domaine de fixation à l'ADN hautement conservé (>74% d'homologie), et de domaines N-terminaux et C-Terminaux moins conservés (<29%) qui contiennent le domaine de trans-activation. En plus de ces domaines, certaines protéines T-box possèdent un domaine de trans-répression. **Illustration adaptée de Pearce et al., 2003**

Ces FT jouent des rôles importants dans la mise en place de modifications épigénétiques dans les tissus et cellules où ils sont exprimés, créant un accès plus ou moins restreint à la machinerie de transcription et donc permettent de moduler l'activité génique au sein des cellules (Miller, Huang et al. 2008) .

2. Fonctions des protéines T-box dans le système immunitaire

T-Bet et Eomes sont les seuls membres de la famille T-box qui sont exprimés dans le système immunitaire. Comme ils partagent 74% de similarité de séquence au niveau du site T-box, il a longtemps été pensé que ces 2 FT avaient des rôles redondants puisqu'ils pouvaient, en théorie, se fixer sur les mêmes séquences consensus au

niveau de l'ADN. Néanmoins, le fait que le reste de la protéine présente des pourcentages de similarité de séquence faible suggère qu'Eomes et T-bet pourraient avoir des partenaires différents. Le développement de souris invalidées pour T-bet et/ou Eomes a permis d'établir les rôles spécifiques de ces FT dans les NK, les ILCs et les Lymphocytes où ils sont majoritairement exprimés.

2.1. Rôles d'Eomes et de T-bet dans le développement et les fonctions des lymphocytes T

2.1.1. Fonctions dans les lymphocytes T CD8

Le rôle d'Eomes dans les lymphocytes T a été décrit pour la première fois par *Reiner et collaborateurs* en 2003 où ils montrèrent qu'Eomes peut compléter les fonctions de T-bet et qu'il participe activement à l'expression des gènes *Ifng* et *Grzb* *in vitro* et *in vivo*, notamment dans les LT CD8. En effet, Les LT CD8 issus de souris T-bet^{-/-} ne présentent pas de défauts majeurs de production d'IFN- γ , de Perforine et de Granzyme B. En revanche, l'utilisation de retrovirus codant pour une forme dominante négative de T-bet induit une diminution de la production d'IFN- γ et de Granzyme B dans les LT CD8 activés ce qui suggère que T-bet entraine en compétition avec un autre FT pour la régulation de l'expression du gène *Ifng* et *Grzb* (Pearce, Mullen et al. 2003). En amplifiant la séquence du domaine T-box de T-bet dans les LT CD8, ils mirent en évidence que certains amplicons appartenaient à un autre FT de type T-box : Eomesodermin (Eomes). Eomes est faiblement exprimé dans les LT CD8 naïfs et son expression augmente suite à l'engagement du TCR. La surexpression de ce FT permet la production de Granzyme B et Perforine en coopération avec le FT Runx3 (Cruz-Guilloty, Pipkin et al. 2009). Cependant Eomes et T-bet jouent ici encore des rôles spécifiques, puisque la surexpression d'Eomes dans les LT CD8 T-bet^{-/-} ne permet pas de restaurer l'expression de la chaîne β de l'IL-12R montrant ainsi un rôle spécifique pour T-bet dans les LT CD8. Cette hypothèse de non-redondance est renforcée par le fait que ces deux FT ne s'expriment pas au même moment dans les LT CD8 : l'expression de T-bet augmente après activation des LT CD8 via le TCR alors qu'Eomes semble requis durant la phase mémoire. En effet, dans un modèle d'infection par *L. monocytogenes*, T-bet est régulé positivement lors d'une interaction TCR-CMH-I-peptide et cette expression est amplifiée par la voie de l'IL-12 via STAT4.

Une forte signalisation par l'IL-12 va orienter les LT CD8 vers une différenciation en « Short Lived Effector Cells » (ou SLECs) via l'activation soutenue de la voie mTOR et de son activité kinase. Cette même voie de signalisation va inhiber l'expression d'Eomes (Takemoto, Intlekofer et al. 2006). La répression d'Eomes par la voie mTOR est due au fait que dans les LT CD8, son expression est dépendante de la protéine Foxo1 qui, comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, est inhibée lors de l'activation de la voie mTOR (Rao, Li et al. 2010, Rao, Li et al. 2010). Ainsi, l'IL-12 agit comme un interrupteur qui permet d'enclencher l'expression de T-bet et d'abroger l'expression d'Eomes de façon mTOR-Foxo1 dépendante (Rao, Li et al. 2012, Hess Michelini, Doedens et al. 2013). En revanche, l'expression d'Eomes est corrélée à la mise en place de la population « Memory Precursors Effector Cells » (ou MPECs). En effet, la déficience en Eomes se traduit par une absence totale de LT CD8 mémoires (Intlekofer, Takemoto et al. 2005, Banerjee, Gordon et al. 2010). Cette différence d'expression temporelle d'Eomes et de T-bet est également due au fait que les cytokines capables d'induire l'expression de ces facteurs sont différentes. L'IL-2, l'IL-4 et l'IL-15 induisent l'expression d'Eomes dans les LT CD8 périphériques (Carty, Koretzky et al. 2014, Prince, Kraus et al. 2014, Renkema, Lee et al. 2016). De façon intéressante, la voie de signalisation de l'IL-15 nécessite l'expression de CD122, l'un des gènes cibles d'Eomes dans les LT CD8. Ainsi Eomes amplifie sa propre expression via l'augmentation de la voie de l'IL-15, et l'IL-15 est requise pour la survie des LT CD8 mémoires (Nakazato, Yamada et al. 2007). En revanche, l'IL-21 réprime l'expression d'Eomes et de ses gènes cibles Perforine, et CD44 (Cruz-Guilloty, Pipkin et al. 2009, Pipkin, Sacks et al. 2010, Zhu, Ju et al. 2010).

Ces effets opposés sont médiés par les FT activés, en aval de la signalisation des différents récepteurs. L'IL2 et l'IL-15 activent les voies JAK/STAT5a/b alors que l'IL-21, quant à elle, active STAT3, suggérant ainsi l'implication des protéines STATs dans l'activation et la répression d'Eomes. De plus, des sites de fixation de STAT5a ont été identifiés par ChIP-Sequencing à proximité du gène *Eomes* en position -3,3ks et +14,6kbs autour du site de départ de la transcription (TSS) (Grange, Verdeil et al. 2013). En revanche, le rôle de STAT3 n'est pas très clair car si l'IL-21 permet de réprimer Eomes dans les LT CD8, les LT CD8 STAT3^{-/-} ne présentent pas de défaut d'expression d'Eomes durant la phase effectrice d'une infection LCMV, alors que dans la phase mémoire, les LT CD8 présentent des niveaux moindres d'Eomes (Cui, Liu et

al. 2011). Cependant, ce phénotype est associé à une augmentation de la réponse à l'IL-12 qui inhibe l'expression d'Eomes et favorise celle de T-bet, on ne sait donc pas avec certitude si l'expression d'Eomes est STAT3 ou STAT4-dépendante (Takemoto, Intlekofer et al. 2006). En plus des protéines STATs et de Foxo1, TCF-1 participe positivement à la régulation d'Eomes en se fixant directement sur sa séquence cible « 5'-CTTTG-3' » située à environ 4kb du TSS d'Eomes (Zhou, Yu et al. 2010). La délétion ubiquitaire d'Eomes étant létale, la génération de souris Eomes^{fl/fl}xCD4-Cre a permis une meilleure compréhension des rôles respectifs d'Eomes et de T-bet. Ces deux FT coopèrent pour réprimer l'expression des gènes du lignage Tc17 dans les LT CD8 effecteurs durant une infection par le LCMV chez des souris double KO (Eomes^{fl/fl}xCD4Cre ; T-bet^{-/-}) (Intlekofer, Banerjee et al. 2008). En effet, l'expression de T-bet mais pas d'Eomes est requise pour réprimer la production d'IL-17 par les LT CD8, ce qui suggère que T-bet joue un rôle plus important dans le contrôle du locus *Il17*. Par contre, la coopération des deux facteurs semble être requise pour le contrôle de l'expression de ROR- γ t, IL-23R, IL-21 et IL-22 car seuls les LT CD8 double-déficients pour T-bet et Eomes expriment ces molécules (Intlekofer, Banerjee et al. 2008, Ciucci, Vacchio et al. 2017).

Enfin, l'expression d'Eomes semble être associée à l'exhaustion des LT CD8 puisque dans un modèle murin d'infection chronique par la souche LCMV « Docile » et chez des patients HIV, les LT CD8 expriment de forts niveaux de récepteurs inhibiteurs tels que PD-1, TIM-3 et 2B4 et sont associés à un fort taux d'Eomes. En revanche les cellules qui expriment de forts taux de T-Bet (T-Bet^{high} Eomes^{dim}) n'expriment que très faiblement PD-1 (Buggert, Tauriainen et al. 2014, Man, Gabriel et al. 2017, Bengsch, Ohtani et al. 2018). L'ensemble des facteurs influençant l'expression d'Eomes et de T-bet dans les LT CD8 ainsi que les gènes qu'ils régulent sont synthétisés sur la **Figure 21** :

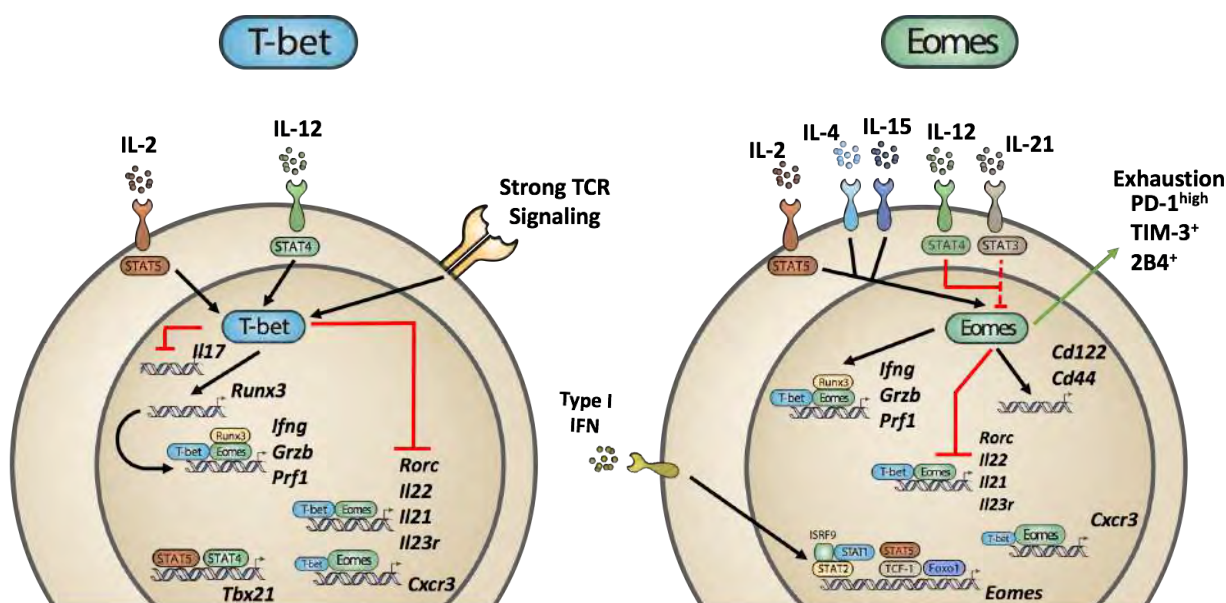


Figure 21 – Schéma récapitulatif des principales voies de régulation de T-Bet et d'Eomes dans les lymphocytes T CD8 ainsi que les gènes qui sont régulés par ces deux facteurs de transcription.

2.1.2. Fonctions dans les lymphocytes T CD4

Dans le compartiment T CD4, nous avons vu que T-bet joue un rôle crucial dans le développement de la sous-population Th1 et l'inhibition des autres lignages, alors que le rôle d'Eomes reste plus controversé. Bien qu'Eomes ne soit pas exprimé par les LT CD4 naïfs, son expression augmente suite à l'engagement du TCR et en conditions neutres et polarisantes *in vitro* (Suto, Wurster et al. 2006, Stienne, Michieletto et al. 2016). Dans les LT CD4, Eomes comme T-bet, permet la production d'IFN- γ . De plus, l'expression ectopique de T-bet ou d'Eomes permet la production d'IFN- γ par les Th2 ou les Th17 (Szabo, Kim et al. 2000, Villarino, Gallo et al. 2010, Eshima, Chiba et al. 2012). Eomes semble donc également important pour la bonne différenciation des LT CD4 en Th1 et pour l'inhibition des autres lignages, probablement en coopération ou en synergie avec T-bet. Cette hypothèse semble d'autant plus vraie que de nombreuses voies de signalisation inhibent l'expression d'Eomes dans les autres lignages CD4. En effet, Eomes contrôle négativement la production d'IL-5 et positivement la production d'IFN- γ et d'IL-10 dans les Th2, et les Tr1 (Endo, Iwamura et al. 2011, Zhang, Lee et al. 2017). De plus, Eomes mais pas T-

bet, est exprimé dans les Th2 mémoires au même niveau que dans les Th1 et permet la répression du locus *Il5* dans ces cellules. Le mécanisme d'action est indirect car Eomes s'associe à GATA-3 *via* son domaine T-box et empêche la fixation de GATA-3 au niveau du promoteur de l'*IL-5*. Inversement, l'expression de GATA-3 inhibe l'expression de Runx3 qui lui-même régule positivement l'expression d'Eomes (Yagi, Junttila et al. 2010).

En plus de son rôle pour la production d' $\text{IFN-}\gamma$ par les Th1, Eomes est nécessaire pour le contrôle de la balance Th1 *versus* Th17. En effet, dans les Th17, Eomes est inhibé en présence d'*IL-6* probablement sous l'effet des protéines STAT3 (Yang, Xu et al. 2008). Eomes est également inhibé par le $\text{TGF-}\beta$ de façon Smad2/Smad3 indépendante, mais *via* la voie Jnk/c-Jun. En effet, l'inhibition de c-Jun à l'aide de ShRNA augmente l'expression d'Eomes alors que l'expression forcée de c-Jun diminue l'expression d'Eomes. L'expression d'Eomes est négativement associée à l'expression des ARN messagers de $\text{ROR}\gamma\text{T}$ et de l'*IL-17*, qui sont des gènes cibles d'Eomes puisqu'ils possèdent à proximité de leurs zones promotrices, des sites de fixation des facteurs T-box (Ichiyama, Sekiya et al. 2011). Cependant, il a récemment été montré à l'aide de souris reportrices Eomes-Cherry, qu'Eomes pouvait être exprimé par une sous-population particulière de Th17 identifiable grâce aux récepteurs CCR6 et CCR2. Alors que les Th17 $\text{CCR6}^-\text{CCR2}^+$ expriment majoritairement T-bet et sont considérés comme « pathogéniques » de par leur production d' $\text{IFN-}\gamma$ et de GM-CSF, les Th17 $\text{CCR6}^+\text{CCR2}^+$, quant à eux, expriment Eomes (Kara, McKenzie et al. 2015) et ont un potentiel pro-inflammatoire moins important. Eomes joue également un rôle dans les Tr1 où il contrôle directement la production d'*IL-10* et permet de protéger du développement de la GvHD (Graft versus Host Disease) et participe directement ou indirectement à la production de GM-CSF *in vitro* et *in vivo* (Raveney, Oki et al. 2015, Stienne, Michieletto et al. 2016, Zhang, Lee et al. 2017). Dans un modèle murin de sclérose en plaques, l'Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale (EAE), une population de LT CD4 Eomes⁺ est nécessaire pour le développement d'une inflammation chronique au niveau du CNS. Cette population apparaît dans la phase tardive de l'EAE, et semble cytotoxique puisque les LT CD4 expriment des niveaux plus élevés de Granzyme B et de Perforine que les LT CD4 Eomes⁻ (Raveney, Oki et al. 2015). Ce caractère cytotoxique a également été observé

dans plusieurs autres modèles tumoraux où il a été montré qu'une fraction de LT CD4 expriment Eomes et sont capables de produire des molécules cytolytiques (Qui, Hagymasi et al. 2011, Curran, Geiger et al. 2013). Chez l'Homme cette population a également été observée, mais il semblerait que l'acquisition des fonctions cytotoxiques soit dépendante de RUNX3 et de T-BET (Serroukh, Gu-Trantien et al. 2018).

Il est donc important de noter qu'Eomes et T-bet exercent des fonctions spécifiques mais aussi redondantes et leurs fonctions sont différentes en fonction du type cellulaire dans lesquels ils sont exprimés (**Figure 22**).

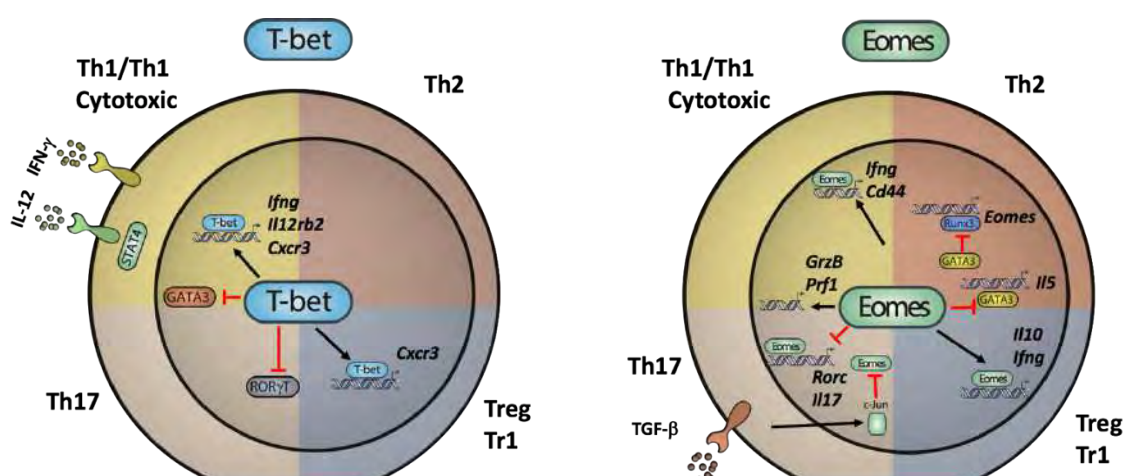


Figure 22 – Schéma récapitulatif des principales voies de régulation de T-Bet et d'Eomes dans les différents sous-types de lymphocytes T CD4 ainsi que les gènes qui sont régulés par ces deux facteurs de transcription.

Ainsi ces facteurs jouent des rôles importants et parfois opposés dans les différentes cellules du système immunitaire, et participe à la régulation de la magnitude de la réponse immunitaire lors d'infections ou dans les maladies auto-immunes.

2.2. Rôles d'Eomes et de T-bet dans le développement et les fonctions des cellules NK

Les NK sont des cellules de l'immunité innée qui permettent de lutter efficacement contre des pathogènes intracellulaires et agissent comme des sentinelles capables de détecter toute cellule anormale de l'organisme comme par exemple des cellules tumorales. Ces cellules ont été récemment classées parmi les cellules lymphoïdes innées du groupe 1 (ILC1) caractérisées par une forte production d'IFN- γ et de molécules cytotoxiques telles que la Perforine et le Granzyme B (Serafini, Vosshenrich et al. 2015). C'est durant le développement, et plus particulièrement au stade

précurseur NK (NKp) qu'Eomes et T-bet commencent à être exprimés de façon très faible (Levanon, Negreanu et al. 2014). L'expression de CD122, la chaîne β commune aux récepteurs de l'IL-2 et de l'IL-15, va permettre d'induire l'expression d'Eomes qui lui-même régule positivement CD122. L'invalidation d'Eomes dans les NK conduit à une diminution drastique du nombre de NK en périphérie démontrant ainsi le rôle essentiel de ce FT dans le développement des NK (Gordon, Chaix et al. 2012). Alors que T-bet est impliqué dans la maturation des NK, Eomes semble en plus requis pour le développement de cette population. En effet, les souris T-bet^{-/-} présentent un nombre élevé de NK immatures (CD27⁺CD11b⁺), alors que les souris Eomes^{+/-} T-bet^{-/-} présentent un défaut de développement du compartiment NK et une diminution de l'expression de CD49b (DX5) (Pikovskaya, Chaix et al. 2016). Plus la maturation des NK va avancer, et plus le ratio T-bet/Eomes va augmenter suggérant que ces deux FT jouent des rôles uniques dans la formation des différents lignages de NK. Lors de la maturation terminale des NK, l'expression de T-bet augmente fortement au détriment d'Eomes et permet l'expression de nombreux gènes impliqués dans la migration comme CXCR3, S1P5, KLRG1 et CD11b par exemple (Robbins, Tessmer et al. 2005). Dans les NK, T-bet (et dans une moindre mesure Eomes) est nécessaire pour la production d'IFN- γ mais la déficience en ces deux FT n'abolit pas pour autant la production de cette cytokine, suggérant que d'autres molécules sont impliquées. Ces deux FT semblent se réguler mutuellement car l'invalidation de T-bet induit une surexpression d'Eomes alors que les NK surexprimant T-bet présentent des niveaux plus faibles d'Eomes (Townsend, Weinmann et al. 2004, Daussy, Faure et al. 2014). En effet, il est connu que dans les LT CD4, T-bet induit des modifications épigénétiques au niveau du locus d'*Eomes* suggérant donc un rôle actif de T-bet dans la régulation de l'expression d'Eomes (Zhu, Jankovic et al. 2012). Certaines cytokines comme l'IL-2, l'IL-15 et l'IL-18 permettent d'augmenter l'expression de T-bet et Eomes alors que le TGF- β inhibe l'expression de T-bet via les protéines Smad et dans une moindre mesure, inhibe l'expression d'Eomes (Viel, Marcais et al. 2016). T-bet et Eomes sont tous les deux capables d'initier l'expression de *Cd122* et il semblerait qu'Eomes, mais pas T-bet, soit impliqué dans la production de Granzyme B et Perforine puisque les ILC1 Eomes⁻ expriment des niveaux plus faibles de molécules cytotoxiques (Daussy, Faure et al. 2014). De façon intéressante, l'expression de T-bet et Eomes permet la différenciation de différents types de NK puisque l'expression de

T-bet donne naissance à des NK qui vont se développer dans le foie et l'expression d'Eomes permet la différenciation de NK qui se développent dans la moelle (Daussy, Faure et al. 2014). Ces deux populations de NK ont des fonctions effectrices différentes. En effet les NK qui expriment T-bet mais pas Eomes (T-Bet⁺Eomes⁻) sécrètent de grandes quantités de TNF- α et d'IL-2 alors que les NK T-Bet⁻Eomes⁺ produisent majoritairement de l'IFN- γ . Ces résultats montrent donc que l'expression exclusive de T-bet ou Eomes est nécessaire pour la différenciation de deux lignages NK aux fonctions distinctes.

Les principaux gènes cibles et des facteurs influant sur l'expression de T-bet et Eomes sont synthétisés sur la **Figure 23**

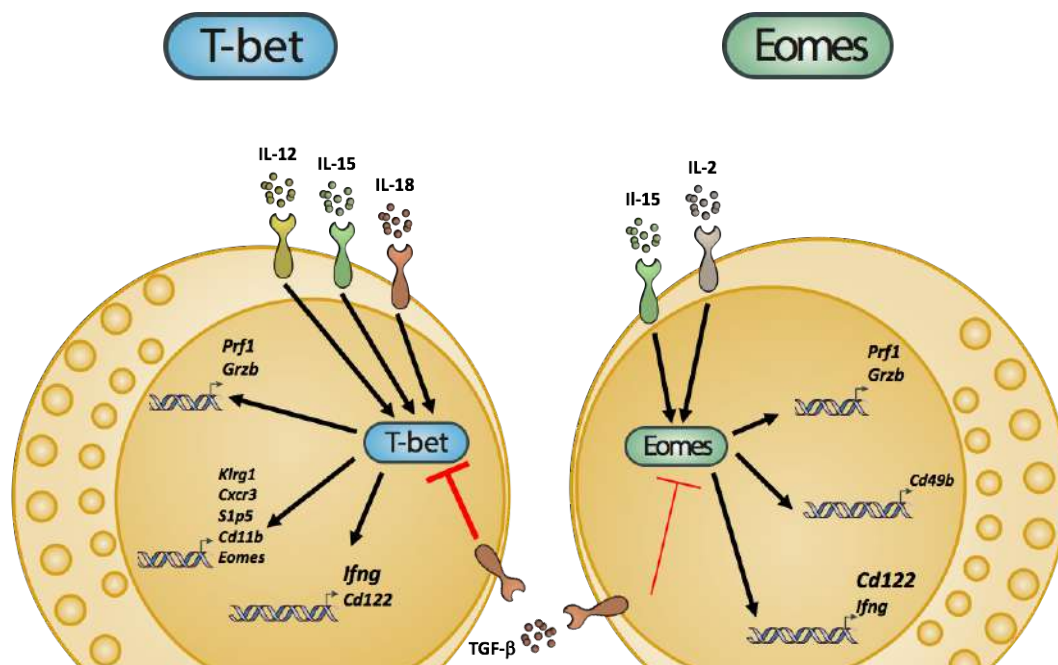


Figure 23 – Schéma récapitulatif des principales voies de régulation de T-Bet et d'Eomes dans les NK ainsi que les gènes qui sont régulés par ces deux facteurs de transcription.

Il est donc plus que probable qu'Eomes et T-bet permettent d'initier de façon plus ou moins soutenue l'expression des mêmes gènes, et que ces différences de fonctions sont hautement dépendantes du type de NK où sont exprimés/co-exprimés ces deux FT. Ainsi, les fonctions et les gènes cibles d'Eomes et de T-bet semblent varier et il a été montré que dans certains cas Eomes et T-bet pouvaient compenser l'absence d'un des deux FT pour la régulation génique.

Chapitre IV : Facteurs de Transcription et susceptibilité au maladies auto-immunes : cas de la Sclérose en Plaques et de son modèle murin.

1. Identification des facteurs impliqués dans le développement de la Sclérose En Plaques.

La Sclérose En Plaques (SEP) est une maladie inflammatoire du système nerveux central d'origine auto-immune. Cette maladie touche plus de 2,5 millions de personnes dans le monde dont plus de 100 000 cas en France. La prévalence Homme/Femme est d'environ 1/3 et se déclare principalement chez le jeune adulte. La SEP est une maladie dite « multifactorielle » ou complexe puisqu'elle dépend principalement de 3 facteurs : des facteurs génétiques, épigénétiques et environnementaux.

1.1. Gènes associés à la susceptibilité de la Sclérose en Plaques : De la génétique aux études d'association pangénomiques (GWAS).

Les chercheurs ont pu mettre en évidence une part importante de la génétique dans la susceptibilité à développer la maladie. En effet, le risque de développer une SEP est augmenté chez les individus dont un membre de la famille est atteint de la maladie, comparé à une personne n'ayant aucun cas de SEP dans sa famille qui lui a un risque relatif de 0,2%. De plus, plus le degré de parenté est proche, plus le risque augmente. Par exemple, dans une même famille, si un enfant est atteint de SEP, le risque que son frère développe également la maladie est de 2 à 4% soulignant ici un rôle du patrimoine génétique sur le développement de la maladie (Sadovnick, Ebers et al. 1996). L'importance de la génétique fût également démontrée par l'étude de jumeaux mono et dizygotes qui partagent respectivement 100% ou 50% de l'information génétique. Chez les « vrais » jumeaux le risque de développer une SEP si l'un des jumeaux est atteint monte à 30% contre seulement 5% pour des jumeaux dizygotes, restant néanmoins supérieur au risque de 3% dans le cas de frères/sœurs (Willer, Dyment et al. 2003).

Le séquençage et l'analyse du génome humain ont permis de mettre en évidence que les individus dans le monde entier ont un génome identique à 99.9% et qu'une petite fraction du génome est différente entre deux personnes. Il existe plusieurs formes de variations génétiques mais nous nous attarderons sur les

variations les plus fréquentes dans le génome : variations d'un seul nucléotide (Single Nucleotide Polymorphism ou SNP). Ces variations génétiques dans le génome proviennent de mutations ponctuelles héritées de nos ancêtres sous l'effet de pression de sélection qui peuvent conférer un avantage sélectif. Ces SNP sont plus ou moins importants en fonction de l'origine ethnique des individus mais on estime à plus de 10 millions le nombre de SNP dans le génome humain. Si ces polymorphismes sont si nombreux comment peuvent-ils conférer un risque accru de développer une SEP ? L'une des réponses à cette question vient du fait que de nombreux SNP se transmettent de génération en génération par blocs car ils se trouvent en déséquilibre de liaison. La notion de déséquilibre de liaison (Linkage Disequilibrium ou LD) est apparue dans les années 60 où il fut mis en évidence que certains SNP sont transmis de manière non-aléatoire et sont encadrés de zones de forte recombinaison (**Figure 24**) (Feldman, Lewontin et al. 1975). Ainsi, il est possible de calculer la probabilité que plusieurs SNP soient transmis par bloc en fonction du coefficient D' (dont la valeur peut être comprise entre 0 et 1). Plus ce coefficient est proche de 1, plus la probabilité que deux SNP soient transmis ensemble augmente.

Afin de mieux comprendre quels sont les SNP et les gènes impliqués dans le développement de la maladie, des études à grande échelle comparant des individus malades et non malades ont été mise en place : ce sont les études d'association pangénomiques ou GWAS (Genome Wide Association Studies).

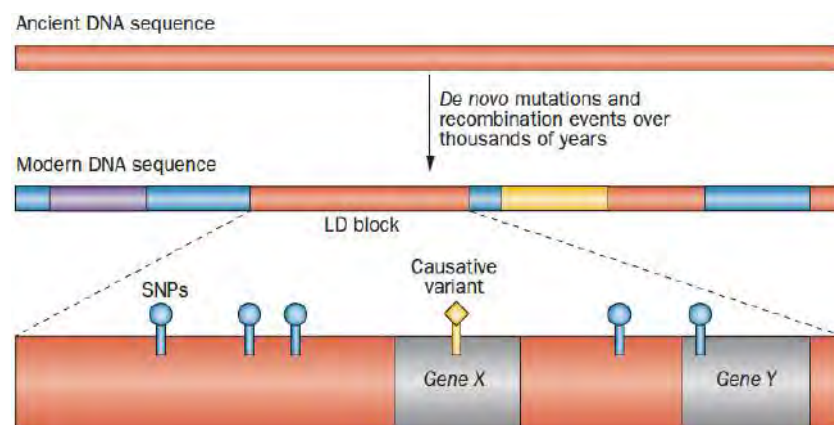


Figure 24 – Plusieurs SNPs peuvent être transmis de façon non-aléatoire s'ils se trouvent en déséquilibre de liaison. Au fur et à mesure de l'évolution, une ancienne séquence d'ADN accumule des mutations ponctuelles qui se transmettent au cours de l'évolution. Bien qu'elles soient plus au moins espacées dans le génome, elles sont transmises par bloc lorsqu'elles sont en déséquilibre de liaison (LD). Parmi tous les SNP transmis, un ou plusieurs SNP peuvent causer une susceptibilité augmentée aux maladies auto-immunes (**Causative Variant**), et sera tout le temps associé à d'autres SNP situés en LD. (*Adapté de Kirino et al 2015 Nature review rheumatology*)

1.2. Utilité et importance des études GWAS

Les études d'association pangénomique présentent l'avantage de déterminer sans a priori quelles sont les régions du génome qui sont présentes majoritairement chez des individus atteints d'une maladie par rapport à une population « saine ». Bien que très puissantes, ces études nécessitent un grand nombre d'individus pour s'assurer que les SNP identifiés soient réellement causaux de la maladie et que le poids statistique soit le plus important possible afin de limiter au maximum les faux positifs. En 2007, la première étude GWAS réalisée sur 6942 sujets atteints de SEP et 5418 patients contrôle, a pu mettre évidence 17 SNP plus fréquemment retrouvé chez les patients SEP que chez les individus sains (International Multiple Sclerosis Genetics, Hafler et al. 2007). Ces SNP se trouvent dans des régions impliquées dans la fonction, l'activation ou la régulation du système immunitaire comme par exemple, un SNP situé au niveau de l'intron 1 du gène *IL2RA* (codant pour la molécule CD25), ou encore un autre SNP non-synonyme situé dans l'exon 6 du gène *IL7RA* (codant pour la molécule CD127) (International Multiple Sclerosis Genetics, Hafler et al. 2007). De façon intéressante, ces *loci* de susceptibilité ne sont pas propres à la SEP mais sont retrouvés dans de nombreuses maladies auto-immunes comme le diabète de type 1 (T1D), ou dans la maladie de Graves (Brand, Lowe et al. 2007). A l'heure actuelle, plus de 110 loci de susceptibilité ont été découverts grâce à la comparaison du génome de 15 000 patients SEP versus 24 000 individus sains (International Multiple Sclerosis Genetics, Beecham et al. 2013). Et parmi ces 110 loci, 97 sont à moins de 50kb de gènes impliqués dans la régulation du système immunitaire et 35 sont liés au GO Term « Immune System Process » et sont retrouvés au moins dans une maladie auto-immune. En 2016, une méta-analyse de l'étude de 2013 a listé sur chaque chromosome les gènes associés au développement de la SEP (**Figure 25**).

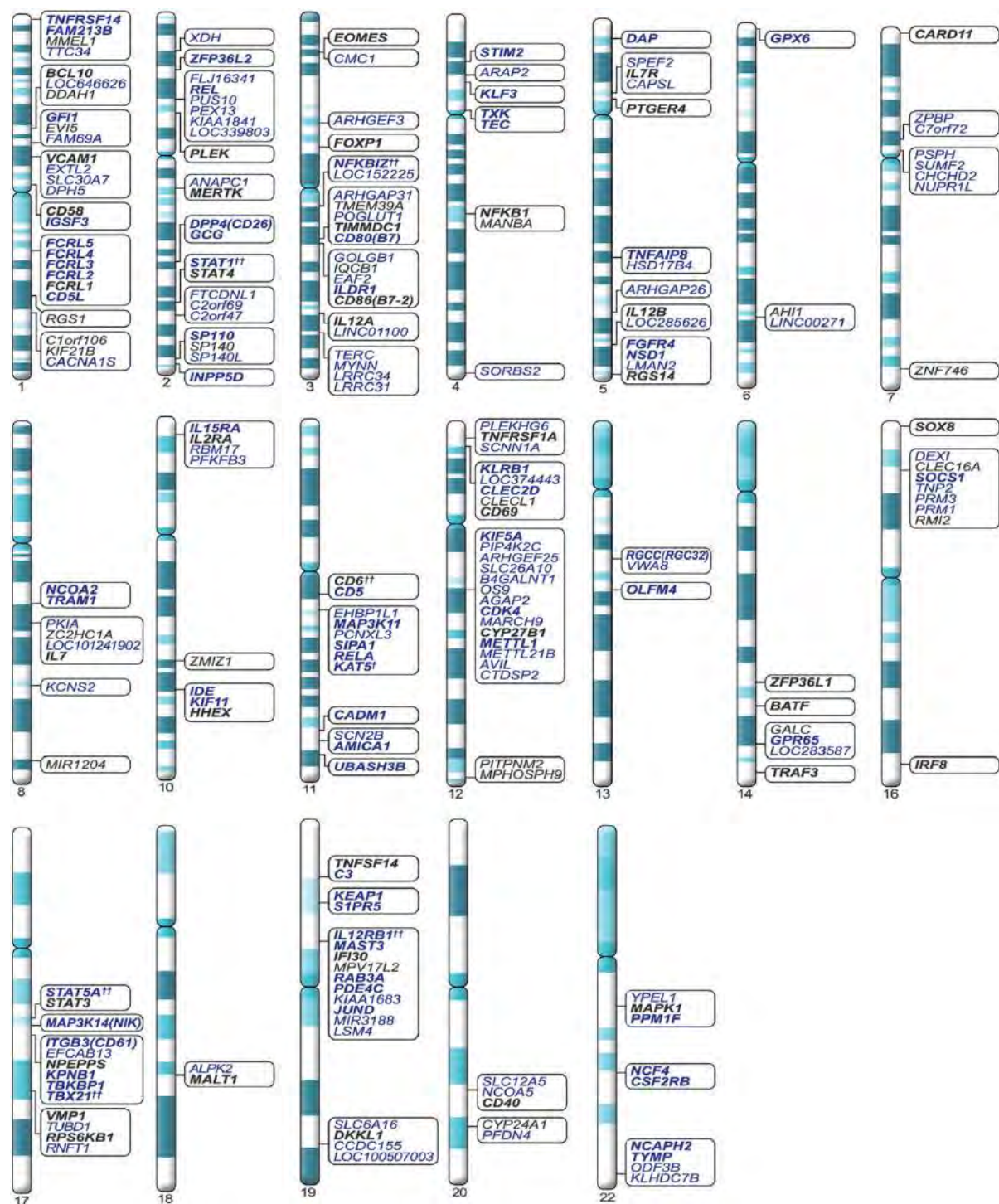


Figure 25 – Atlas génétique de la Sclérose En Plaques. Les gènes de susceptibilité connus à ce jour sont positionnés sur leurs chromosomes respectifs. En gras sont représentés les gènes impliqués dans la régulation du système immunitaire (avec en bleu les gènes nouvellement découverts et en noir les anciens gènes découverts lors des précédentes études GWAS). *Hussman et al., 2016 Genes and Immunity*

On y voit ici que de nombreux gènes sont impliqués dans la régulation du système immunitaire, et plus particulièrement, dans la différenciation des LT CD4. Parmi ces gènes on retrouve EOMES, les protéines de type STAT1, STAT4, STAT3 et STAT5 qui sont importantes pour la différenciation Th1, Th17 et Treg et des protéines des voies de signalisation en aval et en amont du programme de différenciation des LT CD4 (International Multiple Sclerosis Genetics, Beecham et al. 2013, Hussman, Beecham et al. 2016).

1.3. Rôles des Facteurs de transcription T-BOX et FOXO chez l'Homme

Bien que FOXO3 ne fasse pas partie des gènes de susceptibilité à la SEP, plusieurs polymorphismes ont été identifiés dans d'autres maladies auto-immunes. En effet, le SNP rs12212067 : T>G diminue la susceptibilité à la Polyarthrite Rhumatoïde lorsqu'un individu susceptible porte l'allèle mineur (G) mais augmente les risques de développer une malaria plus sévère. C'est le seul polymorphisme qui a été identifié comme modifiant non pas les risques de développer la maladie, mais la sévérité de la maladie (Lee, Espeli et al. 2013). Ce facteur est également associé à la longévité de certaines populations humaines qui portent des polymorphismes particuliers à proximité des zones régulant l'expression de FOXO3.

EOMES semble jouer un rôle important chez l'Homme, en particulier dans les réponses anti-tumorales, où son expression par les LT CD4 et CD8 est associée à une meilleure élimination des tumeurs comme par exemple l'Ipilimumab (anti-CTLA4), qui permet d'augmenter la proportion de ces LT EOMES⁺. En parallèle de son rôle bénéfique dans le cancer, EOMES semble jouer un rôle délétère dans les maladies auto-immunes. En effet, les patients SEP qui ont des formes très sévères de sclérose en plaques, forme dite « secondaire progressive », présentent des proportions élevées de LT CD4 exprimant EOMES que ce soit au niveau du sang circulant ou au niveau du liquide céphalorachidien (LCR) (Raveney, Oki et al. 2015). Dans le psoriasis, des niveaux élevés de mRNA d'EOMES sont détectés au niveau des lésions psoriasiques (Sahmatova, Sugis et al. 2017). Enfin, EOMES a été identifié comme locus de susceptibilité dans la PR et la SEP (Patsopoulos, Bayer Pharma et al. 2011, International Multiple Sclerosis Genetics, Beecham et al. 2013, Okada, Wu et al. 2014).

Dans la SEP, plusieurs SNPs ont été identifiés à proximité du locus d'*EOMES* : le SNP rs170934 situé à 150kb du locus, le SNP rs2371108 situé quelques kb après *EOMES*, et enfin, le SNP rs11129295 situé à -20kb de la région promotrice. Ces SNPs sont situés dans des zones génomiques plus ou moins conservées dans les différentes espèces ce qui laisse penser que ces régions peuvent correspondre à des régions régulatrices de type « enhancer » notamment pour le rs170934 (International Multiple Sclerosis Genetics, Wellcome Trust Case Control et al. 2011, Patsopoulos, Bayer Pharma et al. 2011, International Multiple Sclerosis Genetics, Beecham et al. 2013). Bien que très utile pour la découverte de loci de susceptibilité dans les maladies auto-immunes, les GWAS restent néanmoins seulement associatives et des analyses fonctionnelles sont nécessaires afin d'évaluer la conséquence de chacun des gènes identifiés sur la maladie.

2. Physiopathologie de la SEP et l'EAE

2.1. Rôles des lymphocytes T CD4.

Les lymphocytes T CD4 jouent un rôle critique pour la mise en place des réponses immunitaires et pour l'inflammation du système nerveux central. En effet, dans la SEP, on observe une forte corrélation entre le locus du CMH-II et la maladie, et nous l'avons vu les GWAS ont également montrés que de nombreux gènes impliqués dans la migration ou la différenciation des lymphocytes T apparaissent dérégulés chez les patients malades. Enfin le développement de modèles animaux a permis de mettre en évidence un rôle crucial de certaines sous-population de lymphocytes T dans le développement de la maladie.

En effet les premières études montrèrent que les Th1 mais pas les Th2 sont capables d'induire l'EAE chez le rongeur et également que chez les patients SEP, on retrouve une grande quantité de transcrits de l'IFN- γ au niveau des lésion (Rangachari and Kuchroo 2013). Néanmoins l'IFN- γ et les Th1 ne sont pas les seuls acteurs impliqués car les souris *ifng*^{-/-} ne sont pas résistantes à l'EAE, mais au contraire, présentent une maladie exacerbée (Ferber, Brocke et al. 1996). De plus, deux études indépendantes montrent que les souris *T-bet*^{-/-} développent une maladie légèrement retardée par rapport aux souris WT lorsqu'elles sont immunisées avec le peptide

MOG₃₅₋₅₅ (Grifka-Walk, Lalor et al. 2013, O'Connor, Cambrook et al. 2013). Ces résultats sont appuyés par d'autres études montrant également que les souris déficientes pour la sous-unité p35 de l'IL-12 (cytokine pro-Th1), succombent de la maladie alors que les souris invalidées pour l'autre sous-unité, la p40, sont complètement résistantes à la maladie (Becher, Durell et al. 2002). Ce paradoxe entre ces expériences vient du fait que la sous-unité p40, en s'associant avec la sous-unité p19, permet de former une autre cytokine : l'IL-23 (Oppmann, Lesley et al. 2000). De ce fait, l'IL-23 mais pas l'IL-12 semble importante pour le développement de la maladie. L'IL-23 est nécessaire pour la différenciation et le maintien des Th17 (Park, Li et al. 2005). En effet, dans l'EAE et chez les patients SEP, on retrouve des cellules productrices d'IL-17 au niveau des lésions dans le SNC (Lock, Hermans et al. 2002). Il apparaît donc que les Th1 et les Th17 sont des acteurs importants de la maladie chez l'Homme et son modèle murin.

Néanmoins, tous les Th1 et Th17 ne sont pas délétère dans la maladie. En effet, il apparaît surtout, qu'une fraction de ces cellules est capable de produire, en plus de l'IFN- γ et de l'IL-17, du GM-CSF qui lui semble jouer un rôle clé dans le développement de l'EAE (Codarri, Gyulveszi et al. 2011). Dans la SEP, on retrouve de grandes quantités de GM-CSF dans le LCR des patients, et également une augmentation de la fréquence des cellules qui produisent du GM-CSF (Carrieri, Provitera et al. 1998, Hartmann, Khademi et al. 2014, Noster, Riedel et al. 2014). En 2015, il a été mis en évidence que chez les patients SEP, les lymphocytes B produisent de grandes quantités de GM-CSF et que la déplétion des lymphocytes B est une thérapie très efficace dans la SEP (Li, Rezk et al. 2015).

Le GM-CSF permet le recrutement de cellules myéloïdes comme les macrophages et les neutrophiles qui vont participer à l'inflammation du CNS et la perméabilisation de la barrière hémato-encéphalique *via* les cytokines que ces cellules vont produire (Pierson, Wagner et al. 2018). Ces résultats sont néanmoins très dépendants du fond génétique dans lequel est induite l'EAE car dans certaines souches de souris développent une EAE même lorsque le GM-CSF est invalidé (Pierson and Goverman 2017).

2.2. Rôles des lymphocytes T CD8.

Même si la SEP est une maladie où les lymphocytes T CD4 jouent un rôle majoritaire, d'autres types cellulaires, comme les lymphocytes T CD8 et les lymphocytes B semblent également participer dans le développement de la maladie. En effet, si la déplétion des LT CD4 est très efficace pour prévenir le développement de l'EAE chez le rongeur, la déplétion des LT CD4 chez l'Homme n'a que peu d'impact sur la maladie. De plus, dans les lésions, on retrouve un ratio 10 : 1 entre lymphocytes T CD8 et CD4 et des coupes histologiques montrent que les LT CD8 se trouvent à proximité des neurones et des CPA (Neumann, Medana et al. 2002, Schneider, Mohebiany et al. 2011). Ces LT CD8 expriment un TCR oligoclonal ce qui suggère qu'ils sont issus de la prolifération d'un petit nombre de LT CD8 au départ (Babbe, Roers et al. 2000).

On suppose actuellement que ces lymphocytes appartiennent à un sous-type appelé les MAIT pour « Mucosal Associated Invariant T cells ». En effet, ces cellules expriment le marqueur CD161 à des niveaux élevés (Held, Bhonsle-Deeng et al. 2015). La proportion de lymphocyte CD8 CD161⁺ est augmentée chez les patients SEP et ces cellules sont retrouvées au sein des lésions. Après re-stimulation, ces cellules sont capables de produire de l'IL-17 et/ou de l'IFN- γ (Annibali, Ristori et al. 2011, Nicol, Salou et al. 2017, Nicol, Salou et al. 2018). Elles présentent, en périphérie, un phénotype effecteur mémoire comme les lymphocytes T CD8 retrouvés au sein du SNC (Ifergan, Kebir et al. 2011). Leur rôle reste cependant sujet à controverse, en effet, les MAIT pourraient avoir un rôle régulateur dans la physiopathologie de la maladie (Treiner and Liblau 2015). Il semble également que les LT CD8 puissent jouer un rôle régulateur dans les réponses inflammatoires dans la SEP. Cette observation vient du fait que les souris dans lesquelles les LT CD8 sont déplétés, développent une EAE moins sévère mais avec plus de rechutes (Jiang, Zhang et al. 1992). Il se pourrait donc que les LT CD8 jouent un rôle différent selon la phase de la pathologie. Dans la phase d'initiation de la maladie ces derniers joueraient un rôle pathologique, puis ils participeraient à la régulation de la maladie lors de phases plus tardives.

En effet, Les LT CD8 exercent leurs propriétés suppressives en éliminant les LT CD4 spécifiques de la myéline. Pour conclure, les LT CD8 participent activement au développement de la maladie. Leur rôle dans la pathogénèse des lésions, *via* une

action cytotoxique directe, la production de cytokine ou l'expression de facteurs pro-apoptotiques.

2.3. Thérapies actuelles

Actuellement, plusieurs molécules visant à modifier le développement de la maladie sont approuvées par l'agence américaine de des produits alimentaires et médicamenteux (FDA)

2.3.1. Interféron Beta

Historiquement, l'interféron-Beta (IFN- β) a été la première molécule approuvée pour le traitement de la SEP par la FDA en 1993. Actuellement, 3 formulations différentes existent : l'IFN- β -1b (Betaferon, injecté en sous-cutané), l'IFN- β -1a (Avonex injecté en intramusculaire et Rebif injecté en sous-cutané). L'IFN- β permet de réduire le nombre de rechutes, diminuant ainsi la progression de la maladie (Weinstock-Guttman, Ramanathan et al. 2008). Cette cytokine permet d'inhiber la présentation antigénique, l'apoptose et joue également un rôle immunomodulateur sur les cellules infiltrant le SNC. Cependant, le mode d'action précis de cette molécule reste inconnu à ce jour. Cependant ce traitement n'est pas efficace pour plusieurs raisons. Tout d'abord ce traitement n'est efficace que contre les formes de SEP avec rechute/remission (RR-MS) mais n'est que peu efficace contre la forme secondaire progressive (SP-MS) (Kappos, Weinshenker et al. 2004). Deuxièmement, très rapidement après début du traitement, la majorité des patients développe des anticorps neutralisants anti-IFN- β qui diminuent l'efficacité de traitement.

2.3.2. L'acétate de Glatiramère

L'acétate de Glatiramère (GA) est un polymère de 6,4kD composé de 4 acides aminés (L-glutamate, L-lysine, L-alanine et L-tyrosine) trouvés dans la protéine basique de la myéline (MBP). Cette molécule fût approuvée en 1996 par la FDA. Le mécanisme d'action de cette molécule n'est pas complètement élucidé mais il apparaît néanmoins qu'il permet de moduler la production de cytokines par les LT, plus particulièrement en

orientant la réponse immunitaire vers une réponse de type Th2 (Duda, Schmied et al. 2000). En plus d'orienter la réponse immunitaire, le GA permettrait la génération de cellules régulatrices en périphérie qui permettraient un meilleur contrôle des LT pathogènes et de diminuer la présentation antigénique. En au niveau du SNC, le GA permettrait la sécrétion de BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) qui à son tour permettrait de diminuer la dégénérescence neuronale et favoriserait la remyélinisation ainsi que la croissance axonale.

2.3.3. Le Natalizumab et le Fingolimod

Deux anticorps monoclonaux font partie des nouveaux traitements utilisés dans le traitement de la SEP : L'anti-VLA4 (Very Late Antigen-4) et l'agoniste du récepteur à la Sphingosine-1-phosphate. Alors que le Natalizumab permet d'empêcher la migration des leucocytes au niveau du SNC via la BHE, le Fingolimod lui, permet d'inhiber la sortie des leucocytes des organes lymphoïdes secondaires grâce à sa fixation sur S1P1 et provoquant son internalisation (Massberg and von Andrian 2006). Ces deux traitements sont très efficaces puisqu'ils permettent d'inhiber de 65% le nombre de rechutes après 2 ans de traitements mais présentent néanmoins certains effets secondaires chez certains patients comme par exemple la leucoencéphalopathie multifocale progressive (Yousry, Major et al. 2006, Bloomgren, Richman et al. 2012).

2.3.4. Déplétion des Lymphocytes B : Effets prometteurs dans la SEP

Enfin, les traitements visant les lymphocytes B, comme par exemple le Rituximab et l'Ocrelizumab sont des thérapies efficaces dans la réduction des poussées. De façon intéressante, ces traitements n'impactent pas les taux d'anticorps au niveau du LCR, ce qui suggère que la contribution des lymphocytes B est indépendante de la sécrétion d'immunoglobulines (Hauser, Waubant et al. 2008). En effet, les LB exercent également des fonctions pro-inflammatoires ou régulatrices *via* la production de cytokines et grâce à leur rôle de CPA. La présentation antigénique par les lymphocytes B via les CMH de classe II est indispensable à l'induction de l'EAE suite par immunisation avec la protéine MOG. Les animaux ne possédant de CMH de classe II à la surface des LB présentent des réponses Th1 et Th17 altérées (Lyons,

Zhao et al. 1999, Molnarfi, Schulze-Topphoff et al. 2013). Ces résultats sont en accord avec ceux retrouvés chez les patients traités par Rituximab (Bar-Or, Fawaz et al. 2010). Les facteurs de co-stimulations, tels CD80/CD86, engagés à l'occasion de l'interaction T/B sont clés dans la génération d'une réponse auto-immune.

La diminution des réponses Th1 et Th17 chez les patients traités par Rituximab est aussi liée à l'abrogation de la production de cytokines pro-inflammatoires par certaines populations de lymphocytes B mémoires. Les lymphocytes B des patients SEP produisent plus de cytokines inflammatoires, TNF- α , IL-15, GM-CSF, IL-6, que ceux de sujet contrôles (Li, Rezk et al. 2015). Chacune de ces cytokines joue un rôle de stimulation directe ou indirecte des lymphocytes T encephalitogènes. Ainsi l'IL-6 est une cytokine clé dans la différenciation des lymphocytes Th17 mais inhibe également les lymphocytes T régulateurs (Bettelli, Carrier et al. 2006). Chez l'animal, La suppression de la production d'IL-6 par les lymphocytes B diminuait l'intensité de la réponse Th17 et la sévérité de l'EAE (Barr, Shen et al. 2012, Molnarfi, Schulze-Topphoff et al. 2013). Il y a également une activation indirecte des LT CD4 *via* la production de GM-CSF.

En effet, le GM-CSF produit par les lymphocytes B est capable de stimuler la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, IL-12 et IL-17 par les cellules myéloïdes : monocytes en périphérie et macrophages/microglie au sein du SNC.

Objectifs

L'objectif de mes travaux de thèse a été d'étudier le rôle des facteurs de transcription Foxo3 et Eomes dans la différenciation et les fonctions des lymphocytes T CD4 afin de comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels ces facteurs de transcription contrôlent la susceptibilité à l'auto-immunité.

En effet, peu avant mon arrivée au laboratoire, mon équipe a pu mettre en évidence dans un modèle d'auto-immunité, que les souris Foxo3^{-/-} développent une pathologie moins sévère que les souris WT. Cette diminution de sévérité à l'auto-immunité est associée à un défaut de production de cytokines pro-inflammatoires. Durant ma thèse nous avons identifié le FT Eomes comme étant responsable du phénotype observé. Nous avons mis en évidence qu'*Eomes* est un gène de cible de Foxo3 dans les lymphocytes T CD4. Par la suite, nous avons montré qu'Eomes permet le contrôle de la production d'IFN- γ et de GM-CSF par les LT CD4, et que cette sous-population lymphocytaire participe activement à l'auto-immunité. Par la suite, nous avons voulu analyser et caractériser plus en détails, le rôle et les fonctions des LT CD4 EOMES⁺ chez l'Homme. Les résultats de cette deuxième étude montrent que les LT CD4 EOMES⁺ sont extrêmement pro-inflammatoires par rapport aux LT CD4 EOMES⁻, et que, ces cellules sont induites *in vitro* suite à une stimulation prolongée des LT CD4. Enfin nous avons mis en évidence que ces cellules présentent des capacités de prolifération et de survie accrues.

Résultats

Article 1 : Foxo3 oriente la différenciation des LT CD4 en une sous-population pathogénique en induisant l'expression d'Eomes

Foxo3 Transcription Factor Drives Pathogenic T Helper 1 Differentiation by Inducing the Expression of Eomes

Caroline Stienne,^{1,2,3,7} Michaël F. Michieletto,^{1,2,3,7} Mehdi Benamar,^{1,2,3} Nadège Carrié,⁴ Isabelle Bernard,^{1,2,3} Xuan-Hung Nguyen,^{1,2,3} Yannick Lippi,⁵ Fanny Duguet,^{1,2,3} Roland S. Liblau,^{1,2,3} Stephen M. Hedrick,⁶ Abdelhadi Saoudi,^{1,2,3} and Anne S. Dejean^{1,2,3,8,*}

¹UMR Inserm, U1043, Toulouse 31300, France

²UMR CNRS, U5282, Toulouse 31300, France

³Université de Toulouse, UPS, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan (CPTP), Toulouse 31300, France

⁴UGM 4127, Oncopole, Toulouse 31059, France

⁵Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP-Purpan, Toulouse 31024, France

⁶Molecular Biology Section, Division of Biological Sciences and Department of Cellular and Molecular Medicine, University of California, San Diego, La Jolla, CA 92093-0377, USA

⁷Co-first Author

⁸Lead Contact

Résumé:

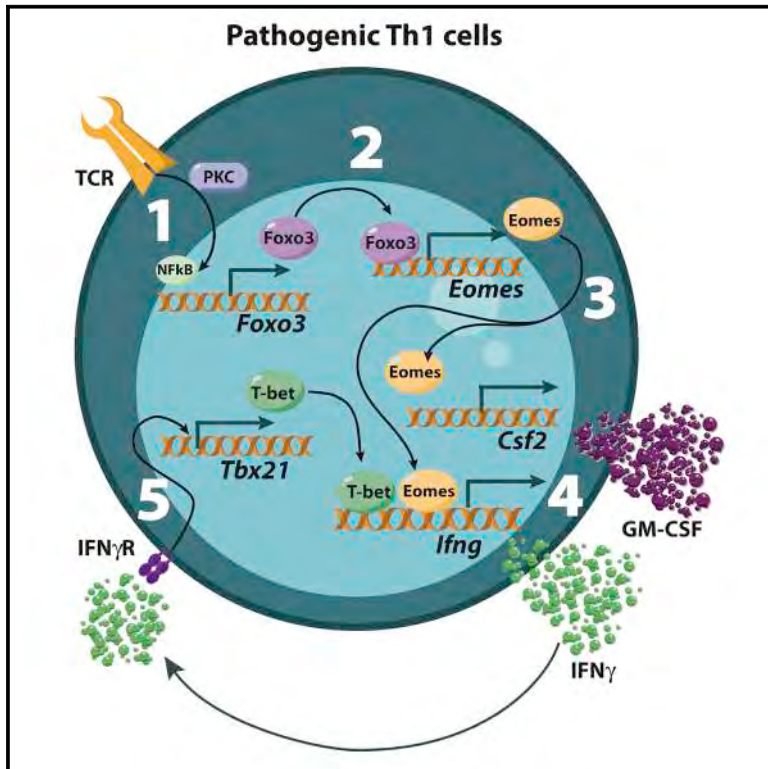
La différenciation des lymphocytes T CD4 est un processus finement contrôlé par le signal du TCR, la co-stimulation et des facteurs solubles présents dans le microenvironnement qui vont permettre l'expression de nombreux facteurs de transcription. Ces facteurs de transcription vont alors activer ou réprimer de nombreux gènes et générer ainsi des lymphocytes T CD4 hautement spécialisés. Parmi ces facteurs de transcription, les protéines Foxo jouent un rôle important dans la différenciation, la migration et la survie des LT. Dans le système immunitaire, deux isoformes sont présentes, Foxo1 et Foxo3, qui jouent des rôles importants dans le compartiment lymphoïde et myéloïde respectivement. Comme ces protéines sont fortement identiques d'un point de vue structurel, nous avons émis l'hypothèse qu'en plus de Foxo1, dont le rôle a été très bien décrit dans les LT CD4, Foxo3 jouerait également un rôle important, rôle qui n'a jusqu'à présent jamais été étudié.

Nos travaux ont en effet montré que Foxo3 joue un rôle crucial dans la différenciation des LT CD4 en une sous-population délétère dans les maladies auto-immunes, et plus particulièrement dans le modèle de l'Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale (EAE), le modèle murin de Sclérose en Plaques dont la physiopathologie est majoritairement due aux LT CD4. En effet, les souris Foxo3^{-/-} développent une maladie moins sévère que les souris WT et cette diminution de sévérité de la maladie s'accompagne d'une proportion plus faible de LT CD4 produisant de l'IFN- γ et du GM-CSF, deux cytokines clefs dans la physiopathologie de la maladie. Au niveau moléculaire, nous avons mis en évidence que Foxo3 contrôle l'expression d'un autre facteur de transcription impliqué dans le contrôle de la production d'IFN- γ dans les LT CD8 et les NK : Eomes.

Ainsi, nous avons mis en évidence pour la première fois qu'Eomes est un gène cible de Foxo3 dans les LT CD4 et que son expression est responsable de la première vague d'IFN- γ et qu'il participe également à la régulation du GM-CSF, ce qui explique pourquoi les souris Foxo3KO présentent une susceptibilité réduite à l'auto-immunité du SNC.

Foxo3 Transcription Factor Drives Pathogenic T Helper 1 Differentiation by Inducing the Expression of Eomes

Graphical Abstract



Authors

Caroline Stienne,
 Michaël F. Michieletto,
 Mehdi Benamar, ...,
 Stephen M. Hedrick, Abdelhadi Saoudi,
 Anne S. Dejean

Correspondence

anne.dejean@inserm.fr

In Brief

The role of Foxo3 in effector CD4⁺ T cells has not been addressed. Stienne et al. demonstrate that Foxo3 expression in CD4⁺ T cells controls the expression of Eomes and that the Foxo3-Eomes axis is required to achieve the complete specialized gene program of CD4⁺ T cell differentiation and development of autoimmunity.

Highlights

- Strength of TCR signal controls Foxo3 expression in effector CD4⁺ T cells
- Foxo3 drives pathogenic Th1 cell differentiation through direct regulation of Eomes
- Foxo3 and Eomes act independently of T-bet for pathogenic Th1 cell differentiation
- Foxo3 controls the susceptibility to neuroinflammation

Accession Numbers

GSE86287

Foxo3 Transcription Factor Drives Pathogenic T Helper 1 Differentiation by Inducing the Expression of Eomes

Caroline Stienne,^{1,2,3,7} Michaël F. Michieletto,^{1,2,3,7} Mehdi Benamar,^{1,2,3} Nadège Carrié,⁴ Isabelle Bernard,^{1,2,3} Xuan-Hung Nguyen,^{1,2,3} Yannick Lippi,⁵ Fanny Duguet,^{1,2,3} Roland S. Liblau,^{1,2,3} Stephen M. Hedrick,⁶ Abdelhadi Saoudi,^{1,2,3} and Anne S. Dejean^{1,2,3,8,*}

¹UMR Inserm, U1043, Toulouse 31300, France

²UMR CNRS, U5282, Toulouse 31300, France

³Université de Toulouse, UPS, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan (CPTP), Toulouse 31300, France

⁴UGM 4127, Oncopole, Toulouse 31059, France

⁵Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse 31024, France

⁶Molecular Biology Section, Division of Biological Sciences and Department of Cellular and Molecular Medicine, University of California, San Diego, La Jolla, CA 92093-0377, USA

⁷Co-first author

⁸Lead Contact

*Correspondence: anne.dejean@inserm.fr

<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2016.09.010>

SUMMARY

The transcription factor Foxo3 plays a crucial role in myeloid cell function but its role in lymphoid cells remains poorly defined. Here, we have shown that Foxo3 expression was increased after T cell receptor engagement and played a specific role in the polarization of CD4⁺ T cells toward pathogenic T helper 1 (Th1) cells producing interferon- γ (IFN- γ) and granulocyte monocyte colony stimulating factor (GM-CSF). Consequently, Foxo3-deficient mice exhibited reduced susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. At the molecular level, we identified Eomes as a direct target gene for Foxo3 in CD4⁺ T cells and we have shown that lentiviral-based overexpression of Eomes in Foxo3-deficient CD4⁺ T cells restored both IFN- γ and GM-CSF production. Thus, the Foxo3-Eomes pathway is central to achieve the complete specialized gene program required for pathogenic Th1 cell differentiation and development of neuroinflammation.

INTRODUCTION

The Foxo (Forkhead Box class O) family of transcription factors (TFs) governs processes such as cellular proliferation, apoptosis, energy metabolism, autophagy, and stress resistance in response to changes in the abundance of nutrients and growth factors (Eijkelenboom and Burgering, 2013). Foxo proteins can act as either transcriptional activators or repressors upon their high-affinity binding to the consensus sequence 5'-GTAAA(T/C)AA-3', known as the Daf-16 family member-binding element (Obsil and Obsilova, 2011). In addition, Foxo factors can bind and modulate other TFs (van der Vos and Coffey, 2011).

All of these activities are altered by phosphorylation, acetylation, methylation, and ubiquitination, and these post-translational modifications influence Foxo intracellular localization, turnover, transactivation, and transcriptional specificity (Zhao et al., 2011).

Foxo TFs, through their role in the control of cell cycle progression and apoptosis, were first described as tumor suppressor genes. Nonetheless, numerous studies have revealed that Foxo1 and Foxo3 also play fundamental roles in physiologic and pathologic immune responses (Dejean et al., 2011; Hedrick, 2009; Hedrick et al., 2012; Ouyang and Li, 2011). Because of the similarity between their DNA-binding domains, all Foxo factors can in principle bind to related sequences and therefore should regulate the same target genes. Experiments using mice deficient for a single Foxo isoform, however, clearly demonstrate that Foxo1 and Foxo3 have independent physiological functions in the immune system, suggesting that Foxo functions could be closely linked to their distinct cell type-specific expression patterns (Dejean et al., 2011; Hedrick, 2009).

Foxo1 is abundantly expressed in lymphoid cells, where it has been shown to regulate many features of lymphocyte homeostasis including survival, homing, and differentiation. Indeed, Foxo1 has critical functions in B cell development, homing, class-switch recombination, and somatic hypermutation (Amin and Schlissel, 2008; Dengler et al., 2008). Foxo1 also regulates both naive and memory T cell survival and trafficking (Kerdiles et al., 2009; Kim et al., 2013; Ouyang et al., 2009, 2010), thymic regulatory T (tTreg) and peripheral regulatory T (pTreg) cell development and function (Kerdiles et al., 2010; Merckenschlager and von Boehmer, 2010; Ouyang et al., 2010, 2012), as well as T helper 1 (Th1), Th17, and T follicular helper (Tfh) cell differentiation (Kerdiles et al., 2010; Lainé et al., 2015; Merckenschlager and von Boehmer, 2010; Oestreich et al., 2012; Ouyang et al., 2012; Stone et al., 2015). So far, no specific role for Foxo1 has been assigned in immune cells other than lymphocytes.

Foxo3 is the main isoform expressed in the myeloid compartment. Our previous study has shown that Foxo3 is a key

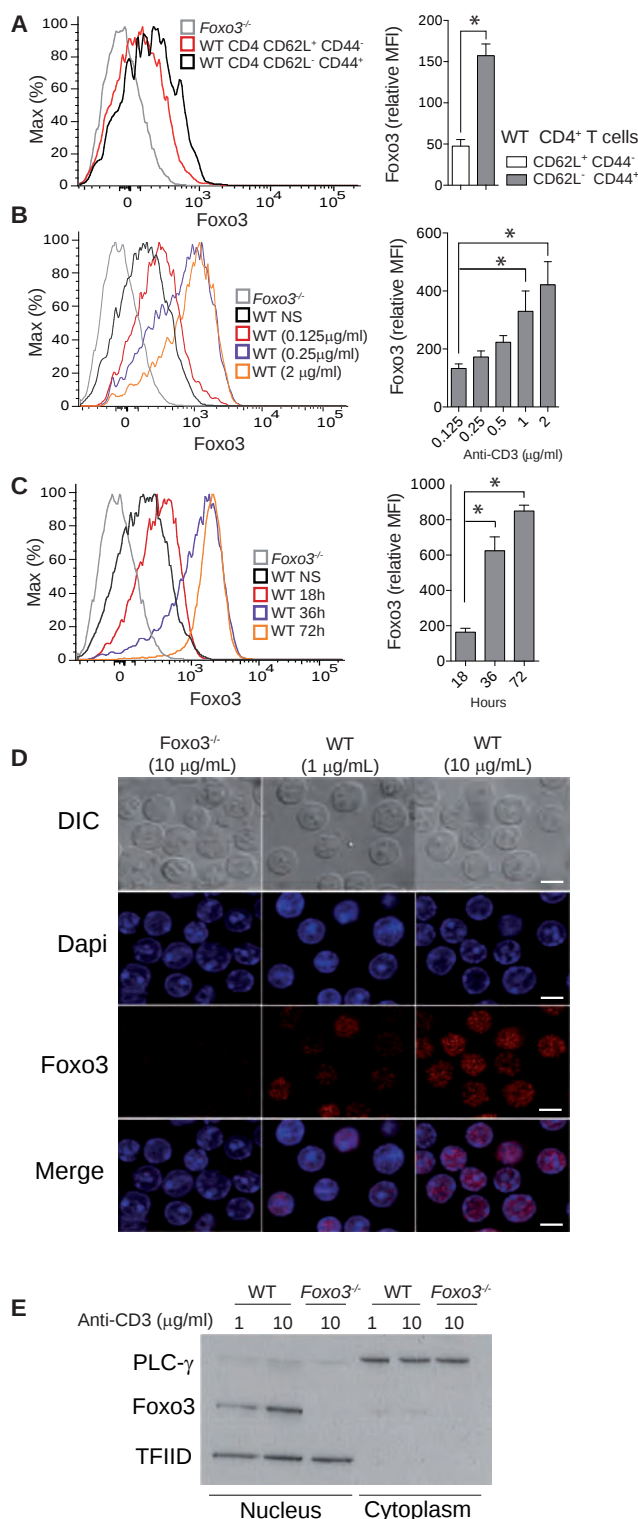


Figure 1. Increased Foxo3 Expression in CD4⁺ T Cells after TCR Engagement

(A) Foxo3 expression by naive CD62L⁺CD44⁻ (white bars) and activated CD62L⁻CD44⁺ (dark gray bars) WT CD4⁺ T cells (n = 7 mice per genotype).

(B) Foxo3 expression by naive WT CD4⁺ T cells stimulated in vitro with the indicated dose of anti-CD3 mAbs (n = 4 mice per genotype).

suppressor of inflammatory cytokine production by dendritic cells (DCs) and macrophages (Dejean et al., 2009). These results are consistent with a non-coding polymorphism in human *FOXO3* that limits inflammatory monocyte responses resulting in milder Crohn's disease and rheumatoid arthritis but more severe malaria (Lee et al., 2013). The role played by Foxo3 in T cells is less well defined. Using *Foxo1*^{-/-}*Foxo3*^{-/-} mice, studies have demonstrated that Foxo1 and Foxo3 cooperatively control the development and function of Foxp3⁺ Treg cells (Kerdiles et al., 2010; Ouyang et al., 2010). Others have shown that Foxo3 limits the expansion of memory CD8⁺ T cells during acute or chronic viral infection (Sullivan et al., 2012a, 2012b). To date, however, the precise role of Foxo3 in effector CD4⁺ T cells has not been addressed.

In this study, we show that the expression of Foxo3 was increased in CD4⁺ T cells after activation and correlated with T cell receptor (TCR) signaling strength. To address the relevance of this upregulation, we analyzed the impact of Foxo3 deficiency on CD4⁺ T cell effector functions and found that Foxo3 drives Eomes-dependent differentiation of IFN-γ⁺GM-CSF⁺ pathogenic Th1 cells and that this pathway is needed for the development of central nervous system inflammation.

RESULTS

TCR Triggering Leads to Increased Expression of Foxo3 in CD4⁺ T Cells

In vivo, activated (CD62L⁻CD44⁺) CD4⁺ T cells were found to exhibit a 3-fold increase in Foxo3 expression when compared to naive (CD62L⁺CD44⁻) CD4⁺ T cells (Figure 1A). We therefore addressed whether CD4⁺ T cell activation had an impact on the expression of Foxo3. Naive CD4⁺ T cells were stimulated with plate-bound anti-CD3 mAbs and analyzed for Foxo3 expression. T cell receptor (TCR) triggering resulted in a dose-dependent upregulation of Foxo3 in CD4⁺ T cells (Figure 1B), with increased expression over time (Figure 1C), whereas CD28-induced costimulation did not influence Foxo3 expression (Figure S1A). A dose-dependent upregulation of Foxo3 was also recorded when OT-II CD4⁺ T cells were stimulated with antigen-presenting cell (APC) loaded with increasing doses of OVA_{323–339} peptide, confirming that TCR-dependent signal intensity regulated Foxo3 expression in activated CD4⁺ T cells (Figure S1B). To determine key signaling events inducing Foxo3 expression upon stimulation, we next activated CD4⁺ T cells with anti-CD3 mAbs in the presence of a series of inhibitors that block specific pathways downstream of TCR. We found that inhibition of protein kinase C (PKCs) prevented Foxo3 upregulation whereas inhibition of ERK, p38, or JNK kinase pathways had no effect

(C) Foxo3 expression by naive WT CD4⁺ T cells stimulated with anti-CD3 mAbs (2 μg/mL) for 18, 36, or 72 hr (n = 4 mice per genotype). Mean and SEM of the relative MFI of Foxo3 expression was calculated by subtracting the WT MFI from the *Foxo3*^{-/-} MFI.

(D) Immunofluorescence staining of Foxo3 in naive CD4⁺ T cell from WT or *Foxo3*^{-/-} mice stimulated in vitro with the indicated dose of anti-CD3 mAbs for 48 hr (scale bars represent 10 μm).

(E) Immunoblot analysis of Foxo3, PLC-γ, and TFIID expression in nuclear and cytoplasmic fractions of naive CD4⁺ T cells from WT or *Foxo3*^{-/-} mice stimulated in vitro as in (D).

Data are representative of three independent experiments. Error bars, SEM; p values (Mann-Whitney U test). See also Figure S1.

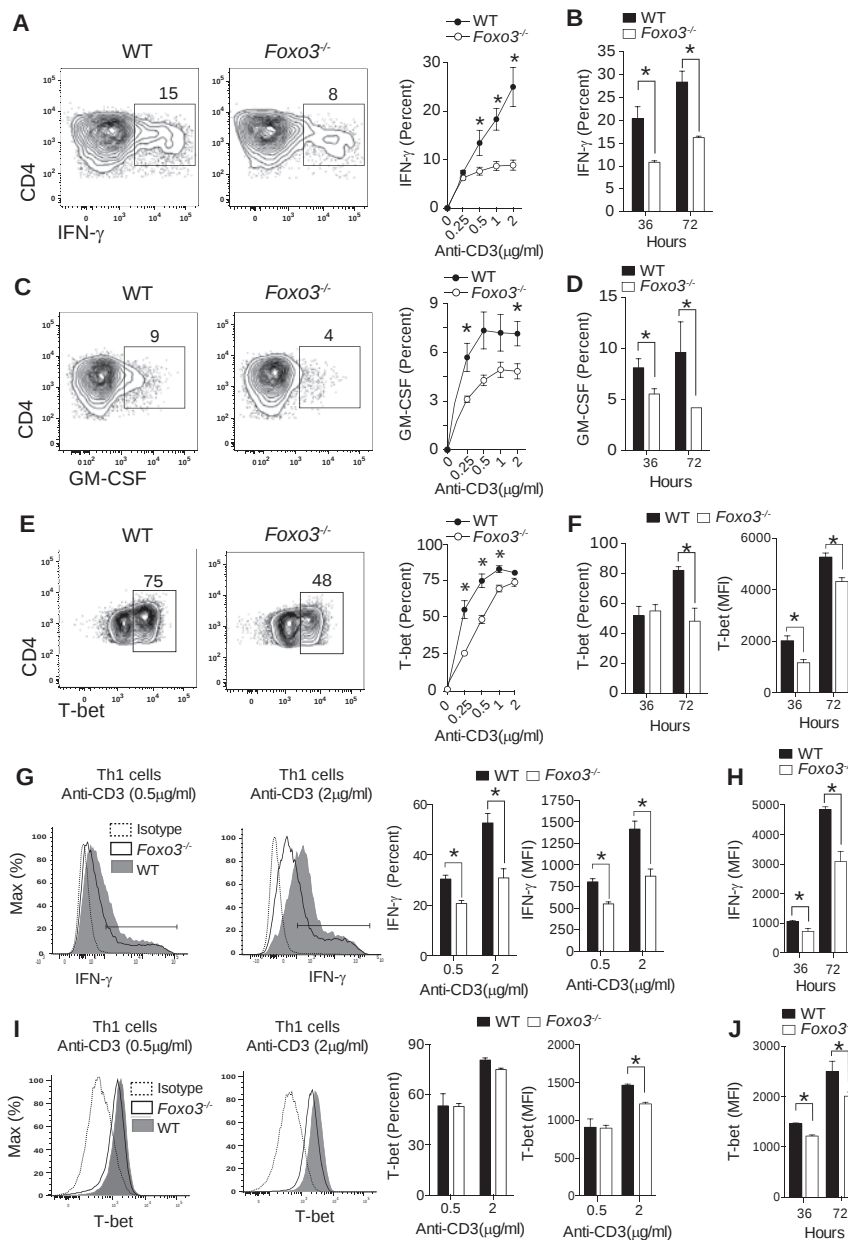


Figure 2. Foxo3 Deficiency Impaired Pathogenic Th1 Cell Differentiation

(A) IFN- γ production by WT or *Foxo3*^{-/-} naive CD4⁺ T cells stimulated with anti-CD3 (0.5 μ g/mL) under non-polarizing condition for 36 hr. Frequency of IFN- γ produced by WT (black circles) or *Foxo3*^{-/-} (open circles) CD4⁺ T cells stimulated with anti-CD3 Abs for 36 hr (n = 5 mice per genotype).

(B) Frequency of IFN- γ production by WT (black bars) or *Foxo3*^{-/-} (open bars) CD4⁺ T cells stimulated with anti-CD3 mAbs (2 μ g/mL) for the indicated time (n = 5 mice per genotype).

(C) GM-CSF production by WT or *Foxo3*^{-/-} naive CD4⁺ T cells stimulated as in (A) (n = 5 mice per genotype).

(D) Frequency of GM-CSF production by WT (black bars) or *Foxo3*^{-/-} (open bars) CD4⁺ T cells stimulated as in (B) (n = 4 mice per genotype).

(E) T-bet expression by WT (black circles) or *Foxo3*^{-/-} (open circles) CD4⁺ T cells stimulated as in (A) (n = 5 mice per genotype).

(F) Frequency and MFI of T-bet expression by WT (black bars) or *Foxo3*^{-/-} (open bars) CD4⁺ T cells stimulated as in (B) (n = 5 mice per genotype).

(G and H) Frequency and MFI of IFN- γ expression by WT (black bars) or *Foxo3*^{-/-} (open bars) CD4⁺ T cells stimulated with anti-CD3 mAbs in Th1 cell-polarizing conditions for 36 hr (n = 5 mice per genotype) (G) or stimulated with 2 μ g/mL of anti-CD3 mAbs in Th1 cell polarizing conditions for 36 or 72 hr (n = 5 mice per genotype) (H).

(I and J) Frequency and MFI of T-bet expression by naive CD4⁺ T from WT (black bars) or *Foxo3*-deficient mice (open bars) (I stimulated as in G; J stimulated as in H) (n = 5 mice per genotype).

Data are representative of three independent experiments. Error bars, SEM; p values (Mann-Whitney U test). See also [Figures S2 and S3](#).

Foxo3 expression and nuclear accumulation in activated CD4⁺ T cells.

Foxo3 Deficiency Impairs CD4⁺ T Cell Differentiation

To better understand the significance of enhanced Foxo3 expression in effector

([Figure S1C](#)). In agreement, stimulation with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) alone was able to induce Foxo3 expression whereas ionomycin did not ([Figure S1D](#)). To dissect the pathway downstream of PKC, we used inhibitors of NF- κ B and the NFAT transcription factor and showed that TCR-induced Foxo3 expression was NF- κ B dependent ([Figure S1E](#)). Taken together, these data suggest that PKCs and NF- κ B pathways downstream of TCR positively regulate Foxo3 expression in CD4⁺ T cells.

Because activation of Foxo3 was correlated with its subcellular localization, immunofluorescence staining and subcellular fractionation combined with immunoblot analysis were performed. Foxo3 was almost entirely localized in the nucleus of activated CD4⁺ T cells ([Figures 1D and 1E](#)). Altogether, our data show that TCR-dependent signal intensity correlates with

CD4⁺ T cells, in vitro experiments were performed in which naive *Foxo3*^{-/-} or WT CD4⁺ T cells were stimulated under neutral conditions with increasing concentrations of anti-CD3 mAbs. Under those culture conditions, the frequencies of IFN- γ - ([Figures 2A and 2B](#)) and GM-CSF- ([Figures 2C and 2D](#)) secreting cells in *Foxo3*^{-/-} CD4⁺ T cells were reduced by half of that observed in WT CD4⁺ T cells after either 36 or 72 hr of culture whereas survival, proliferation, or IL-2, IL-13, IL-4, and TNF production were unaffected ([Figures S2A and S2B](#)) and the production of IL-10 and IL-17 was undetectable (data not shown). This decreased frequency of IFN- γ - and GM-CSF-positive cells was also observed when cells were stimulated with both anti-CD3 and anti-CD28 mAbs, indicating that a co-stimulatory signal was not sufficient to restore cytokine production by *Foxo3*-deficient cells ([Figure S2C](#)). In addition, a delayed and diminished

expression of T-bet, the “master regulator” of Th1 cell differentiation (Szabo et al., 2000), was observed in *Foxo3*^{-/-} CD4⁺ T cells upon TCR engagement (Figures 2E and 2F). Decreased IFN- γ production associated with a *Foxo3* deficiency was also found under Th1 cell-polarizing conditions (Figure 2G) whereas proliferation and survival were not affected (Figure S2E). Moreover, the *Foxo3* deficiency not only decreased the frequency of IFN- γ ⁺ cells but also impacted the overall amount of IFN- γ produced on a per-cell basis, as demonstrated by the decreased MFI of IFN- γ expressed by *Foxo3*^{-/-} CD4⁺ T cells after either 36 or 72 hr of culture (Figure 2H). The frequency of T-bet-expressing cells was equivalent in both *Foxo3*^{-/-} and WT CD4⁺ Th1 cells (Figure 2I); however, *Foxo3* deficiency was also associated with decreased T-bet MFI in Th1 cells (Figure 2J).

We next assessed the ability of *Foxo3*^{-/-} CD4⁺ T cell to differentiate into different Th cell lineages when stimulated in polarizing conditions. We showed that *Foxo3* deficiency did not impact Th2, Th17, or Foxp3 Treg cell differentiation (Figure S3A). In particular, *Foxo3*^{-/-} CD4⁺ T cells were fully able to differentiate into Foxp3⁺ pTreg cells induced by transforming growth factor (TGF- β) signaling (Figure S3B) or suboptimal TCR activation (Figure S3C; Li et al., 2013a). Moreover, we showed that tTreg cells from *Foxo3*^{-/-} mice were as suppressive as WT tTreg cells (Figure S3D). Collectively, these results show that *Foxo3* promotes TCR-induced production of IFN- γ and GM-CSF and has no notable impact on Th2, Th17, or Treg cell differentiation.

Foxo3 Is Required for TCR-Induced Eomes Expression by CD4⁺ T Cells

To understand the molecular mechanisms whereby *Foxo3* controls CD4⁺ T cell differentiation, unbiased analysis of genes differentially expressed in *Foxo3*-deficient versus *Foxo3*-sufficient CD4⁺ T cells was achieved using both resting and activated CD4⁺ T cells obtained after 12 or 24 hr of stimulation with anti-CD3 mAbs. When comparing unstimulated WT and *Foxo3*^{-/-} CD4⁺ T cells, only five transcripts showed greater than 2-fold change, suggesting that *Foxo3* plays minimal role in resting CD4⁺ T cells (Figure S4A). This number increased upon TCR engagement suggesting that *Foxo3* is mainly active after TCR stimulation (FDR $\leq$ 0.05) (Figures 3A and S4B). Three main networks were impacted by *Foxo3* deletion among which the “IFN- γ and IFN- γ response” was the most dysregulated pathway (Figure 3B). The second network was enriched for metabolic functional categories, confirming the role of *Foxo3* in the regulation of cellular metabolism (Figure S4C). The third identified cluster was enriched in genes involved in “immune cell trafficking,” suggesting that *Foxo3* might have a role in T cell migration and homing (Figure S4D).

Among all dysregulated genes, *Eomes* was the second (T12h) and first (T24h) most suppressed gene in *Foxo3*^{-/-} CD4⁺ T cells. Analyses by RT-qPCR and flow cytometry confirmed that *Foxo3*-deficient CD4⁺ T cells exhibited a decreased expression of *Eomes* after activation (Figures 3C and 3D). Although *Eomes* expression is lower in CD4⁺ T cells than in CD8⁺ T cells, its expression increases after activation (Figure S4E). Indeed, TCR-dependent signal intensity controlled *Eomes* expression in CD4⁺ T cells, and this expression was largely *Foxo3* dependent (Figure 3E). *Eomes* expression by CD4⁺ T cells was detected after 18 hr of stimulation and rose substantially between 36

and 72 hr, correlating with the expression of *Foxo3* (Figure 3F). We next assessed *Eomes* expression in other Th cell subsets. In Th1 cell-polarizing conditions, *Foxo3* also controlled *Eomes* expression (Figure 3G). Nevertheless, *Eomes* expression is IL-12 independent (Figure 3H) and its expression rose between 36 and 72 hr as observed for Th0 cells (Figure 3I). Finally, *Eomes* expression was low in Th17 and Treg cells as compared to Th0 cells (Figure S4F). These results collectively show that *Foxo3* expression is required for TCR-induced *Eomes* expression in CD4⁺ T cells.

Foxo3 Indirectly Controls *Ifng* and *Csf2* in CD4⁺ T Cells through the Regulation of *Eomes* Expression

Because *Foxo3* expression was highly increased in CD4⁺ T cells expressing *Eomes* (Figure 4A), we hypothesized that *Foxo3* might directly control *Eomes* transcription. To assess this possibility, we first performed in silico analysis to identify conserved *Foxo*-binding sites (FBSs) in mouse and human *EOMES* loci. We found three putative FBSs: one (FBS1) located in the promoter of *Eomes* gene (chr9: 118,478,419) and the other two (FBS2 and FBS3) positioned downstream of the 3' UTR of *Eomes* (chr9: 118,487,803), in a region enriched in transcription factor binding sites that might therefore represent a putative 3' UTR enhancer region (p3'UTR-E) (Figure 4B). To determine whether *Foxo3* can directly bind within the *Eomes* locus, we conducted chromatin immuno-precipitation experiments using primer sets designed to amplify regions located at each identified FBS. We found that *Foxo3* could bind to the FBS1, although binding was more pronounced for FBS2 and FBS3 (Figure 4C).

To address whether these FBS regions are involved in the regulation of *Eomes* expression, we conducted luciferase reporter assays. HEK293T cells were transfected with a reporter plasmid in which a 1 Kb fragment located upstream of the human promoter region of *EOMES* was cloned into the pGL3-Basic vector (pEomes_luc) (Li et al., 2013b). Cells were co-transfected with plasmids coding for different forms of V5-tagged-FOXO3: the constitutively active form of FOXO3 (FOXO3TM) (Brunet et al., 1999), the Nt fragment from FOXO3TM used as dominant-negative (FOXO3-A32A253-Nt) (Charvet et al., 2003), or the active FOXO3TM mutated in the DNA binding domain (FOXO3TM-H212R). Transfection of FOXO3TM induced a 2-fold increase in luciferase activity, whereas the transfection of FOXO3-A32A253-Nt had no impact (Figure 4D). To assess whether the 3' UTR region is involved for *EOMES* expression, an 81 bp fragment of the p3'UTR-E region containing the two putative FBSs was sub-cloned into the pEomes-luc vector (pEomes_p3'UTR-E_luc). Using this construct, we found a 6-fold increased luciferase activity in the presence of FOXO3TM, whereas the mutant FOXO3TM-H212R failed to affect luciferase activity, indicating that FOXO3 bound directly to the FBS in the p3'UTR-E_region of *EOMES* (Figure 4E). Altogether, these results show that FOXO3 binds to FBSs present in the 3' UTR region of *EOMES* and that *EOMES* is a direct transcriptional target gene of FOXO3.

We next assessed whether *Eomes* expression was also linked to GM-CSF and IFN- γ secretion in CD4⁺ T cells. Intracellular staining showed that the expression of *Eomes* was higher in GM-CSF⁺IFN- γ ⁺ cells as compared to GM-CSF⁺IFN- γ ⁻ or GM-CSF⁻IFN- γ ⁻ (Figure 4F). Moreover, when naive CD4⁺

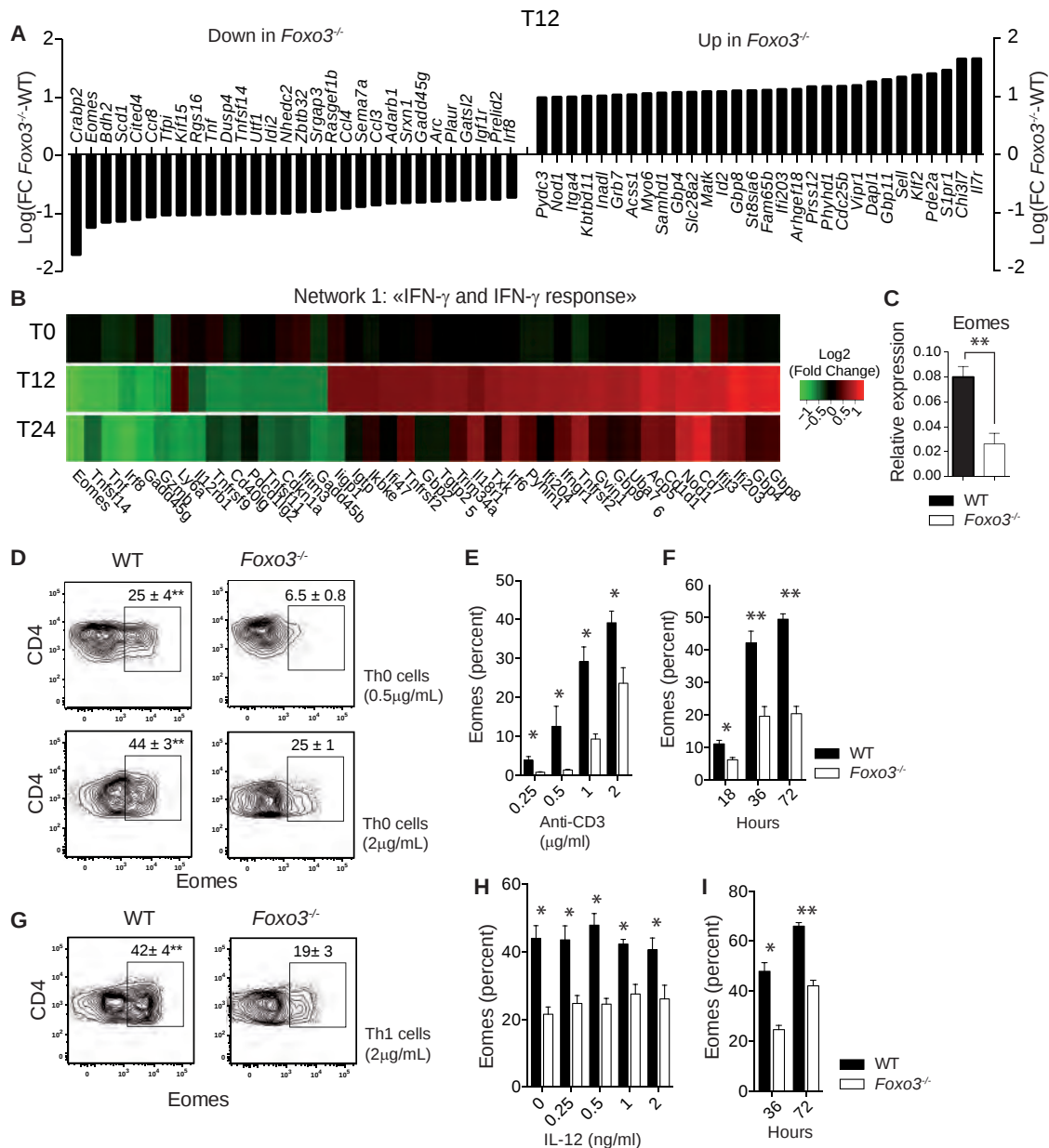


Figure 3. Foxo3 Is Required for Eomes Expression in CD4⁺ T Cells

(A) Gene expression microarray experiments comparing WT (n = 4) versus *Foxo3*^{-/-} (n = 4) CD4⁺ T cells after 12 hr of stimulation in neutral condition with 2 μg/mL of anti-CD3 mAbs. Data are expressed as Log2(Fold Change *Foxo3*^{-/-}-WT) of the top 30 most significantly regulated genes (FDR ≤ 0.05 and fold change > 2 or < 2). (B) Gene expression fold changes (Log2(FC *Foxo3*^{-/-}-WT)) of the top most significantly regulated (FDR ≤ 0.05 and fold change > 1.5) genes within the «IFN-γ and IFN-γ response» pathway shown as a Heatmap of over- (red) or under- (green) expressed genes in naive *Foxo3*^{-/-} CD4⁺ T cells unstimulated (T0) or stimulated with anti-CD3 mAbs for 12 (T12) or 24 hr (T24). (C) WT (black bars) or *Foxo3*^{-/-} (open bars) naive CD4⁺ T cells were stimulated under non-polarizing conditions for 18 hr with 2 μg/mL anti-CD3 mAbs and the mRNA expression of Eomes gene was measured by quantitative real-time PCR (n = 4 mice per genotype). (D) Intracellular staining of Eomes expressed by WT or *Foxo3*^{-/-} naive CD4⁺ T cells stimulated with 0.5 or 2 μg/mL anti-CD3 in Th0 cell polarizing condition. (E and F) Frequency of Eomes⁺ CD4⁺ T cells in WT (black bars) or *Foxo3*^{-/-} (open bars) naive CD4⁺ T cells stimulated under neutral polarizing condition with indicated doses of anti-CD3 mAbs (E) or with 2 μg/mL of anti-CD3 mAbs (F) for the indicated time (n = 4 mice per genotype). (G) Eomes expressed by naive CD4⁺ T cells from WT (black bars) or *Foxo3*^{-/-} mice (open bars) stimulated with 2 μg/mL of anti-CD3 mAbs under Th1 cell polarizing condition (n = 4 mice per genotype). (H and I) Frequency of Eomes⁺ CD4⁺ T cells in WT (black bars) or *Foxo3*^{-/-} (open bars) naive CD4⁺ T stimulated with 2 μg/mL of anti-CD3 mAbs and IL-12 (n = 4 mice per genotype) for 36 hr (H) or with 2 μg/mL of anti-CD3 mAbs and IL-12 for 36 or 72 hr (n = 4 mice per genotype) (I). Data are representative of at least three independent experiments. Error bars, SEM; p values (Mann-Whitney U test). See also Figure S4.

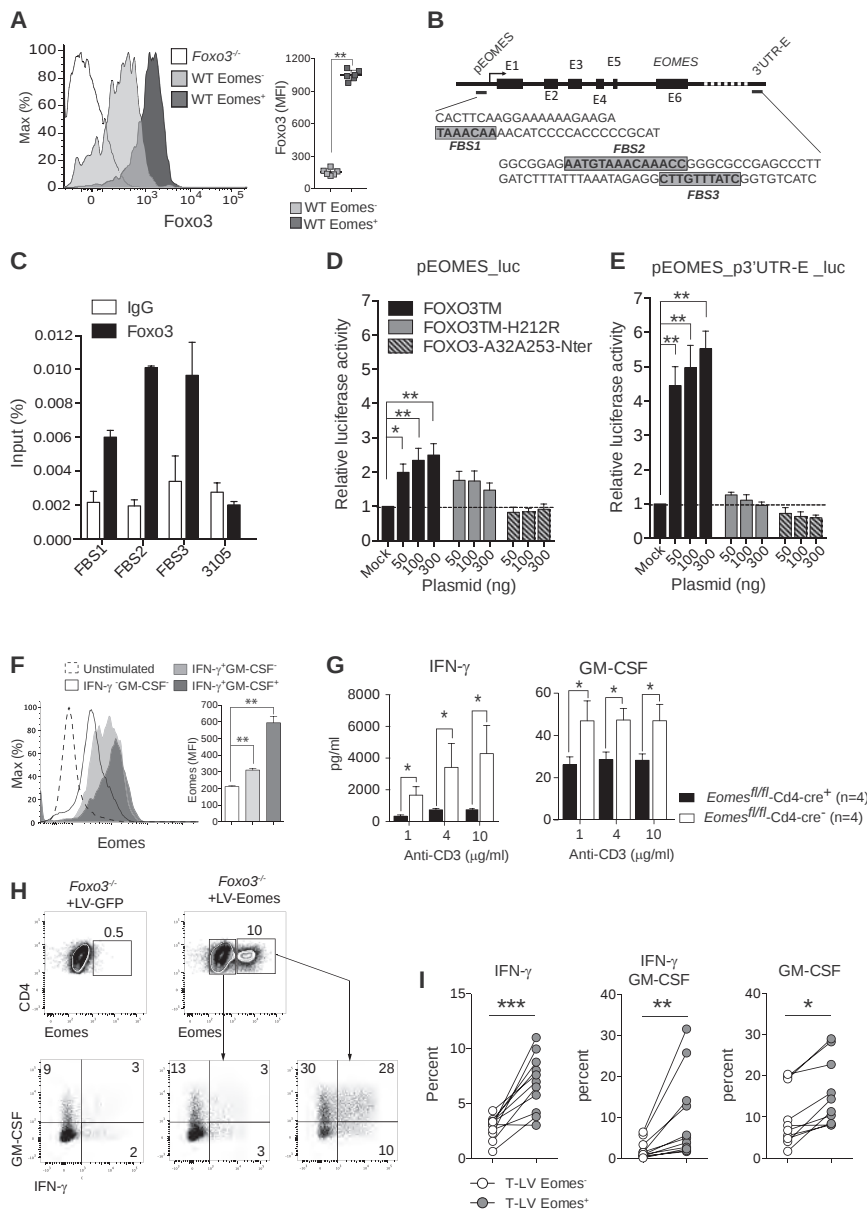


Figure 4. Eomes Is a Direct Target Gene of Foxo3

(A) Foxo3 expression gated on Eomes⁺ (dark gray) and Eomes⁻ (light gray) WT CD4⁺ T cells stimulated with 2 μg/mL of anti-CD3 mAbs (n = 6–7 mice per genotype).

(B) Schematic structure of the *EOMES* gene, the arrow represents transcriptional start site of a gene, the black boxes represent exon position (E1 to E6), the positions and sequences of the putative Forkhead-binding sites (FBS) are highlighted in gray.

(C) Chromatin immunoprecipitation analysis of Foxo3 binding to the *Eomes* locus in purified CD4⁺ T cells stimulated for 24 hr with 2 μg/mL anti-CD3 mAbs. Results are expressed as percentage of input.

(D and E) HEK293 T cells were co-transfected with reporter plasmids containing the human promoter region of *EOMES* cloned into the pGL3-Basic vector (pEOMES_luc) (D) or (E) plasmids containing the human promoter region of *EOMES* with the 3' UTR region containing the two putative FBSs (pEOMES_p3'UTR-E_luc) together with plasmids coding for different forms of FOXO3: the constitutively active FOXO3a mutant (FOXO3TM, black bars), the constitutively active FOXO3TM mutated for the DNA binding domain (FOXO3TM-H212R, gray bars), the constitutive active FOXO3TM deleted for the transactivation domain (FOXO3-A32A253-Nter, dashed bars), or empty vector (Mock). All luciferase activities were normalized to the expression of the co-transfected Renilla luciferase.

(F) Eomes expression gated on IFN-γ⁺GM-CSF⁻ or IFN-γ⁺GM-CSF⁺ and IFN-γ⁺GM-CSF⁺ producing CD4⁺ T cells stimulated with 2 μg/mL anti-CD3 mAbs under non-polarizing condition (n = 5 mice per genotype).

(G) Naive CD4⁺ T cells purified from *Eomes*^{fl/fl}-Cd4-cre⁺ (black bars) or *Eomes*^{fl/fl}-Cd4-cre⁻ (open bars) were stimulated with anti-CD3 mAbs and the secretion of IFN-γ and GM-CSF was analyzed by ELISA in the supernatant after 3 days of culture (n = 4 mice per genotype).

(H) IFN-γ and GM-CSF expression in naive Foxo3^{-/-} CD4⁺ T cells transduced with lentiviral particles expressing the GFP alone (LV-GFP) or Eomes and the GFP (LV-Eomes) and gated on Eomes⁺ CD4⁺ T cells.

(I) Frequency of IFN-γ⁺, IFN-γ⁺GM-CSF⁺, or GM-CSF⁺ cells among Foxo3^{-/-} CD4⁺ T cells either non-transduced (LV-Eomes⁻, open dots) or transduced (LV-Eomes⁺, gray dots) (n = 11 mice, from 3 independent experiments).

Data are representative of at least three independent experiments or two independent experiments (C). Error bars, SEM; p values (Mann-Whitney U test). See also Figure S5.

T cells purified from mice with a T cell-specific deletion of *Eomes* (*Eomes*^{fl/fl}-Cd4-cre) were stimulated in vitro with increased concentration of anti-CD3 mAbs, both GM-CSF and IFN-γ secretion were reduced in *Eomes*^{fl/fl}-Cd4-cre⁺ CD4⁺ T cells as compared to *Eomes*^{fl/fl}-Cd4-cre⁻ cells (Figure 4G), whereas the proliferation and survival were similar (data not shown). Therefore, the decreased Eomes expression associated with Foxo3 deficiency might explain the defect GM-CSF and IFN-γ secretion in Foxo3^{-/-} CD4⁺ T cells. To address this issue directly, we tested whether lentiviral-based overexpression of Eomes could overcome the defect in IFN-γ and GM-CSF production. We showed

that Eomes transduction of Foxo3-deficient T cells restored the expression of both IFN-γ and GM-CSF (Figures 4H and 4I). This finding supports the notion that Foxo3 indirectly regulates *Ifng* and *Csf2* in CD4⁺ T cells through the regulation of Eomes expression.

In addition, we address whether Eomes directly controls *Ifng* and *Csf2* expression. We performed an in silico analysis and found six highly conserved noncoding sequences enriched in DNaseI hypersensitivity sites and putative transcription factor binding sites positioned downstream of the 3' UTR of *CSF2*. Next, luciferase reporter assays were performed by coupling

these elements to the proximal *CSF2* promoter. Using this technique, we were unable to demonstrate a direct regulation of *CSF2* by EOMES (Figure S5A). In contrast, the same technique revealed that EOMES, but not FOXO3, directly transactivates the promoter of *IFNG* (Figure S5B). Moreover, we showed that Foxo3 was unable to transactivate the *Ifng* locus (Figure S5C). Altogether, these data support the concept that the Eomes-Foxo3 axis is required for the polarization of effector CD4⁺ T cells into IFN- γ - and GM-CSF-producing cells.

Eomes Acts Independently of T-bet for GM-CSF Regulation in CD4⁺ T Cells

Foxo3 deficiency affects both T-bet and Eomes expression by CD4⁺ T cells, so we next wondered whether Eomes and T-bet could be co-regulated and to what extent diminished GM-CSF and IFN- γ secretion resulted from decreased T-bet expression in Foxo3-deficient CD4⁺ T cells. A time course analysis showed that Eomes expression precedes that of T-bet and the defect in Eomes and IFN- γ preceded the reduction of T-bet expression in Foxo3^{-/-} CD4⁺ T cells, suggesting that initial production of IFN- γ by CD4⁺ T cell might be Eomes dependent but T-bet independent (Figure 5A). In this regard, previous studies demonstrate that the first wave of IFN- γ is T-bet independent and causes the autocrine induction of T-bet (Schulz et al., 2009). Therefore, the decreased T-bet expression in Foxo3^{-/-} cells might be due to the decreased Eomes-dependent IFN- γ secretion.

To test this hypothesis, WT and Foxo3^{-/-} CD4⁺ T cells were stimulated in the presence of neutralizing anti-IFN γ monoclonal antibody (mAb) to prevent T-bet induction by IFN- γ . Upon IFN- γ neutralization, a clear reduction of T-bet expression was observed, leading to similar expression of T-bet in both WT and Foxo3^{-/-} CD4⁺ T cells (Figure 5B). These results establish that Foxo3 has no direct impact on T-bet expression and further indicate that decreased T-bet resulted from decreased IFN- γ secretion by Foxo3^{-/-} CD4⁺ T cells. We also showed that the expression of Eomes was independent of the signaling pathway downstream of IFN- γ since the expression of Eomes was not affected by blocking IFN- γ (Figure 5C).

We next analyzed cytokine secretion in presence of blocking anti-IFN- γ antibody. Although suppressing the IFN- γ autocrine effect strongly impacted the production of IFN- γ , it had no effect on GM-CSF production. Yet, GM-CSF secretion was diminished in Foxo3^{-/-} cells whereas T-bet expression remained unchanged (Figures 5D and S5D). These results further support the notion that the Foxo3-Eomes pathway, but not T-bet, is critical for GM-CSF regulation. Similar results were obtained in T cells overexpressing Eomes after lentiviral transduction. Under conditions in which the IFN- γ was blocked and expression of T-bet was low, Eomes overexpression still resulted in increased IFN- γ and GM-CSF expression (Figures 5E and 5F). These data further demonstrate that Eomes can act independently of T-bet to control IFN- γ and GM-CSF secretion.

Foxo3 Controls the Severity to Neuroinflammation

We next addressed the in vivo relevance of the Eomes-Foxo3 pathway by assessing whether Foxo3 deficiency modifies the susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), a well-characterized mouse model for multiple sclerosis (MS). Hence, Foxo3^{-/-} female mice and their wild-type litter-

mates were immunized with MOG₃₅₋₅₅ peptide emulsified in CFA. Although the incidence of EAE disease and the mean day of onset were similar, Foxo3^{-/-} mice developed a much less severe disease than their wild-type counterparts (Figure 6A). Comparable results were obtained when male mice were used, showing that there was no gender bias (Figure S6A). To assess whether this decreased EAE severity was the consequence of a bias in the TCR repertoire, Foxo3^{-/-} mice were crossed to 2D2 TCR transgenic mice in which the CD4⁺ T cell population expresses an I-A^b-restricted TCR specific for the immune-dominant MOG₃₅₋₅₅ peptide (Bettelli et al., 2003). Foxo3 deficiency in 2D2 mice also led to a reduction of disease severity (Figure 6B). To exclude the implication of Foxo3 expression by the resident cells of the CNS, passive EAE was induced in Foxo3^{-/-} and WT recipients by transfer of WT MOG-specific CD4⁺ T cells differentiated in vitro into encephalitogenic Th1 and Th17 cells. The analysis of clinical scores showed that the incidence and severity of EAE induced was similar between the two genotypes (Figure S6B), thereby excluding any implication of Foxo3 expression in the target organ.

Additional experiments were conducted to decipher the relative contribution of Foxo3 in T cells versus APCs during EAE. The impact of a Foxo3 deficiency in non-T cells was assessed by transferring WT MOG₃₅₋₅₅-specific 2D2 CD4⁺ T cells into Foxo3-deficient or -sufficient Rag2^{-/-} mice. Mice were next immunized and disease severity was evaluated. Both groups of mice developed EAE with similar incidence, kinetics, and severity (Figure 6C). These data point to a minimal role of Foxo3 in non-T cells during EAE development. Furthermore, EAE experiments were next conducted on genetically engineered mice harboring a T cell-specific deletion of Foxo3 (Foxo3^{fl/fl}-Cd4-cre). Foxo3^{fl/fl}-Cd4-cre⁺ mice developed disease with a reduced incidence and severity as compared to Foxo3^{fl/fl}-Cd4-cre⁻ control mice, demonstrating that Foxo3 controls the susceptibility to EAE in a T cell-intrinsic manner (Figure 6D). Altogether, these results reveal that Foxo3 expression in CD4⁺ T cells plays a critical role in the susceptibility to CNS inflammation.

Foxo3 Drives the Differentiation of Pathogenic IFN- γ ⁺ and GM-CSF⁺ CD4⁺ T Cells during EAE

We next assessed whether the outcome of EAE in Foxo3-deficient mice was accompanied by differences in polarization of both peripheral and CNS-infiltrating CD4⁺ T cells. In agreement with our results obtained in vitro, MOG-specific Foxo3-deficient CD4⁺ T cells produced lower amounts of the effector cytokines IFN- γ and GM-CSF whereas the production of IL-17, TNF, and other cytokines was not affected (Figures 7A and S7A). Intracellular staining was performed to identify which Th cell subset was impacted by Foxo3 deficiency. We observed a large decrease in the proportion of both IFN- γ ⁺GM-CSF⁻ and IFN- γ ⁺GM-CSF⁺ CD4⁺ T cells. The frequency of IL-17⁺GM-CSF⁻ cells was not impacted, whereas Foxo3-deficient CD4⁺ T cell exhibited a slight decreased frequency of IL-17⁺GM-CSF⁺ cells (Figure 7B). The frequency of Foxp3 Treg cells was unaffected in immunized Foxo3-deficient mice (Figure 7C).

To address whether this defective CD4⁺ T cell differentiation was also observed in CNS-infiltrating leukocytes, mononuclear infiltrating cells from the spinal cord and brain of Foxo3^{-/-} and

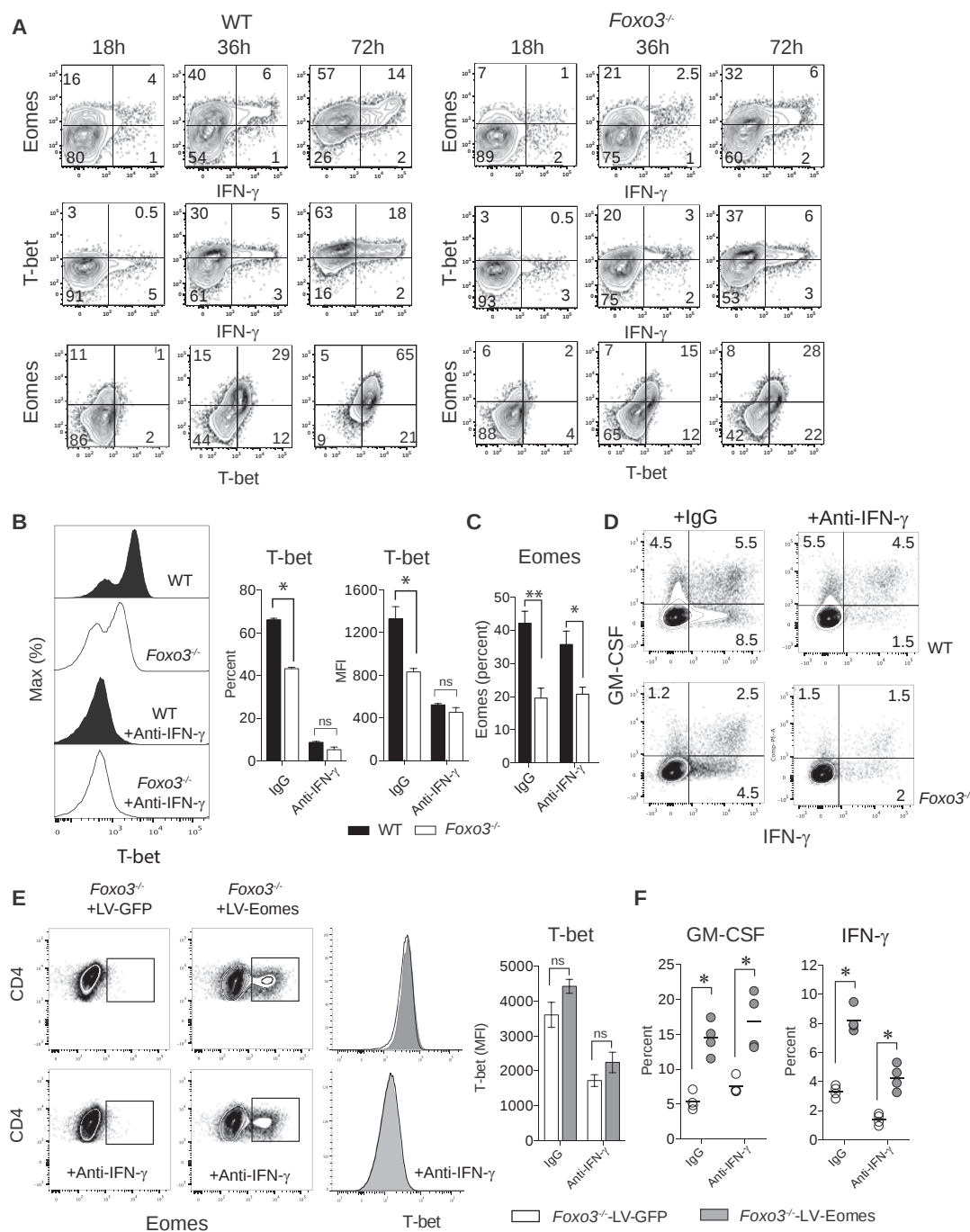


Figure 5. Eomes Acts Independently of T-bet for GM-CSF Regulation in CD4⁺ T Cells

(A) Kinetics of T-bet, Eomes, and IFN- γ expression in naive WT or Foxo3^{-/-} CD4⁺ T cells stimulated with 2 μ g/mL of anti-CD3 mAbs for 18, 36, or 72 hr (n = 4 mice per genotype).

(B and C) T-bet expression (B) or Eomes expression (C) in naive WT (black bars/histograms) or Foxo3^{-/-} (white bars/histograms) CD4⁺ T cells stimulated with anti-CD3 mAbs in the absence or presence of anti-IFN- γ blocking mAbs (n = 4–5 mice per group).

(D) Frequency of IFN- γ ⁺, IFN- γ ⁺GM-CSF⁺, and GM-CSF⁺ producing cells in naive WT or Foxo3^{-/-} CD4⁺ T cells cultured in the absence or presence of anti-IFN- γ neutralizing mAbs.

(E) Eomes and T-bet expression in naive WT or Foxo3^{-/-} CD4⁺ T cells transduced with either control (LV-GFP) or Eomes (LV-EOMES) expressing lentiviral particles in presence or absence of anti-IFN- γ mAbs.

(F) Frequency of GM-CSF⁺ and IFN- γ ⁺ producing cells in naive Foxo3^{-/-} CD4⁺ T cells transduced either with control (LV-GFP, open bars/dots) or Eomes (LV-EOMES, gray bars/dots) in presence or absence of anti-IFN- γ mAbs.

Data are representative of at least three independent experiments. Error bars, SEM; p values (Mann-Whitney U test). See also Figure S5.

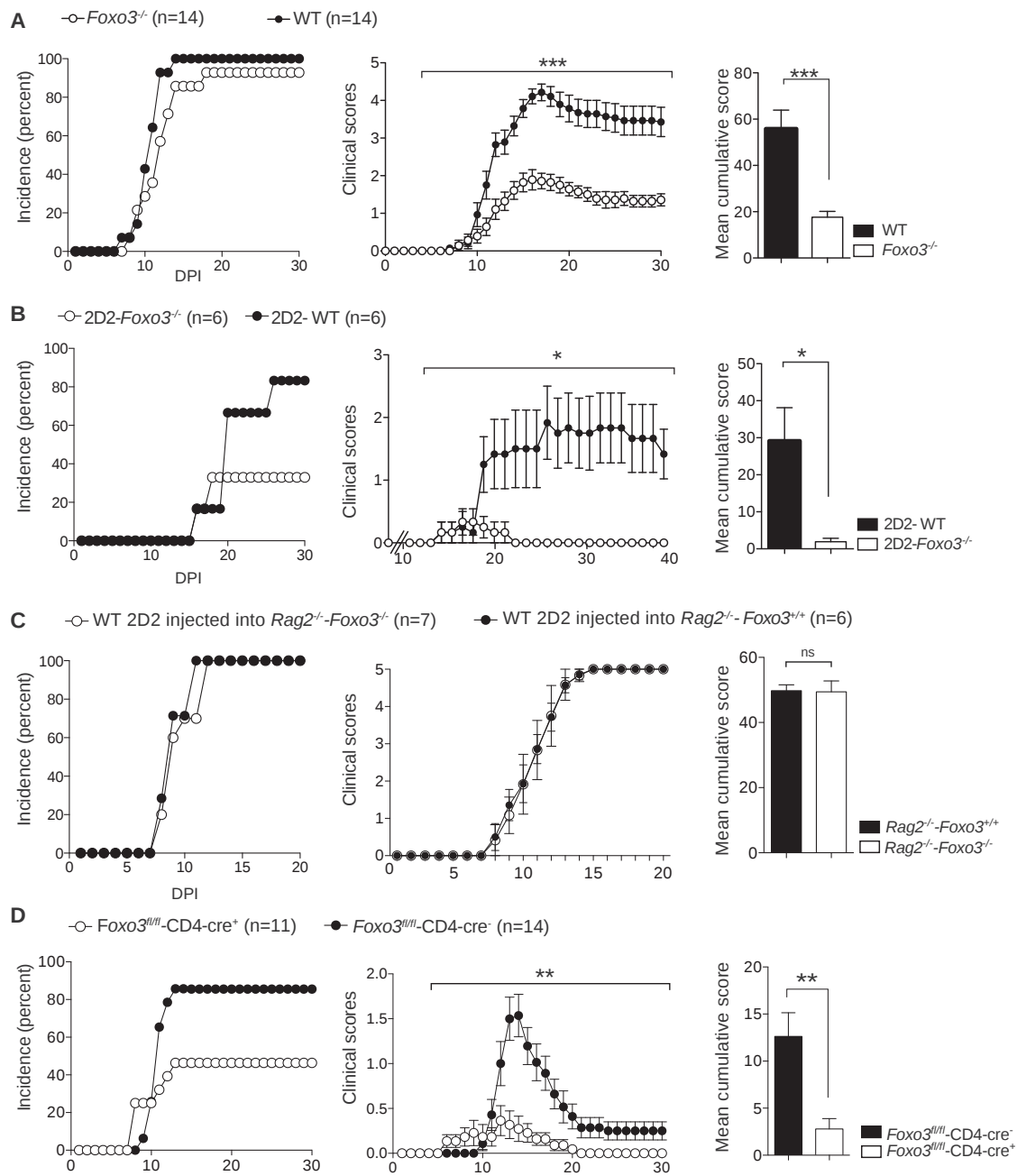


Figure 6. Total Foxo3-Deficient Mice and Mice with a T Cell-Specific Deletion of Foxo3 Are Less Susceptible to EAE

(A) Foxo3^{-/-} (open circles, bars) and WT littermate (black circles, bars) mice were immunized with 50 μ g of peptide MOG₃₅₋₅₅ emulsified in CFA at day 0 and 200 ng of pertussis toxin was injected i.v. on day 0 and day 2 (n = 14 mice per genotype). (B) 2D2-Foxo3^{-/-} (open circles, bars) or 2D2-WT (black circles, bars) were injected i.v. with 150 ng of pertussis toxin at day 0 (n = 6 mice per genotype). (C) Rag2^{-/-} Foxo3^{-/-} (open circles, bars) or Rag2^{-/-} Foxo3^{+/+} (black circles, bars) mice were injected i.v. with 2×10^4 2D2-WT naive CD4⁺ T cells mixed with 4×10^6 WT CD4⁺ T cells. Mice were then immunized with 50 μ g of peptide MOG₃₅₋₅₅ emulsified in CFA and injected i.v. with 100 ng of pertussis toxin (n = 6–7 mice per genotype). (D) Foxo3^{fl/fl}-CD4-cre⁺ (open circles, bars) or Foxo3^{fl/fl}-CD4-cre⁻ (black circles, bars) littermate controls were immunized as in (A). Incidence and mean cumulative clinical scores are shown (n = 11–14 per genotype).

Incidence, clinical scores, and mean with SEM of cumulative clinical scores were calculated. Error bars, SEM; p values (Mann-Whitney U test); p values for clinical scores (two-way ANOVA). Data are representative of at least three independent experiments. See also Figure S6.

WT littermate mice were isolated and characterized by flow cytometry. Analysis of T cell distribution in brain versus spinal cord showed that Foxo3-deficient T cells migrated preferentially

to the brain at the expense of the spinal cord (Figures S7B–S7D). As for their peripheral counterparts, Foxo3-deficient CD4⁺ T cells from the brain and spinal cord exhibited a decreased capacity

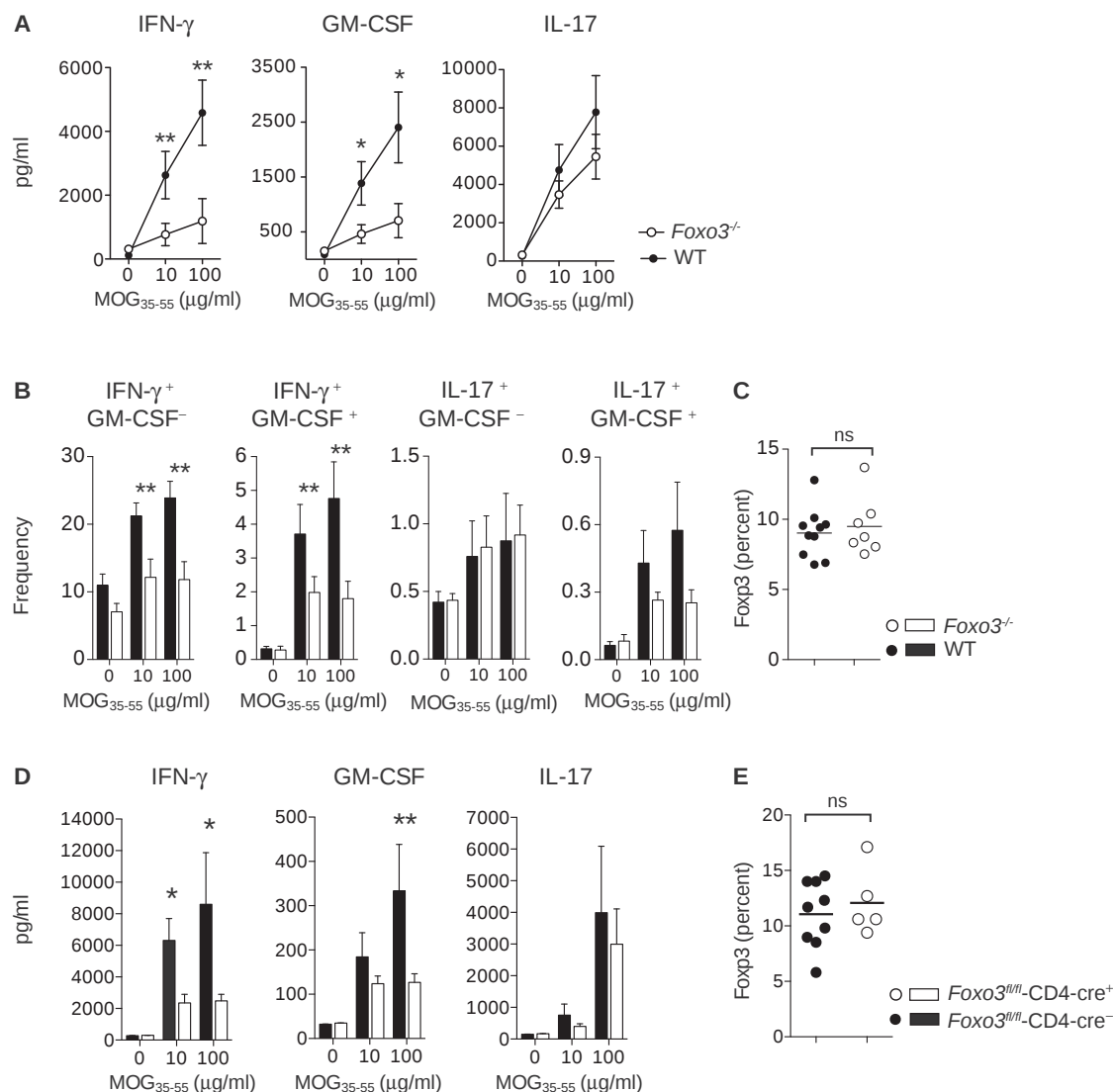


Figure 7. Foxo3 Deficiency in T Cells Is Associated with Reduced Differentiation of IFN- γ and GM-CSF Pathogenic CD4⁺ T Cells during EAE

(A) *Foxo3*^{-/-} (open circles, n = 8) and WT littermate (black circles, n = 8) mice were immunized with 50 μ g of peptide MOG₃₅₋₅₅ emulsified in CFA. At day 9 post-immunization, CD4⁺ T cells were purified from spleens and restimulated in vitro with WT APC and MOG₃₅₋₅₅ peptide. The secretion of IFN- γ , GM-CSF, and IL-17 was analyzed by ELISA in the supernatant after 3 days of culture (n = 4 mice per genotype).

(B) Frequency of IFN- γ ⁺, GM-CSF⁻, and IL-17-producing CD4⁺ T cells was determined by intracellular staining after overnight restimulation with MOG₃₅₋₅₅ peptide (n = 8 mice per genotype).

(C) The expression of Foxp3 by splenic CD4⁺ T cells from immunized WT and *Foxo3*^{-/-} mice was assessed by intracellular staining (n = 8 mice per genotype).

(D) *Foxo3*^{fl/fl}-Cd4-cre⁺ or *Foxo3*^{fl/fl}-Cd4-cre⁻ littermate controls were immunized with 100 μ g of peptide MOG₃₅₋₅₅ emulsified in CFA. At day 9 post-immunization, splenocytes were restimulated in vitro with MOG₃₅₋₅₅ peptide and IFN- γ , GM-CSF, and IL-17 secretion was analyzed by ELISA (n = 9 mice per genotype).

(E) The expression of Foxp3 by splenic CD4⁺ T cells from immunized *Foxo3*^{fl/fl}-Cd4-cre⁺ or *Foxo3*^{fl/fl}-Cd4-cre⁻ mice was assessed (n = 8 mice per genotype). Data are representative of at least two independent experiments. Error bars, SEM; p values (Mann-Whitney U test). See also Figure S7.

to secrete IFN- γ and GM-CSF (Figures S7C–S7E). The proportion of CNS-infiltrating Foxp3⁺CD4⁺ T cells was not altered by Foxo3 deficiency (Figure S7F).

As described in total *Foxo3*^{-/-} mice, MOG-specific CD4⁺ T cells from *Foxo3*^{fl/fl}-Cd4-cre⁺ exhibited decreased secretion of IFN- γ and GM-CSF whereas IL-17 secretion was unchanged (Figure 7D). Again, the frequency of Foxp3 Treg cells was unaltered in both periphery and CNS (Figure 7E and S7G). Altogether, these results reveal the T cell-intrinsic control of Foxo3 on

encephalitogenic CD4⁺ T cell differentiation and susceptibility to CNS autoimmunity.

DISCUSSION

Up to now, the role of Foxo3 in CD4⁺ T cell has been unappreciated, mainly because of its low expression in lymphoid cells and also because of the dominant role of Foxo1. The present study showed that TCR engagement results in increased expression

of Foxo3 in CD4⁺ T cells and that this increase correlates with TCR signaling strength. Moreover, this increased Foxo3 expression has a functional impact on CD4⁺ T cells. Foxo3 deletion in primary CD4⁺ T cells specifically impaired their ability to secrete IFN- γ and GM-CSF. Importantly, microarray analyses showed that decreased expression of genes involved in the IFN- γ pathway was not associated with global defect of CD4⁺ T cell activation or changes in expression of genes from Th2, Th17, or Treg cell programs, further demonstrating that Foxo3 plays a specific role in the polarization of pathogenic CD4⁺ T cells. These results are consistent with our in vitro and in vivo results showing that, after anti-CD3 stimulation or immunization with MOG₃₅₋₅₅ peptide, CD4⁺ T cells from Foxo3^{-/-} mice showed a decreased production of IFN- γ and GM-CSF whereas the ability of these cells to secrete IL-17, type 2 cytokines, or IL-10 was not affected. We therefore conclude that Foxo3 deficiency is not associated with a general defect in CD4⁺ T cell activation but rather impacts Th cell polarization by specifically disturbing the production of both IFN- γ and GM-CSF.

Several studies show that Foxo factors are crucial for Foxp3 Treg cell development and function (Kerdiles et al., 2010; Ouyang et al., 2010, 2012). We demonstrated here that the Treg cell program is not altered in Foxo3-deficient cells and that Foxo3-deficient Treg cells are as suppressive as WT Treg cells. Moreover, Foxo3 deficiency did not impact the proportion of peripheral or CNS-infiltrating Foxp3 Treg cells during EAE. Therefore, Foxo3 is not necessary for development, differentiation, migration, or function of Foxp3 Treg cells.

Analysis of the molecular mechanism underlying these phenotypes revealed that Foxo3 induces expression of the TF Eomes. We showed that Eomes expression is controlled by TCR signaling strength and correlates with the dynamics of Foxo3 expression in CD4⁺ T cells, supporting the notion that Foxo3 might regulate Eomes in CD4⁺ T cells. Eomes was indeed a direct target gene of Foxo3 in CD4⁺ T cells. Transactivation of Eomes by Foxo3 was dependent upon a 3' UTR distal region containing two FBSs and may correspond to an enhancer region. Accordingly, the analysis of Foxo3 genome-wide binding profile showed that this TF acts as a transcriptional activator, regulating target gene expression through transcription initiation by binding preferentially to enhancer regions with increased conservation (Eijkelenboom et al., 2013a, 2013b).

In CD4⁺ T cells, most of the described roles for Eomes are redundant with T-bet (Steiner et al., 2011; Suto et al., 2006; Yang et al., 2008). Here, we have provided information on the critical role of Eomes, independent of T-bet, in CD4⁺ T cell polarization. Overexpression of Eomes overcame the defect in IFN- γ and GM-CSF production by Foxo3-deficient CD4⁺ T cells, supporting the notion that Eomes is involved in *Ifng* and *Csf-2* regulation in CD4⁺ T cells. Moreover, under conditions in which T-bet upregulation was blocked, Eomes overexpression still resulted in increased IFN- γ and GM-CSF expression. These results are in agreement with data showing that Eomes is responsible for the T bet-independent production of IFN- γ in T-bet-deficient or GATA3-deficient CD4⁺ T cells (Yagi et al., 2010; Yang et al., 2008). Therefore, the Foxo3-Eomes axis is part of the signaling events responsible for the first wave of IFN- γ . As a consequence, decreased Eomes expression by

Foxo3-deficient cells led to reduction of IFN- γ and disrupted the positive feedback loop by which IFN- γ supports T-bet expression. Indeed, our results demonstrated that neither Eomes nor Foxo3 were able to directly regulate T-bet expression. Moreover, inhibition of the IFN- γ autocrine loop had no effect on GM-CSF secretion, further demonstrating that the Foxo3-Eomes pathway, but not T-bet, is critical for GM-CSF regulation (O'Connor et al., 2013).

Uncontrolled CD4⁺ T cell polarization may have pathological consequences and lead to autoimmune diseases. We showed that Foxo3 deficiency diminished disease severity and that this phenotype is T cell intrinsic and correlated with the reduced ability of Foxo3-deficient CD4⁺ T cells to differentiate into IFN- γ - and GM-CSF-producing CD4⁺ T cells. IFN- γ , IL-17, and GM-CSF are the main effector cytokines in the pathophysiology of both EAE and MS (Codarri et al., 2010; Goverman, 2009; Korn et al., 2009). In immunized Foxo3-deficient animals, the frequency of MOG-specific Th17 cells was unaffected, excluding the involvement of Th17 cells in the observed phenotype. Decreased IFN- γ production by Foxo3-deficient CD4⁺ T cells may impact T cell distribution within the CNS. Indeed, Foxo3-deficient T cells migrated preferentially to the brain rather than spinal cord. These results are consistent with studies showing that the Th17-Th1 cell ratio of infiltrating T cells determines the topography of CNS inflammation (Goverman, 2009; Stromnes et al., 2008). However, we can not exclude that Foxo3 might have a direct role in T cell migration and homing since microarray analysis showed that Foxo3-deficient CD4⁺ T cells exhibited increased expression of *Klf2*, *S1pr1*, and *Sell* and decreased expression of *Ccr8*.

Perhaps most importantly, we showed that Foxo3 deficiency also impacted the ability of CD4⁺ T cell to produce GM-CSF, a key factor in the effector phase of EAE (McQualter et al., 2001; Ponomarev et al., 2007). Both Th1 and Th17 cells can secrete GM-CSF during EAE (Codarri et al., 2011). However, a recent study showed that GM-CSF⁺ Th cells might represent a unique Th cell lineage distinct from that of Th1 and Th17 cells (Hernandez-Brandstetter and Flavell, 2014; Sheng et al., 2014). The factors regulating *Csf2* expression remain to be defined (Croxford et al., 2015). Here, we have shown that GM-CSF-producing CD4⁺ T cells exhibited high and sustained expression of Eomes and that low Eomes expression impaired the differentiation of GM-CSF-producing cells. These data suggest the implication of this TF in the gene program of GM-CSF-secreting CD4⁺ T cells. In agreement, recent transcriptomic studies showed that *Eomes* is among the genes that are specifically expressed by the GM-CSF⁺ Th cell lineage (Sheng et al., 2014). The role of this T-box transcription factor in CNS neuroinflammation has recently been demonstrated. Indeed, mice harboring a T cell-specific deletion of *Eomes* developed EAE with reduced severity, a similar phenotype as Foxo3-deficient mice (Raveney et al., 2015). Moreover, *EOMES* has been identified as a susceptibility gene in MS (Parnell et al., 2014; Patsopoulos et al., 2011). In addition, an increased proportion of Eomes⁺CD4⁺ T cells has been reported in patients with secondary progressive MS as compared to relapsing remitting MS or healthy controls and these cells accumulate in the CSF from MS patients, further supporting the role of this transcription factor in CNS inflammation in humans (Raveney et al., 2015).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Mice

Foxo3^{-/-} (Dejean et al., 2009), 2D2 (Bettelli et al., 2003), *Eomes*^{fl/fl}*Cd4-cre* (Zhu et al., 2010), *Foxo3*^{fl/fl}*Cd4-cre* (Paik et al., 2007), and C57BL/6 mice were maintained in the breeding facility of PreCREFRE (Toulouse UMS06) under SPF conditions. All animal procedures were conducted in accordance with institutional guidelines on Animal Experimentation and were under a French Ministry of Agriculture license.

Experimental Autoimmune Encephalomyelitis

To induce active EAE, mice were immunized with 50 μ g of MOG₃₅₋₅₅ peptide (Polypeptide) emulsified with Complete Freund Adjuvant (CFA) containing 2 mg/mL of *Mycobacterium tuberculosis* (Difco). 200 ng/mL of pertussis toxin (COGER) was given at day 0 and day 2 after immunization. For *Foxo3*^{fl/fl}*-Cd4-cre*, 100 μ g of MOG₃₅₋₅₅ peptide was used. Clinical score were evaluated on a five-stage scale from 0 to 5.

CD4⁺ T Cell Purification, Stimulation, and Flow Cytometry

Naive CD62L⁺CD4⁺ T cells were obtained by negative selection of total CD4⁺ T cells (Dyna) and positive selection by CD62L⁺ beads (Myltenyi). Naive CD4⁺ T cells were stimulated with anti-CD3 antibody (Biolegend) with or without anti-CD28 (BD Biosciences) in non-polarizing condition or with IL-12 and IL-2 (R&D) for Th1 cell-polarizing condition. Cytokines and transcription factor expression were measured by intracellular staining using the "Foxp3 staining buffer" (Ebioscience). Antibodies were all purchased from Ebioscience, BD PharMingen, or Cell Signaling for anti-Foxo3 mAbs (clone 75D8). All samples were acquired and analyzed with the LSR II flow cytometer (Becton Dickinson) and FlowJo software (TreeStar).

Microarray Gene Expression Study

Gene expression analysis was performed on purified naive CD4⁺ T cells from *Foxo3*^{-/-} (n = 3–4) or WT (n = 4) littermate controls either unstimulated (T0) or stimulated with 2 μ g/mL of anti-CD3 mAbs for 12 (T12) or 24 (T24) hours at the GeT facility (GénoToul, Génopole Toulouse Midi-Pyrénées) using Agilent Sureprint G3 Mouse microarrays (8x60K, design 028005) according to the manufacturer's instructions.

Chromatin Immunoprecipitation

CD4⁺ T cells were stimulated with anti-CD3 (2 μ g/mL) and anti-CD28 (1 μ g/mL) mAbs for 24 hr. Foxo3 ChIP experiments were performed using iDeal ChIP-Seq Kit for Transcription Factors (Diagenode, C01010055) with some modifications. In brief, cells were fixed with 1% PFA during 15 min and then glycine (0.250 mM) was added. Cells were then lysed with manufacturer's buffers and sonicated with 15 cycles of 30 s ON/60 s OFF using a bioruptor pico. Sonicated chromatin was incubated overnight at 4°C either with 5 μ g of anti-Foxo3 antibody (Santa Cruz cat# sc-11351X) or an IgG control. Chromatin was then washed and eluted using manufacturer's recommendations. For ChIP analysis, qPCR was performed using SyberGreen Master mix (Roche) on a 480 LightCycler in duplicate with primers listed in Table S1. Percent of input was calculated using the following formula: 2^Δ(adjusted INPUT-Ct (IP))×100 where adjusted INPUT = Ct INPUT – log₂ (1).

Luciferase Assay

HEK293T cells were co-transfected both with *Eomes*_{Luc} or *pEomes*_{p3'E_{Luc}} plasmids together with plasmids coding for different forms of FOXO3 (FOXO3TM, FOXO3TM-H212R, or FOXO3-A32A253-Nter) or with an empty vector using Genejuice (Novagen). Luciferase assays were performed with a dual luciferase assay kit (Promega, Dual-Luciferase Reporter Assay System, E1910) and all luciferase activities were normalized to the expression of the co-transfected Renilla luciferase.

Lentiviral Vector Transduction of Naive CD4⁺ T Cells

The gene encoding *eomes* was synthesized and fully sequenced by Life Technologies. The cDNA was then inserted into a pWPXLD-IRES-GFP backbone vector using *Bam*HI and *Pme*I restriction sites to make the pWPXLD-Eomes-IRES-GFP vector. 5 × 10⁶ naive *Foxo3*^{-/-} CD4⁺ T cells were activated with anti-CD3 (3 μ g/mL) plus soluble anti-CD28 (2 μ g/mL) and IL-2 (10 UI/mL) in

p24-well plates coated overnight with 40 μ g/mL of RetroNectin (TAKRA). 18 hr after activation, the medium was replaced by OptiMEM medium containing lentiviral particles (LV-EOMES or LV-GFP). Anti-CD28 and IL-2 were added (10 UI/mL and 2 μ g/mL, respectively). Cells were then centrifuged (3,000 rpm) for 1 hr at 32°C and incubated overnight at 37°C. The next day, supernatant was replaced by complete RPMI medium supplemented with IL-2 (10 UI/mL) and anti-CD28 (2 μ g/mL). 72 hr after transduction, infected cells were then activated with PMA plus ionomycin (0.5 μ g/mL each) for 4 hr plus Golgiplug (1/1,000). Cells were then stained and analyzed by flow cytometry (FACS LSRII).

Statistical Analysis

p values were determined by Mann-Whitney tests. p values < 0.05 were considered statistically significant (**p < 0.001, *p < 0.005, *p < 0.01). All error bars represent the SEM. For EAE clinical scores, p values were determined by two-way ANOVA (**p < 0.001, **p < 0.005, *p < 0.01).

ACCESSION NUMBERS

Microarray data and experimental details are available in the Gene Expression Omnibus (GEO) database (accession GSE86287).

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes seven figures, one table, and Supplemental Experimental Procedures and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2016.09.010>.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

C.S. and M.F.M. performed experiments and data analysis and helped to write the manuscript, and M.B., N.C., and I.B. performed experiments and data analysis and helped with in vivo experiments. X.-H.N. performed experiments related to luciferase constructs. Y.L. performed microarray data analysis and design. S.M.H. provided mice and helped to write the manuscript. F.D. helped with in vitro experiment. R.S.L. and A.S. gave advice for experiment procedures and helped to write the manuscript. A.S.D. performed and oversaw research, designed experiments, and wrote the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Dr. B. Li (Institut Pasteur of Shanghai, China) for providing us the pGL3-Eomes-Luc reporter construct; Dr. C. Charvet (Institut Cochin, Paris, France) for FOXO3 plasmids; A. Thouard and Dr. M. Szelechowski for advice in lentiviral production; Dr. V. Adoue and Dr. O. Joffre for their help on ChIP experiments; Dr. S. Kassem for her expertise on EAE experiments; Dr. L.T. Mars for his help with funding; and Dr. D. Dunia, Dr. N. Fazilleau, and Dr. R. Lesourne for their critical comments on the manuscript. We would also like to thank the flow cytometry and microscopy core facility (CPTP) and the animal house staff members for their technical assistance (UMS 06). This work was supported financially by grants from Inserm Dotation (Nouveau-recruté), the ANR (project ANR-09-RPDOC-015-01), ARSEP Foundation (project R12195BB) and Midi-Pyrénées Region. C.S. was the recipient of a doctoral fellowship from ARSEP Fondation (R14067BB).

Received: March 17, 2015

Revised: August 21, 2016

Accepted: September 12, 2016

Published: October 11, 2016

REFERENCES

- Amin, R.H., and Schlissel, M.S. (2008). Foxo1 directly regulates the transcription of recombination-activating genes during B cell development. *Nat. Immunol.* 9, 613–622.
- Bettelli, E., Pagany, M., Weiner, H.L., Linington, C., Sobel, R.A., and Kuchroo, V.K. (2003). Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor

- transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *J. Exp. Med.* 197, 1073–1081.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., and Greenberg, M.E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857–868.
- Charvet, C., Alberti, I., Luciano, F., Jacquelin, A., Bernard, A., Auberger, P., and Deckert, M. (2003). Proteolytic regulation of Forkhead transcription factor FOXO3a by caspase-3-like proteases. *Oncogene* 22, 4557–4568.
- Codazzi, L., Fontana, A., and Becher, B. (2010). Cytokine networks in multiple sclerosis: lost in translation. *Curr. Opin. Neurol.* 23, 205–211.
- Codazzi, L., Gyölvéski, G., Tosevski, V., Hesske, L., Fontana, A., Magnenat, L., Suter, T., and Becher, B. (2011). ROR γ t drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat. Immunol.* 12, 560–567.
- Croxford, A.L., Spath, S., and Becher, B. (2015). GM-CSF in neuroinflammation: licensing myeloid cells for tissue damage. *Trends Immunol.* 36, 651–662.
- Dejean, A.S., Beisner, D.R., Ch'en, I.L., Kerdiles, Y.M., Babour, A., Arden, K.C., Castrillon, D.H., DePinho, R.A., and Hedrick, S.M. (2009). Transcription factor Foxo3 controls the magnitude of T cell immune responses by modulating the function of dendritic cells. *Nat. Immunol.* 10, 504–513.
- Dejean, A.S., Hedrick, S.M., and Kerdiles, Y.M. (2011). Highly specialized role of forkhead box O transcription factors in the immune system. *Antioxid. Redox Signal.* 14, 663–674.
- Dengler, H.S., Baracho, G.V., Otori, S.A., Bruckner, S., Arden, K.C., Castrillon, D.H., DePinho, R.A., and Rickert, R.C. (2008). Distinct functions for the transcription factor Foxo1 at various stages of B cell differentiation. *Nat. Immunol.* 9, 1388–1398.
- Eijkelenboom, A., and Burgering, B.M. (2013). FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 83–97.
- Eijkelenboom, A., Mokry, M., de Wit, E., Smits, L.M., Polderman, P.E., van Triest, M.H., van Bortel, R., Schulze, A., de Laat, W., Cuppen, E., and Burgering, B.M. (2013a). Genome-wide analysis of FOXO3 mediated transcription regulation through RNA polymerase II profiling. *Mol. Syst. Biol.* 9, 638.
- Eijkelenboom, A., Mokry, M., Smits, L.M., Nieuwenhuis, E.E., and Burgering, B.M. (2013b). FOXO3 selectively amplifies enhancer activity to establish target gene regulation. *Cell Rep.* 5, 1664–1678.
- Goverman, J. (2009). Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 393–407.
- Hedrick, S.M. (2009). The cunning little vixen: Foxo and the cycle of life and death. *Nat. Immunol.* 10, 1057–1063.
- Hedrick, S.M., Hess Michelini, R., Doedens, A.L., Goldrath, A.W., and Stone, E.L. (2012). FOXO transcription factors throughout T cell biology. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 649–661.
- Herndler-Brandstetter, D., and Flavell, R.A. (2014). Producing GM-CSF: a unique T helper subset? *Cell Res.* 24, 1379–1380.
- Kerdiles, Y.M., Beisner, D.R., Tinoco, R., Dejean, A.S., Castrillon, D.H., DePinho, R.A., and Hedrick, S.M. (2009). Foxo1 links homing and survival of naive T cells by regulating L-selectin, CCR7 and interleukin 7 receptor. *Nat. Immunol.* 10, 176–184.
- Kerdiles, Y.M., Stone, E.L., Beisner, D.R., McGargill, M.A., Ch'en, I.L., Stockmann, C., Katayama, C.D., and Hedrick, S.M. (2010). Foxo transcription factors control regulatory T cell development and function. *Immunity* 33, 890–904.
- Kim, M.V., Ouyang, W., Liao, W., Zhang, M.Q., and Li, M.O. (2013). The transcription factor Foxo1 controls central-memory CD8 $^{+}$ T cell responses to infection. *Immunity* 39, 286–297.
- Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. (2009). IL-17 and Th17 cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 485–517.
- Lainé, A., Martin, B., Luka, M., Mir, L., Auffray, C., Lucas, B., Bismuth, G., and Charvet, C. (2015). Foxo1 is a T cell-intrinsic inhibitor of the ROR γ t-Th17 program. *J. Immunol.* 195, 1791–1803.
- Lee, J.C., Espéli, M., Anderson, C.A., Linterman, M.A., Pocock, J.M., Williams, N.J., Roberts, R., Viatte, S., Fu, B., Peshu, N., et al.; UK IBD Genetics Consortium (2013). Human SNP links differential outcomes in inflammatory and infectious disease to a FOXO3-regulated pathway. *Cell* 155, 57–69.
- Li, C., Ebert, P.J., and Li, Q.J. (2013a). T cell receptor (TCR) and transforming growth factor β (TGF- β) signaling converge on DNA (cytosine-5)-methyltransferase to control forkhead box protein 3 (foxp3) locus methylation and inducible regulatory T cell differentiation. *J. Biol. Chem.* 288, 19127–19139.
- Li, Y., Tsun, A., Gao, Z., Han, Z., Gao, Y., Li, Z., Lin, F., Wang, Y., Wei, G., Yao, Z., and Li, B. (2013b). 60-kDa Tat-interactive protein (TIP60) positively regulates Th-inducing POK (ThPOK)-mediated repression of eomesodermin in human CD4 $^{+}$ T cells. *J. Biol. Chem.* 288, 15537–15546.
- McQualter, J.L., Darwiche, R., Ewing, C., Onuki, M., Kay, T.W., Hamilton, J.A., Reid, H.H., and Bernard, C.C. (2001). Granulocyte macrophage colony-stimulating factor: a new putative therapeutic target in multiple sclerosis. *J. Exp. Med.* 194, 873–882.
- Merkenschlager, M., and von Boehmer, H. (2010). PI3 kinase signalling blocks Foxp3 expression by sequestering Foxo factors. *J. Exp. Med.* 207, 1347–1350.
- O'Connor, R.A., Cambrook, H., Huettnier, K., and Anderton, S.M. (2013). T-bet is essential for Th1-mediated, but not Th17-mediated, CNS autoimmune disease. *Eur. J. Immunol.* 43, 2818–2823.
- Obsil, T., and Obsilova, V. (2011). Structural basis for DNA recognition by FOXO proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 1946–1953.
- Oestreich, K.J., Mohn, S.E., and Weinmann, A.S. (2012). Molecular mechanisms that control the expression and activity of Bcl-6 in TH1 cells to regulate flexibility with a TFH-like gene profile. *Nat. Immunol.* 13, 405–411.
- Ouyang, W., and Li, M.O. (2011). Foxo: in command of T lymphocyte homeostasis and tolerance. *Trends Immunol.* 32, 26–33.
- Ouyang, W., Beckett, O., Flavell, R.A., and Li, M.O. (2009). An essential role of the Forkhead-box transcription factor Foxo1 in control of T cell homeostasis and tolerance. *Immunity* 30, 358–371.
- Ouyang, W., Beckett, O., Ma, Q., Paik, J.H., DePinho, R.A., and Li, M.O. (2010). Foxo proteins cooperatively control the differentiation of Foxp3 $^{+}$ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 11, 618–627.
- Ouyang, W., Liao, W., Luo, C.T., Yin, N., Huse, M., Kim, M.V., Peng, M., Chan, P., Ma, Q., Mo, Y., et al. (2012). Novel Foxo1-dependent transcriptional programs control T(reg) cell function. *Nature* 491, 554–559.
- Paik, J.H., Kollipara, R., Chu, G., Ji, H., Xiao, Y., Ding, Z., Miao, L., Tothova, Z., Horner, J.W., Carrasco, D.R., et al. (2007). FoxOs are lineage-restricted redundant tumor suppressors and regulate endothelial cell homeostasis. *Cell* 128, 309–323.
- Parnell, G.P., Gatt, P.N., Krupa, M., Nickles, D., McKay, F.C., Schibeci, S.D., Batten, M., Baranzini, S., Henderson, A., Barnett, M., et al. (2014). The autoimmune disease-associated transcription factors EOMES and TBX21 are dysregulated in multiple sclerosis and define a molecular subtype of disease. *Clin. Immunol.* 151, 16–24.
- Patsopoulos, N.A., Esposito, F., Reischl, J., Lehr, S., Bauer, D., Heubach, J., Sandbrink, R., Pohl, C., Edan, G., Kappos, L., et al.; Bayer Pharma MS Genetics Working Group; Steering Committees of Studies Evaluating IFN β -1b and a CCR1-Antagonist; ANZgene Consortium; GeneMSA; International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (2011). Genome-wide meta-analysis identifies novel multiple sclerosis susceptibility loci. *Ann. Neurol.* 70, 897–912.
- Ponomarev, E.D., Shriver, L.P., Maresz, K., Pedras-Vasconcelos, J., Verthelyi, D., and Dittel, B.N. (2007). GM-CSF production by autoreactive T cells is required for the activation of microglial cells and the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 178, 39–48.
- Raveney, B.J., Oki, S., Hohjoh, H., Nakamura, M., Sato, W., Murata, M., and Yamamura, T. (2015). Eomesodermin-expressing T-helper cells are essential for chronic neuroinflammation. *Nat. Commun.* 6, 8437.
- Schulz, E.G., Mariani, L., Radbruch, A., and Höfer, T. (2009). Sequential polarization and imprinting of type 1 T helper lymphocytes by interferon-gamma and interleukin-12. *Immunity* 30, 673–683.
- Sheng, W., Yang, F., Zhou, Y., Yang, H., Low, P.Y., Kemeny, D.M., Tan, P., Moh, A., Kaplan, M.H., Zhang, Y., and Fu, X.Y. (2014). STAT5 programs a

distinct subset of GM-CSF-producing T helper cells that is essential for autoimmune neuroinflammation. *Cell Res.* **24**, 1387–1402.

Steiner, D.F., Thomas, M.F., Hu, J.K., Yang, Z., Babiarz, J.E., Allen, C.D., Matloubian, M., Blelloch, R., and Ansel, K.M. (2011). MicroRNA-29 regulates T-box transcription factors and interferon- γ production in helper T cells. *Immunity* **35**, 169–181.

Stone, E.L., Pepper, M., Katayama, C.D., Kerdiles, Y.M., Lai, C.Y., Emslie, E., Lin, Y.C., Yang, E., Goldrath, A.W., Li, M.O., et al. (2015). ICOS coreceptor signaling inactivates the transcription factor FOXO1 to promote Tfh cell differentiation. *Immunity* **42**, 239–251.

Stromnes, I.M., Cerretti, L.M., Liggitt, D., Harris, R.A., and Goverman, J.M. (2008). Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells. *Nat. Med.* **14**, 337–342.

Sullivan, J.A., Kim, E.H., Plisch, E.H., Peng, S.L., and Suresh, M. (2012a). FOXO3 regulates CD8 T cell memory by T cell-intrinsic mechanisms. *PLoS Pathog.* **8**, e1002533.

Sullivan, J.A., Kim, E.H., Plisch, E.H., and Suresh, M. (2012b). FOXO3 regulates the CD8 T cell response to a chronic viral infection. *J. Virol.* **86**, 9025–9034.

Suto, A., Wurster, A.L., Reiner, S.L., and Grusby, M.J. (2006). IL-21 inhibits IFN- γ production in developing Th1 cells through the repression of Eomesodermin expression. *J. Immunol.* **177**, 3721–3727.

Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G., and Glimcher, L.H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* **100**, 655–669.

van der Vos, K.E., and Coffey, P.J. (2011). The extending network of FOXO transcriptional target genes. *Antioxid. Redox Signal.* **14**, 579–592.

Yagi, R., Junttila, I.S., Wei, G., Urban, J.F., Jr., Zhao, K., Paul, W.E., and Zhu, J. (2010). The transcription factor GATA3 actively represses RUNX3 protein-regulated production of interferon- γ . *Immunity* **32**, 507–517.

Yang, Y., Xu, J., Niu, Y., Bromberg, J.S., and Ding, Y. (2008). T-bet and eomesodermin play critical roles in directing T cell differentiation to Th1 versus Th17. *J. Immunol.* **181**, 8700–8710.

Zhao, Y., Wang, Y., and Zhu, W.G. (2011). Applications of post-translational modifications of FoxO family proteins in biological functions. *J. Mol. Cell Biol.* **3**, 276–282.

Zhu, Y., Ju, S., Chen, E., Dai, S., Li, C., Morel, P., Liu, L., Zhang, X., and Lu, B. (2010). T-bet and eomesodermin are required for T cell-mediated antitumor immune responses. *J. Immunol.* **185**, 3174–3183.

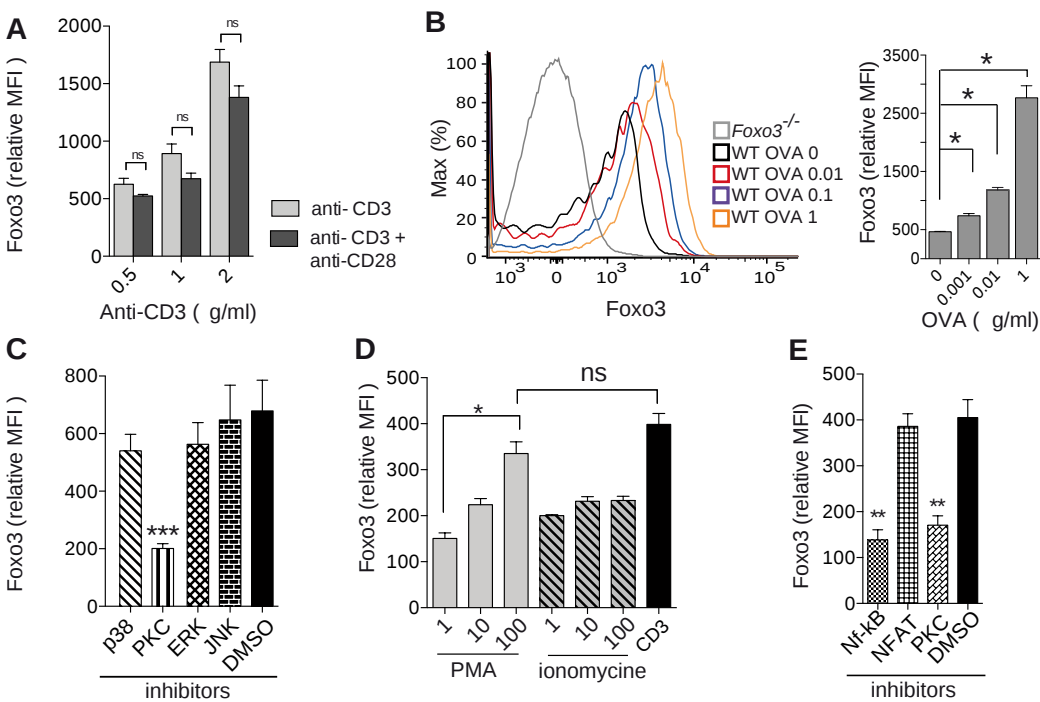
Immunity, Volume 45

Supplemental Information

Foxo3 Transcription Factor Drives Pathogenic T Helper 1 Differentiation by Inducing the Expression of Eomes

Caroline Stienne, Michaël F. Michieletto, Mehdi Benamar, Nadège Carrié, Isabelle Bernard, Xuan-Hung Nguyen, Yannick Lippi, Fanny Duguet, Roland S. Liblau, Stephen M. Hedrick, Abdelhadi Saoudi, and Anne S. Dejean

Figure S1 related to Figure 1



Stienne et al. Figure S1

Figure S2 related to Figure 2

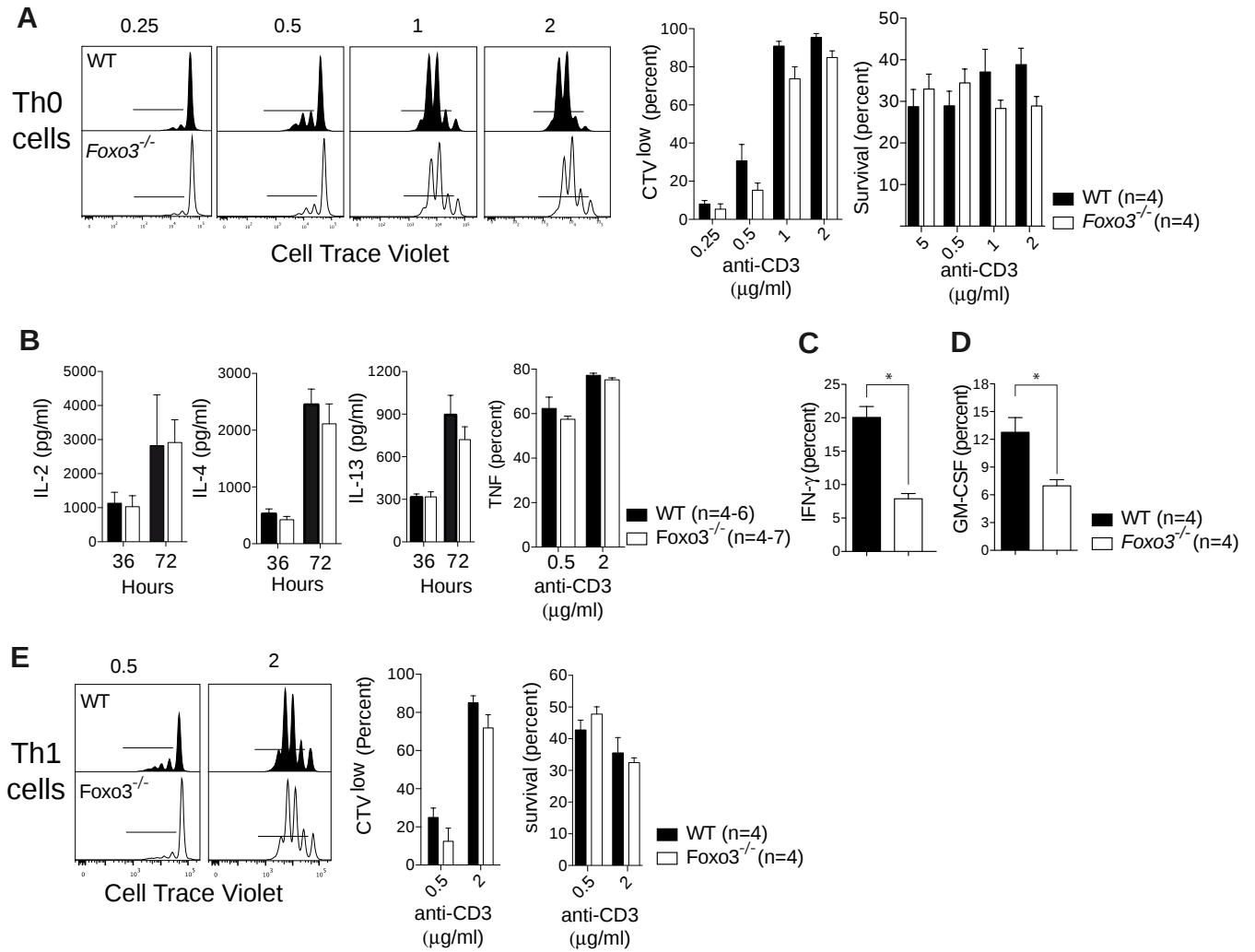


Figure S3 related to Figure 2

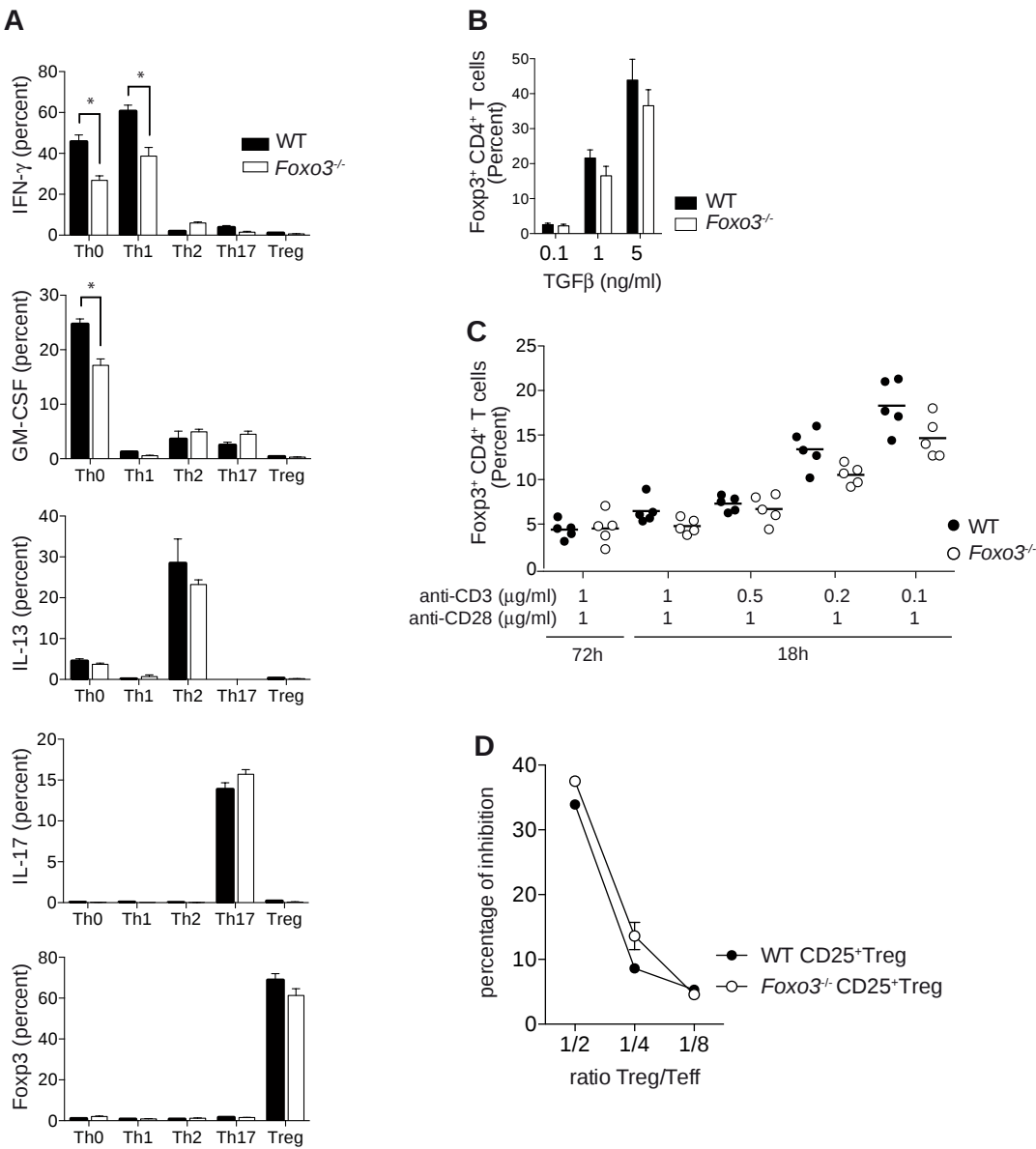
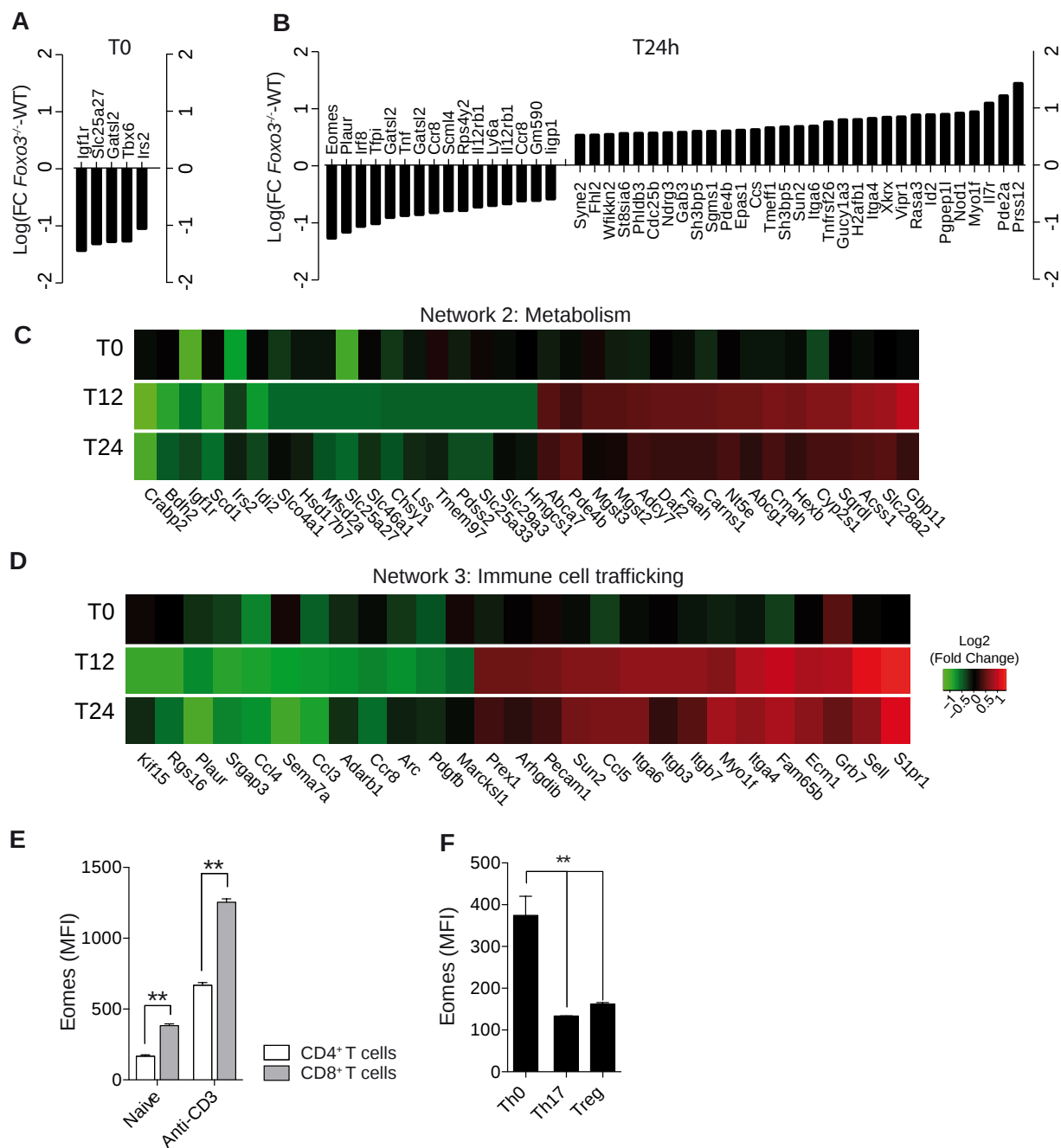


Figure S4 related to Figure 3



Stienne et al. Figure S4

Figure S5 related to Figure 4 and 5

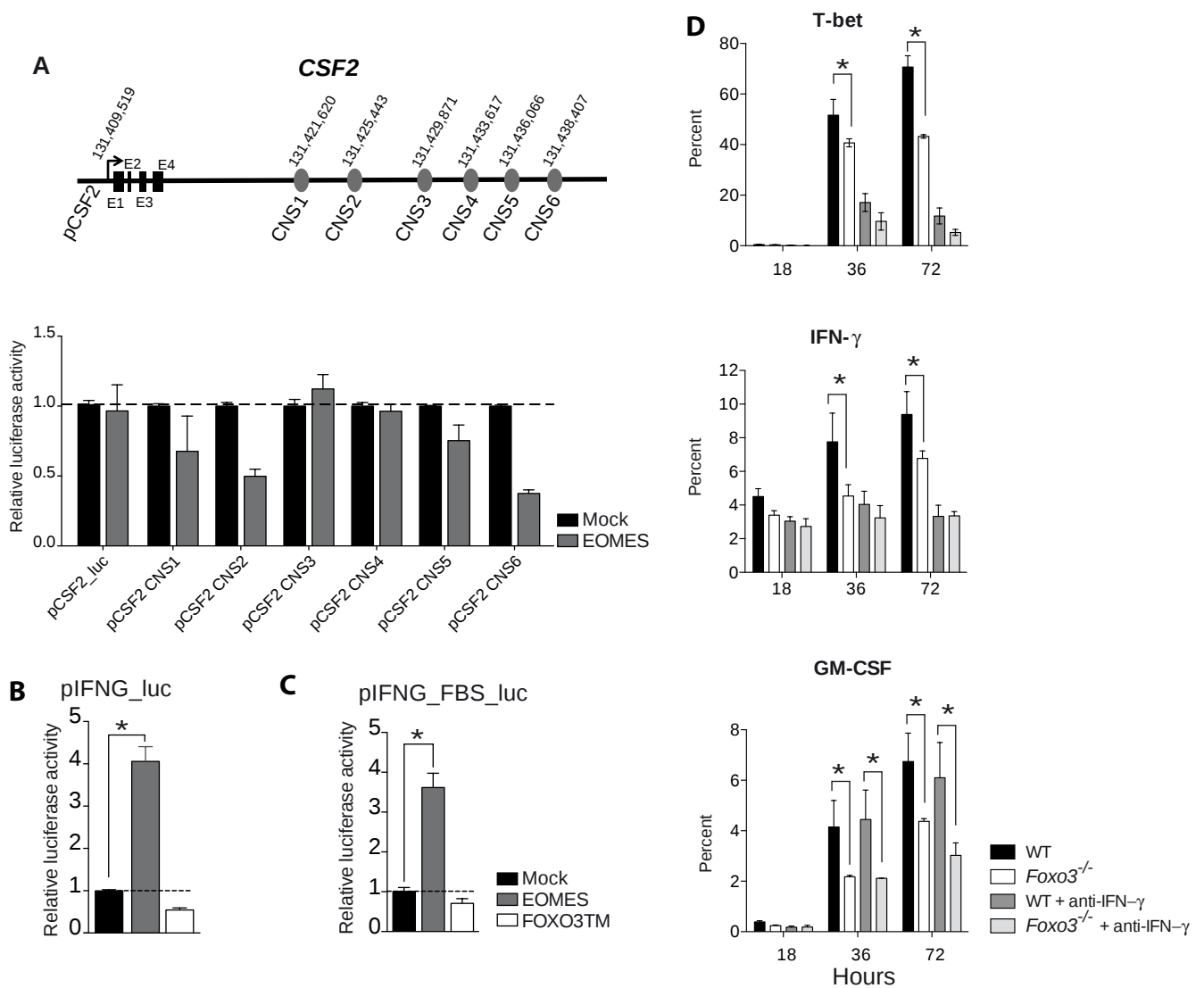
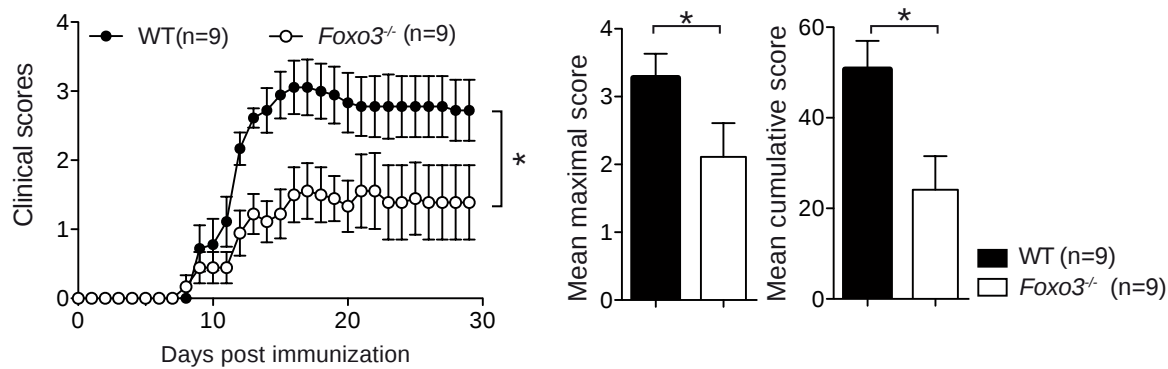


Figure S6 related to Figure 6

A



B

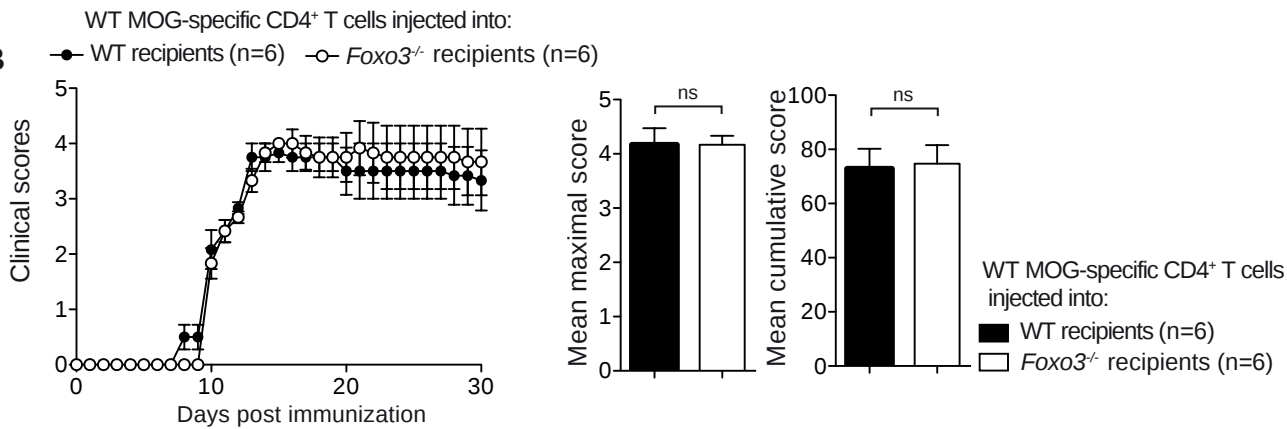
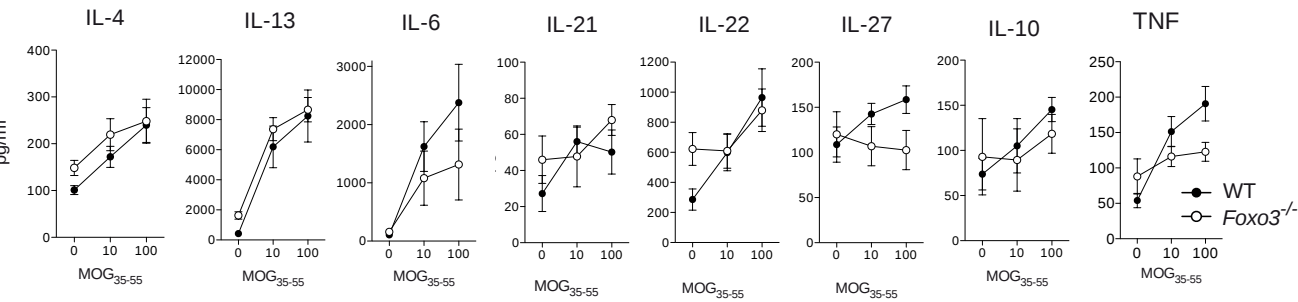
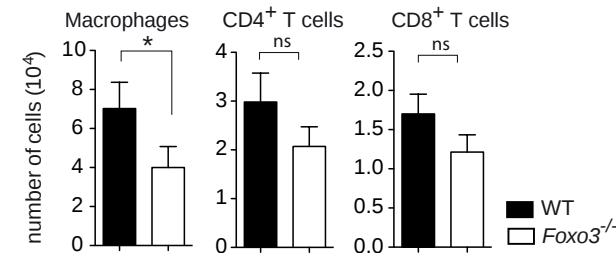


Figure S7 related to Figure 7

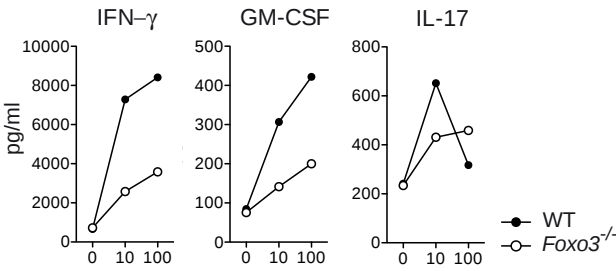
A Splenic CD4⁺ T cells



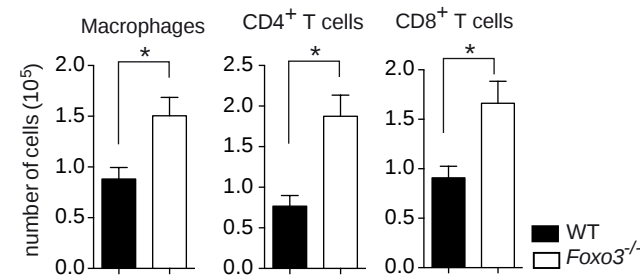
B Spinal Cord



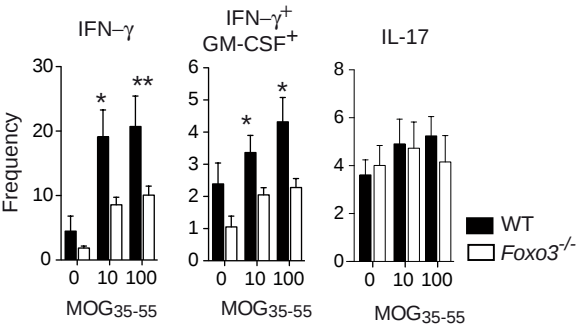
C Spinal Cord



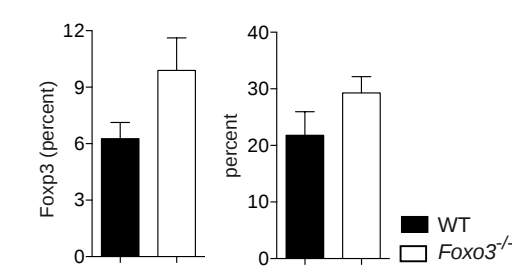
D Brain



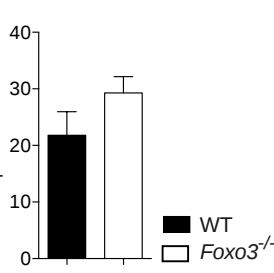
E Brain



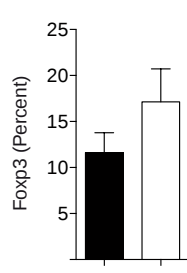
F Spinal Cord



Brain



G Spinal Cord



Brain

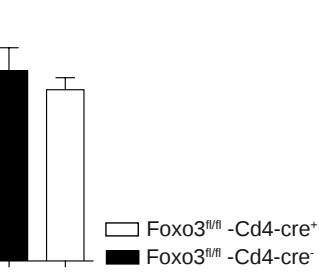


Table S1 related to Experimental Procedures

ChIP		
Region	Forward/Reverse	Sequence
FBS1	Forward:	CGGGGTTTGTTTTCTTGCG
	Reverse:	GATTGTAGGTGCCCTTTCTCT
FBS2	Forward:	AAGATCAAGGTCTGGGAACCCG
	Reverse:	GTGGGGAGTGTAACAAGCCG
FBS3	Forward:	CACCGATAACAAGCCTCCATT
	Reverse:	GGGTTCCCAGACCTTGATCTTTAT
3105	Forward:	AGAGACTTCGGGTCGCTCTC
	Reverse:	GTCTACCCACGGCATAGGAA

Plasmids		
Target	Forward/Reverse	Sequence
csf2 promoter	Forward:	CTCTGGTACCGCCGAGTCAAGGTCACACCA
	Reverse:	CTCTGCTAGCCATCCTCCAGAGAACTTTAG
CNS1-csf2	Forward:	CTCTGGATCCACTGGGGCCTCCTCTTCCTC
	Reverse:	CTCTGTCGACTCATGGTCTGCTGTGCTCG
CNS2-csf2	Forward:	CTCTGGATCCATTGTGTCTTTATTCTTGCAAAAT
	Reverse:	CTCTGTCGACAGTCTGAACCACTTGGGCAT
CNS3-csf2	Forward:	CTCTAGATCTTTGGCCTTTAGACCGCAAAGT
	Reverse:	CTCTGTCGACCAAGGCCCTGGAGCTGGGA
CNS4-csf2	Forward:	CTCTGGATCCGCTGTCAAAGATGTCTCATG
	Reverse:	CTCTGTCGACTGGAAGAAGAATCATCAGCA
CNS5-csf2	Forward:	CTCTGGATCCCCCATGCCATGATACACATT
	Reverse:	CTCTGTCGACTCCCTTAGAAAGGGAGAAATT
CNS6-csf2	Forward:	CTCTGGATCCTGGACTAAGAAGTGGCAGAG
	Reverse:	CTCTGTCGACGAAGTGGAAACAGAGATGCA
Foxo-binding-Site pIFNG	Forward:	AGCTTTCTCTCGGCAAGAGCAGTAACCTGG
	Reverse:	TGGGTTGTTTTCTTCTAGTCACCTGATAGGATTTCCAGGAC AAGAGAGCCGTTTCTCGTCATTGAACACCC AACAAAAGAAGAATCAGTGGACTATCCTAAAGGGTCTGAGCT

Supplementary Figure legends

Figure S1 related to Figure 1: (A) Intracellular staining of Foxo3 expression by naive CD62L⁺ CD25⁻ CD4⁺ T cells stimulated with the indicated doses of anti-CD3 mAbs alone (light grey bars) or anti-CD3 and anti-CD28 mAbs (dark grey bars). (B) Intracellular staining of Foxo3 expression by naive WT OT2 CD4⁺ T cells stimulated with APC and indicated amount of OVA₃₂₃₋₃₃₉ peptide for 72 hours. Mean and SEM of MFI of Foxo3 (n=4 mice per genotype). (C) Intracellular staining of Foxo3 expression by naive CD62L⁺ CD25⁻ CD4⁺ T cells stimulated with 2µg/ml of anti-CD3 mAbs in the presence of a series of inhibitors to block p38 (1µM, Calbiochem, ref. 506121), JNK (1µM, Calbiochem, ref. 420119), total PKCs (1µg/ml, Sigma, ref. R136-1MG) or ERK (1µM, Calbiochem, ref. 420119) pathways. (D) Intracellular staining of Foxo3 expression by naive CD62L⁺ CD25⁻ CD4 T cells stimulated with PMA alone (1, 10 or 100 ng/ml), ionomycin alone (1, 10 or 100 ng/ml) or anti-CD3 mAbs (2µg/ml). (E) Intracellular staining of Foxo3 expression by naive CD62L⁺ CD25⁻ CD4 T cells stimulated with 2µg/ml of anti-CD3 mAbs in the presence of specific inhibitors of PKC total (Sigma ref. R136-1MG), NFAT (1µg/ml, Calbiochem, ref. 480401-1MG) or NF-κB (1µg/ml, IKK inhibitor, Sigma, Bay 11-7082). Mean and SEM of the relative MFI of Foxo3 expression was calculated by subtracting the WT MFI from the *Foxo3*^{-/-} MFI. (n=4-5 mice per genotype). See Also Figure 1

Figure S2 related to Figure 2: (A) Proliferation (CellTrace Violet dilution) and survival (Viability Dye) of WT (black histogram/bars, n=4) or *Foxo3*^{-/-} (open histograms/bars, n=4) naive CD4⁺ T cells stimulated with the indicative amount of anti-CD3 mAbs under non-polarizing condition for 72 hours. (B) The secretion of IL-2, IL-4, IL-13 or TNF was assessed by ELISA. (C) Mean and SEM of the frequency of IFN-γ and (D) GM-CSF producing CD4⁺ T cell from WT (black bars, n=4) or *Foxo3*^{-/-} (open bars, n=4) mice stimulated with 2 µg/mL of anti-CD3 mAbs and 1 µg/ml anti-CD28 under non-polarizing condition for 72 hours. (E) Proliferation and survival of WT (black histogram/bars, n=4) or *Foxo3*^{-/-} (open histograms/bars, n=4) naive CD4⁺ T cells stimulated with the indicative amount of anti-CD3 mAbs under Th1 polarizing condition for 72 hours. See also Figure 2

Figure S3 related to Figure 2: (A) Naive CD62L⁺ CD25⁻ CD4⁺ T cells purified from WT (black bars) or *Foxo3*^{-/-} (open bars) were stimulated with plate-bound anti-CD3 mAbs (10µg/ml) and anti-CD28 mAbs (1µg/ml) for 6 days in neutral (Th0) or Th1, Th2, Th17 or Treg cell polarizing conditions. (B) Naive CD62L⁺ CD25⁻ CD4⁺ T cells purified from WT (black bars) or *Foxo3*^{-/-} (open bars) were stimulated with plate-bound anti-CD3 mAbs (2µg/ml) and increased concentration of TGF-β for 72 hours. Percentage of Foxp3⁺ cells was assessed by Flow cytometry. (C) Naive CD62L⁺ CD25⁻ CD4⁺ T cells purified from WT (black symbols) or *Foxo3*^{-/-} (open symbols) were stimulated with the indicated amount of anti-CD3 mAbs for 18 hours. After this, the cells were either further stimulated with anti-CD3 mAbs and anti-CD28 mAbs for 54 h (72h) or maintained without TCR stimulation for 54 h (18h). The induction of Foxp3 was then examined by intracellular staining in lived cells. (D) CD4⁺ CD62L^{high} CD25^{high} Treg cells were purified from WT (black symbols) or *Foxo3*^{-/-} (open symbols) splenocytes and cultivated in presence of CTV-labeled WT CD4⁺ T effector cells

stimulated with APC and anti-CD3 mAbs. Treg suppressive function was assessed and presented as percentage of inhibition. See also Figure 2

Figure S4 related to Figure 3: Gene expression microarray experiments comparing WT (n=4) versus *Foxo3*^{-/-} (n=4) CD62L^{high} CD25⁻ CD4⁺ T cells unstimulated (A) or after 24h of stimulation with 2 µg/mL of anti-CD3 mAbs (B). Data are expressed as Log2 (Fold Change *Foxo3*^{-/-}-WT) of the top most significantly regulated genes (FDR ≤ 0.05 and fold change >2 or <2). (C) Gene expression fold changes expressed as Log2(FC *Foxo3*^{-/-}-WT) of the top most significantly regulated (FDR ≤ 0.05 and fold change > 1.5) genes within the “Metabolism” and (D) “Immune cell trafficking” pathways shown as a Heatmap of over-(red) or under-(green) expressed genes in naive *Foxo3*^{-/-} CD4⁺ T cells stimulated for 0, 12 or 24 hours with anti-CD3 mAbs. (E) Intracellular staining of Eomes expression by WT naive CD4⁺ T (open bars) or CD8⁺ T cells (light gray bars) either unstimulated or stimulated with 2 µg/mL anti-CD3 mAbs for 72 hours. (F) Intracellular staining of Eomes expression by WT CD4⁺ T cells stimulated under Th0, Th17 or Treg cell polarizing conditions for 6 days. See also Figure 3

Figure S5 related to Figure 4 and 5: (A) Top panel: Schematic structure of the CSF2 gene, the arrow represents the transcriptional start site, the black boxes represent exon position (E1 to E4), grey dots represent CNS position (CNS1 to 6, numbers represent CNS positions). Bottom panel: HEK293 T cells were co-transfected with reporter plasmids containing either the human promoter region of CSF2 (2kbs) cloned into the pGL3-Basic vector (pCSF2_luc) or the promoter of CSF2 with addition of the CNS listed below (pCSF2_CNS 1 to 6). All constructs were co-transfected with plasmids coding for EOMES (EOMES, dark grey bars) or an empty vector (Mock, black bars). (B) HEK293 T cells were co-transfected with reporter plasmids containing the first 3.6kbs of the human IFNG promoter cloned into the pGL3-Basic vector (pIFNG_luc) or (C) the human IFNG promoter with the previously described Foxo binding site (pIFNG_FBS_luc). Both constructs were co-transfected with plasmids coding for EOMES (EOMES, dark grey bars), the constitutively active FOXO3a mutant (FOXO3TM, white bars), or an empty vector (Mock, black bars). All luciferase activities were normalized to the expression of the co-transfected Renilla luciferase. (D) Frequency of T-bet, IFN-γ⁺ or GM-CSF⁺ producing cells in naive WT or *Foxo3*^{-/-}CD4⁺ T cells stimulated with anti-CD3 mAbs for 18, 36 or 72 hours in absence or presence of neutralizing anti- IFN-γ mAbs. See also Figure 4 and 5

Figure S6 related to Figure 6: (A) Male *Foxo3*^{-/-} (open circles) and WT littermate mice (black circles) were immunized with 50µg of peptide MOG₃₅₋₅₅ emulsified in CFA at day 0 and 200 ng of pertussis toxin was given on day 0 and day 2. Clinical scores were assessed on a daily basis over a 30-day period. Mean with SEM of maximal and cumulative clinical scores for WT (black bars) and *Foxo3*^{-/-} (open bars) were calculated. (B) Naive C57BL/6 mice were immunized with 50µg of peptide MOG₃₅₋₅₅ emulsified in CFA. Ten days after immunization, cells from draining LN and spleen were cultured in the presence of 20µg/mL of MOG₃₅₋₅₅, in presence of IL-23 and anti-IFN-γ. After three days, CD4⁺ T cells were purified and 5x10⁶ CD4⁺ T cells were injected into WT (black circles,) or *Foxo3*^{-/-} mice (open circles). Clinical scores were assessed on a daily basis over a 30-d period. Mean with SEM of the maximal and

cumulative clinical scores were calculated (n=6 mice per genotype). Data are from a pool of 3 independent experiments with a total of 9 mice per genotype (A) and are representative of at least two independent experiments (B). See also Figure 6

Figure S7 related to Figure 7: (A) Total *Foxo3*^{-/-} (open circles, n=8) and WT littermate mice (black circles, n=8) were immunized with MOG₃₅₋₅₅ peptide emulsified in CFA. At day 9 post-immunization, CD4⁺ T cells were purified from spleen and restimulated *in vitro* with WT APC and increasing concentrations of MOG₃₅₋₅₅ peptide, the secretion of cytokines was analyzed in the supernatant after 3 days of culture by Flowcytomix. (B) Spinal cords-infiltrating cells were isolated from WT (black bars) and *Foxo3*^{-/-} (open bars) mice on day 12 after immunization and analyzed by flow cytometry (n=8 mice per genotype) or (C) re-stimulated *in vitro* with increasing concentrations of MOG₃₅₋₅₅ peptide. The production of IFN- γ , GM-CSF and IL-17 in the supernatant was analyzed by ELISA (pool of 4 mice per genotype). (D) Brain-infiltrating cells were isolated from WT (black bars) and *Foxo3*^{-/-} (open bars) mice on day 12 after immunization and analyzed by flow cytometry (n=8 mice per genotype) or (E) re-stimulated *in vitro* with increasing concentrations of MOG₃₅₋₅₅ peptide. The frequency of IFN- γ ⁺, GM-CSF⁺ and IL-17⁺ producing cells was analyzed by ICS (n=6-8 mice per genotype). (F) Frequency of Foxp3⁺ CD4⁺ T cells infiltrating the spinal cords and brain from total *Foxo3*^{-/-} mice (open bars) or WT littermates (black bars) on day 12 after immunization. (G) Frequency of Foxp3⁺ CD4⁺ T cells infiltrating the spinal cords and brain from *Foxo3*^{fl/fl}-Cd4-cre⁺ mice (open bars) or *Foxo3*^{fl/fl}-Cd4-cre⁻ littermates (black bars) on day 12 after immunization. See also Figure 7

SUPPLEMENTAL EXPERIMENTAL PROCEDURES

Mice

C57BL/6 mice deficient for Foxo3 (*Foxo3*^{-/-}) were generated using embryonic stem cell clones (Omnibank ES cell library) by gene trap insertion in exon 1 of *Foxo3a* gene (Lexicon Genetic group). These mice were provided by Steve Hedrick in 2010 (UCSD, California, USA) and maintained in the breeding facility of PreCREFRE (Toulouse UMS06; Anexplo platform) under SPF conditions. 2D2 mice, which express transgenic TCR specific for MOG₃₅₋₅₅, were obtained from Vijay Kuchroo (Boston, USA). *Foxo3*^{-/-} mice were crossed with either 2D2 mice or *Rag2*^{-/-} mice in the animal facility UMS06 (Toulouse, France) to generate 2D2-*Foxo3*^{-/-} mice and *Rag2*^{-/-}-*Foxo3*^{-/-} mice. The derivation of mice carrying floxed *Foxo3* alleles has been described elsewhere (Paik et al., 2007). Mice carrying floxed *Foxo3* alleles were bred with *Cd4-cre* mice to generate T-cell-specific Foxo3-deficient (*Foxo3*^{fl/fl}-*Cd4-cre*) mice. All animal procedures were conducted in accordance with institutional guidelines on Animal Experimentation and were under a French Ministry of Agriculture license.

Active and passive encephalomyelitis autoimmune experimental (EAE)

For 2D2-WT and 2D2-*Foxo3*^{-/-} mice, EAE was induced by a single injection of 150 ng/mL of pertussis toxin as described in (Bettelli et al., 2003). For passive EAE, naive C57BL/6 mice were immunized with MOG₃₅₋₅₅ emulsified in CFA. At day 10 after immunization, cells from spleen and lymph nodes were cultured with 20 µg/mL of MOG₃₅₋₅₅ peptide, 5 ng/mL of IL-23 (R&D) and 10 µg/mL of anti-IFN-γ for 3 days. CD4⁺ T cells were then purified and 5.10⁶ of CD4⁺ T cells were injected intravenously into WT and *Foxo3*^{-/-} mice. For RAG-deficient mice, 2x10⁴ WT MOG₃₅₋₅₅ specific 2D2 CD4⁺ T cells plus 4x10⁶ total WT CD4⁺ T cells were transferred into *Rag2*^{-/-}-*Foxo3*^{+/+} and *Rag2*^{-/-}-*Foxo3*^{-/-} mice. The next day, mice were immunized with 50µg MOG₃₅₋₅₅ emulsified in CFA and injected i.v. with 100ng of pertussis toxin. Clinical score were evaluated on a five-stage scale from 0 to 5.

Fractionation assay

Naive CD4⁺ T cells were stimulated with anti-CD3 mAbs during 36 h and the subcellular fractionation was performed with NE-PER nuclear and cytoplasmic extraction reagents (Thermo Scientific). After nuclear and cytoplasm separation, the protein concentrations were determined with a Bradford protein

assay kit and equal amount of total proteins were analysis by Western Blot using anti-Foxo3 (Cell signaling), anti-PLC- γ 1 (1249-Santa Cruz) and anti-TFIID (58C9-Santa Cruz).

Immunofluorescence staining

Naive CD4⁺ T cells from WT and *Foxo3*^{-/-} mice were stimulated with anti-CD3 antibody during 48 h. Cells were washed and incubated 20 minutes with "Foxp3 staining buffer" for fixation and permeabilization. After incubation Fc-Block (2.4G2), cells were incubated 2 h at room temperature with primary antibody Foxo3 (Cell signaling) and 1h at room temperature in secondary antibody. Then, cells were disposed on chamber slides (Lab-Teck II-Nunc) and slides were mounted with mounting media (Vectashield containing DAPI) and examined on laser scanning confocal microscope 710 (Zeiss).

Microarray gene expression study

For each samples, Cyanine-3 (Cy3) labeled cRNA was prepared from 200 ng of total RNA using the One-Color Quick Amp Labeling kit (Agilent) according to the manufacturer's instructions, followed by Agencourt RNAClean XP (Agencourt Bioscience Corporation, Beverly, Massachusetts). 600 ng of Cy3-labelled cRNA were hybridized on the microarray slides following the manufacturer's instructions. Immediately after washing, the slides were scanned on Agilent G2505C Microarray Scanner using Agilent Scan Control A.8.5.1 software and fluorescence signal extracted using Agilent Feature Extraction software v10.10.1.1 with default parameters. Microarray data were analyzed using R (www.r-project.org, R v. 3.0.1), using Bioconductor packages (www.bioconductor.org, v 2.12, (Gentleman, Carey et al. 2004)) as described in GEO entry GSE86287. Raw data (median of pixels intensity) were log2 transformed and normalized using quantile method (Bolstad, Irizarry et al. 2003). Quality controls on raw data lead us to exclude 2 samples from the data matrix (1 *Foxo3*^{-/-} at T0 and 1 *Foxo3*^{-/-} at T24, getting 22 samples out of 24. A model was fitted using the limma lmFit function (Smyth, 2004). A correction for multiple testing was then applied using the Storey procedure (*q* value) for the False Discovery Rate (FDR) control (Storey and Tibshirani, 2003). Probes with FDR $\leq$ 0.05 were considered to be differentially expressed between conditions.

Plasmid constructs

Eomes luciferase reporter containing the 1000bp upstream EOMES transcriptional start site was kindly provided by Pr. Bin Li (Li et al., 2013b). The pEomes_p3'E_luc was obtained by insertion of the sequence containing the two putatives FBS 5'-AGCTTCTACTGTGGCTATTTGTTCTGGAGATAAATTTATTTCTAGTTCCTCCGAGCCGCGGGCCAAACAAATGTAAGAGGCGGC-3' into the Eomes_Luc plasmid by using *Bam*HI and *Xho*I restriction sites. FOXO3TM and FOXO3TM-A32A253Nter were gifts from C. Charvet (Charvet et al., 2003). Briefly, the cDNA encoding HA-tagged-FOXO3TM was subcloned from pECE constructs (Brunet et al., 1999) into pCDNA3 using HindIII and XbaI digestion. Nt fragment were amplified from pCDNA3 HA-FOXO3-TM by PCR using the following primers: 5FOXO3a-Nt: 5'-ACCATGGCAGAGGCACCG-3' and 3'FOXO3a-Nt: 5'-CAGCTCATCACTGCTGCGTGACGTGGG-3'. The amplified fragments were directly ligated into the V5-tagged pCDNA3.1 vector (Invitrogen, Groningen, Netherlands). FOXO3TM-H212R plasmid was obtained by mutation of FOXO3TM on his DNA-Binding Domain (H212R) using QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit according to manufacturer's recommendations (Agilent technologies). Primers used from the mutagenesis are forward: 5'-AAGAACTCCATCCGGCGCAACCTGTCACTGCAT-3' and reverse: 5'-ATGCAGTGACAGGTTGCGCCGGATGGAGTTCTT-3'

Lentiviral vector production

To produce the lentiviral particles, 10 T150 flasks plated with 1.8×10^7 HEK-293T cells each were co-transfected with the two packaging plasmids, psPAX2 and pMD2.G (Addgene, France), and either the pWPXLd-IRES-GFP (control vector) or the pWPXLd-Eomes-IRES-GFP vector. Plasmids were then mixed with 100 μ l of GeneJuice (Merck, France). Culture medium was removed the next day and replaced by warm OptiMEM medium (Gibco, France). Supernatants containing either the control lentiviral particles (LV-GFP) or the eomes lentiviral particles (LV-Eomes) were collected 48h and 72h post-transfection, pulled together, cleared by low-speed centrifugation and filtered using a 0.45 μ m filter. Lentiviral particles (LV-GFP or LV-Eomes) were then purified by ultracentrifugation through a 20% sucrose cushion (25,000 rpm, 2 h, 4°C; SW32Ti rotor, Beckman Coulter). Pellets were resuspended in ice-cold PBS under gentle agitation overnight at 4°C, aliquoted and stored at -80°C.

ELISA

Antibodies used for ELISA were 11B11 (anti-IL-4), AN18 (anti-IFN- γ), purified anti-mouse IL-17A, purified anti-mouse GM-CSF, Biotin anti-mouse IFN- γ (XMG1.2), Biotin anti-mouse IL-17A, Biotin anti-mouse GM-CSF. All antibodies were purchased from BD Biosciences except the BVD6-24G2 (anti-mouse IL-4 Biotin) which is from e-Biosciences. Enzyme immunoassays were used to measure cytokines in culture supernatants. Briefly, 96 well plates were coated for 2h at 37°C with anti-IFN- γ , anti-IL-17 or anti-GM-CSF in carbonate buffer 0.05 M pH 9.6. Culture supernatants or standards were incubated 2h at 37°C. The plates were then incubated 1h30 with a secondary biotinylated antibody specific for each cytokine, followed by 20 min of incubation with streptavidin-phosphatase alkaline at 37°C. Finally, plates were revealed by phosphatase alkaline substrate and absorbance was measured at 450/540 nm.

CD4⁺ T cell differentiation:

For Th1 cell polarization, naïve CD4⁺ T cells were stimulated with plate bound anti-CD3 mAbs (2 μ g/ml) in presence of IL-12 (10ng/ml) and IL-2 (1ng/ml). For Th2 cells, naïve CD4⁺ T cells were cultured in presence of anti-IFN- γ (10 μ g/ml), IL-4 (50ng/ml) and CD28 (2 μ g/ml). For Th17 cells, naïve CD4⁺ T cells were cultured in presence of anti-IFN- γ (10 μ g/ml), anti-IL-4 (10 μ g/ml), IL-6 (20ng/ml) TGF- β (3ng/ml) and anti-CD28 (2 μ g/ml). For iTreg cell differentiation, cells were stimulated in presence of TGF- β (5ng/ml), IL-2 (1ng/ml) and anti-CD28 (2 μ g/ml). After 6 days of stimulation cells were then activated with PMA plus ionomycin (0.5 μ g/ml each) plus Golgiplug (1/1000) for 4h and stained for IFN- γ , GMCSF, IL-13, Eomes, IL-17 and Foxp3.

Luciferase reporter assay construct

Human CSF2 promoter region was amplified by PCR using the high fidelity Phusion DNA polymerase (Thermo Fisher F530S) with the primers listed in table S1 and inserted into the pGL3_Basic vector (Promega) using NheI and KpnI restriction sites to create the pCSF2_Luc reporter plasmid. All CNS (1 to 6) were also amplified by PCR using primers listed in table S1 and each CNS was subcloned into the pCSF2 reporter plasmid using BamHI and SalI restriction sites to create pCSF2_CNS plasmids. pIFNG_luc promoter was obtained from addgene (Plasmid #17598). The 74bp containing Foxo-Binding Site was subcloned into the pIFNG_Luc reporter plasmid using XhoI and HindIII restriction

sites to create pIFNG_FBS_Luc plasmid. All luciferase experiments were performed as for the promoter of EOMES

Analysis of spinal cords and brains infiltration:

Mice were anesthetized with Ketamine and perfused with cold PBS. Brain and spinal cord were collected separately and were homogenized and digested with collagenase D (2.5 mg/ml, Roche Diagnostics), Dnase I (10 µg/ml) and TLCK (1 µg/ml, Roche, Basel, Switzerland) for 30min at 37 °C. Cells were then washed, suspended in 37% Percoll, and layered on 70% Percoll. After a 20-minute centrifugation at 2000 rpm, the mononuclear cells were collected from the interface, washed and resuspended in culture medium. Isolated cells were counted using a hematology analyzer and then stained in order to analyze the presence of different cell populations by flow cytometry. 3×10^5 CNS infiltrated cells were stimulated overnight with different concentrations of MOG₃₅₋₅₅ (0, 10 and 100 µg) to analyze the cytokine expression by CD4⁺ T cells using intracellular staining and ELISA. Similarly draining lymph nodes cells and splenocytes were stimulated with different concentrations of MOG₃₅₋₅₅ (0, 10 and 100 µg) for 48 and 72 hours to investigate the cytokine expression using intracytoplasmic staining and ELISA.

Article 2 : L'expression d'EOMES permet d'augmenter les fonctions des lymphocytes T CD4 chez l'Homme et leur confère une longue durée de vie.

EOMES expression is associated with enhanced functions and long-term survival in Human CD4 T cells

Michaël F. Michieletto,^{1,2,3} Virginie Girault,^{1,2,3} Emeline Joulia,^{1,2,3} Arantxa Agesta,^{1,2,3} and Anne S. Dejean^{1,2,3,8,*}

¹UMR Inserm, U1043, Toulouse 31300, France

²UMR CNRS, U5282, Toulouse 31300, France

³Université de Toulouse, UPS, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan (CPTP), Toulouse 31300, France

⁸Lead Contact

Résumé :

EOMES est un facteur de transcription essentiel pour l'acquisition des fonctions effectrices et le développement des LT CD8 et des NK. Son expression permet la production d'IFN- γ , de Perforine et de Granzyme par ces cellules mais est également responsable dans les LT CD8, de la différenciation en cellules mémoires qui sont caractérisées par une longue durée de vie. Dans des modèles d'infections ou d'inflammation chronique, l'expression d'Eomes est également associée à une entrée en exhaustion des LT CD8, ces derniers n'étant plus capables de produire de l'IFN- γ ou du TNF- α mais restent capables de sécréter des molécules cytotoxiques suite à leur réactivation. Récemment, il a été montré que les LT CD4 pouvaient, dans certains cas, exprimer Eomes mais son rôle au sein du compartiment T CD4, en particulier chez l'Homme, reste encore méconnu.

Dans cette étude, nous avons analysé l'expression d'EOMES dans les lymphocytes T CD4 à l'état basal et suite à leur activation *in vitro* chez des donneurs sains issus de l'établissement français du sang. Nos résultats montrent que l'expression d'EOMES est restreinte aux sous-populations Effectrices et Effectrices Mémoires, EOMES n'étant pas exprimé dans les LT CD4 naïfs et très peu dans les centraux mémoires. Nous avons également pu mettre en évidence qu'EOMES est exprimé préférentiellement par des LT CD4 de type 1 : les Th1 et les Th1*, alors qu'il est peu exprimé dans les Th17 ou Th2. *Ex vivo*, les cellules T CD4 EOMES⁺ expriment des marqueurs d'activation mais également certains marqueurs d'exhaustion. Cependant, ces cellules restent fonctionnelles car elles sont capables de produire une grande quantité de cytokines pro-inflammatoires suite à une re-stimulation en comparaison à des cellules qui n'expriment pas EOMES. Par la suite, des expériences de culture *in vitro* nous ont permis de mettre en évidence que l'engagement du TCR/CD28 induit l'expression d'EOMES dans les LT CD4 et que ces cellules s'accumulent au cours du temps et présentent des capacités accrues à survivre. Ces cellules, bien que stimulées pendant de longues périodes, restent fonctionnelles et sont les cellules les plus pro-inflammatoires. En effet, ces LT CD4 EOMES⁺ produisent de grandes quantités d'IFN- γ , de TNF- α et de GM-CSF par rapport aux LT CD4 EOMES⁻.

Notre étude met donc en évidence que les LT CD4 EOMES⁺ chez l'Homme pourraient correspondre à une sous-population particulière de lymphocytes T CD4 dotée d'un fort potentiel inflammatoire à longue durée de vie capable d'induire des réponses de type 1.

Title: EOMES expression human by CD4⁺ T cells confers enhanced effector functions and long-term survival

Authors: Michaël F. Michieletto^{1,2,3}, Virginie Girault^{1,2,3}, Emeline Joulia^{1,2,3}, Arantxa Agesta^{1,2,3} and Anne S. Dejean^{1,2,3}

Running Title: Characterization of human Eomes⁺ CD4 T cells

¹UMR Inserm, U1043, Toulouse, F-31300, France

²UMR CNRS, U5282, Toulouse, F-31300, France

³Université de Toulouse, UPS, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan (CPTP), Toulouse, F-31300, France

Correspondence: Dr Anne Dejean, UMR1043, CHU Purpan, BP 3028, 31024 Toulouse Cedex 3, France. Phone: 33-5-62744536, Fax: 33-5-62744558, E-mail: anne.dejean@inserm.fr

ABSTRACT

EOMES-expressing CD4 T cells have been associated with the acquisition of deleterious function by T helper cell in several pathological conditions such as cancers, chronic infections or autoimmune diseases. In this study, we investigated the role of EOMES in CD4 T cells by analyzing the phenotype, regulation and function of these cells at steady state in PBMC from healthy donors and upon *in vitro* activation. We show that EOMES is mainly expressed by effector and effector memory CD4 T cells and its expression correlates with increased CXCR3 expression. Moreover, circulating EOMES⁺ CD4 T cells express markers of exhausted CD4 T cells although they secrete high proportion of IFN γ upon *ex vivo* stimulation. *In vitro*, naive CD4 T cells differentiate into EOMES-expressing cells upon prolonged anti-CD3 and anti-CD28 mAbs stimulation. These cells accumulate over time due to an increased capacity to survive and secrete high level of IFN γ and GM-CSF with decreased IL-17. Altogether, our results demonstrate that EOMES drives the differentiation of long-lived effector CD4 T cells harboring a type 1 phenotype.

INTRODUCTION

CD4 T cells exhibit high functional diversity and can differentiate into highly specialized T helper (Th) subsets with dedicated functions. CD4 T cell lineage choice is governed by extracellular signals, coupled to intracellular signaling cascades, which in turn drive specific transcriptional programs. Hence, transcriptional regulation plays a determining role in conferring T helper identity, function and in some cases pathogenicity. The prevailing dogma stated that the expression of a single “master regulator” strictly establishes an absolute CD4⁺ T cell phenotype. In this regard, T-bet was identified as the transcription factor that is necessary and sufficient to induce the Th1 gene-expression program (Szabo, Kim et al. 2000). Likewise, GATA3, ROR γ t, Bcl-6, and Foxp3 are required for the differentiation of Th2, Th17, Tfh, and Treg cells, respectively (Jenner, Townsend et al. 2009). However, recent studies challenge this dogma demonstrating that these “master regulators” cannot act alone and that additional transcription factor (TF) are required (Ihle 1996). It has been shown that the TF Eomes within T cells plays significant roles during acquisition of effector function in both CD4 and CD8 T cells (Pearce, Mullen et al. 2003, Intlekofer, Takemoto et al. 2005, Intlekofer, Banerjee et al. 2008, Stienne, Michieletto et al. 2016).

Eomes belongs to the T-box family of TF and shares highly homologous sequences with T-bet, especially within its T-box DNA binding domain, thus suggesting overlapping transcriptional activity. Indeed, mouse studies first described that Eomes expression is essential for IFN- γ secretion by CD8 and for the acquisition of cytotoxic functions by CD8 T cells as well as ILC and $\gamma\delta$ T cells (Pearce, Mullen et al. 2003, Suto, Wurster et al. 2006, Takemoto, Intlekofer et al. 2006, Chen, He et al. 2007, Cruz-Guilloty, Pipkin et al. 2009, Eshima, Chiba et al. 2012, Daussy, Faure et al. 2014). In CD8 T cells, Eomes cooperates with T-bet to repress the Tc17 lineage by preventing IL-17, IL-23R, ROR γ T expression and Th17 cytokine production (Intlekofer, Banerjee et al. 2008). In addition, by controlling the expression of *Cd122* gene coding for the beta chain of the IL-2/IL-15 receptor, Eomes favors the differentiation of CD8 T cells toward memory cells (Intlekofer, Takemoto et al. 2005). Eomes regulation of *Cd122* gene was also described in NK cells in which Eomes is important for the development of bone marrow derived NK (Townsend, Weinmann et al. 2004, Daussy, Faure et al. 2014). Also, in CD8 T cells, Eomes - but not T-bet - is expressed by chronically activated cells or “exhausted CD8 T cells”, which are characterized by the expression of inhibitory molecules such as PD-1, LAG3, 2B4, CD160 or TIM3 (Buggert, Tauriainen et al. 2014, Hoffmann, Pantazis et al. 2016, Sen, Kaminski et al. 2016). These cells secrete low amounts

of IFN- γ and TNF- α but produce large quantities of cytotoxic molecules and proliferate very rapidly after re-stimulation (Hoffmann, Pantazis et al. 2016).

Nevertheless, in contrast to CD8 T cells, the role of Eomes in CD4 T cells remains poorly understood. Indeed, depending on the Th subsets studied and the experimental models used, Eomes might play various functions. It has been shown in mice that Eomes overexpression in T-bet deficient CD4 T cells compensates impaired IFN- γ production (Yang, Xu et al. 2008, Eshima, Chiba et al. 2012). Moreover, Eomes overexpression in CD4 T cells promotes IFN- γ production and cytotoxicity (Qui, Hagymasi et al. 2011, Eshima, Chiba et al. 2012, Kitano, Tsuji et al. 2013). Eomes is also necessary for the inhibition of Th17 cell differentiation (Ichiyama, Sekiya et al. 2011, Kara, McKenzie et al. 2015). In Th2 cells Eomes is able to inhibit GATA3-mediated IL-5 production by a subset of memory Th2 cells (Endo, Iwamura et al. 2011). Notably, Eomes deficiency favored the *in vivo* accumulation of Foxp3⁺ regulatory CD4 T cells in mice and the production of IL-10 by Tr1 cells in a model of GvHD through direct control of the *Il10* gene (Lupar, Brack et al. 2015, Zhang, Lee et al. 2017). Our recent results showed that the Foxo3/Eomes axis is critical for the differentiation of encephalitogenic CD4 T cells responsible for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). Indeed, we revealed that Eomes and Foxo3 act in synergy to control IFN- γ and GM-CSF production by autoreactive CD4 T cells, thus demonstrating that Eomes has an important role in directing CD4 T cell differentiation and cytokine production (Stienne, Michieletto et al. 2016). Together, these data emphasize the implication of Eomes in inflammation but the precise role of this transcription factor in Human is still elusive.

However, EOMES has been associated with the acquisition of detrimental functions by T helper cells in different pathologies such as cancers, chronic infections or autoimmune diseases (Curran, Geiger et al. 2013, Raveney, Oki et al. 2015, Sahmatova, Sugis et al. 2017, Serroukh, Gu-Trantien et al. 2018). For example, the involvement of EOMES in neuro-inflammation was highlighted by consistent Genome Wide Association Studies (Patsopoulos, Bayer Pharma et al. 2011, International Multiple Sclerosis Genetics, Beecham et al. 2013). Moreover, an increased proportion of EOMES⁺ CD4 T cells was detected in the cerebrospinal Fluid (CSF) from patients suffering of a Secondary Progressive form of Multiple Sclerosis (MS) further supporting the role of this TF in inflammation (Raveney, Oki et al. 2015).

Together, these data emphasize the implication of EOMES in inflammatory diseases in human but the precise role of this transcription factor in human CD4 T cell functions is still elusive. To get insight into the role of EOMES in human CD4 T cell functions, we investigated in this study the phenotype, survival

and effector cytokines production of EOMES⁺ and EOMES⁻ CD4 T cells from healthy donors at steady state and *in vitro* stimulation.

RESULTS

EOMES is mainly expressed by effector and effector memory CD4 T cells which displayed an exhausted phenotype

First, we addressed whether EOMES⁺ CD4 T cells were also detectable in human PBMC and investigated their phenotype and function of these cells. While the proportion of EOMES⁺ cells is relatively low in CD4 T cells as compared to CD8 T cells (**Sup Figure 1A**), we showed that approximately 6% of CD4 T cells from PBMC of healthy donor expressed EOMES (**Figure 1A**). EOMES⁺ cells were preferentially detected within effector CD4 T cells (CCR7⁻CD45RA⁺) whereas naïve CD4 T cells (CCR7⁺CD45RA⁺) expressed no or low level of EOMES. In memory cells, the frequency of EOMES⁺ cells was decreased as compared to effector CD4 T cells, although CD3⁺CD4⁺ effector memory (TEM) cells (CCR7⁻CD45RA⁻) expressed higher level of EOMES as compared to CD3⁺CD4⁺ central memory (TCM) cells (CCR7⁺CD45RA⁻) (**Figure 1B**). The pattern of EOMES expression follow the same trend in CD8 T cells with a higher expression in effector cells as compared to naïve CD8 T cells and this expression slightly decreased in memory cells with TEM and TCM CD8 T cells exhibiting similar level of EOMES expression (**Sup Figure 1B**). We also showed that males and females exhibit similar level of EOMES⁺ CD4 and CD8 cells (**Sup Figure 1B**) and that the level of EOMES expression was not related to donor age (**Sup Figure 1C**). Since EOMES was identified as a susceptibility gene in MS, we assessed whether polymorphisms in *EOMES* (rs2371108 G/T and rs17034 C/T) could impact EOMES expression. We analyzed EOMES expression in PBMC of donors carrying the two protectives or susceptible alleles at the homozygous state (CC/GG versus TT/TT). We actually observed no impact of these SNP on EOMES protein expression by naïve or effector/memory CD4 or CD8 T cell subsets as well as any changes in the frequencies of EOMES⁺ CD4 T cells in each compartment (**Sup Figure 1D**). Thus, these SNP do not influence EOMES expression in T cells from healthy donors at least at basal state.

We next compared EOMES⁺ and EOMES⁻ CD4 T cells for the expression of several activation and exhaustion markers. EOMES⁺ CD4 T cells exhibited decreased expression of CCR7, CD45RA, CD27 and CD25 and increased expression of HLA-DR suggesting that these cells exhibited an activated phenotype (**Figure 1C**). The expression of co-stimulatory molecules such as CD28, CTLA-4 or 4-1BB

was similar in CD4 T cells regardless of EOMES expression (**Figure 1D**). By contrast, EOMES⁺ CD4 T cells harbored characteristics of exhausted T cells since they expressed higher levels of PD1 and TIM3 (**Figure 1E**). Altogether, our data show that EOMES⁺ CD4 T cells are present in PBMC from healthy subjects and these cells display characteristics of activated/exhausted CD4 T cells.

EOMES expression defines a subpopulation of Th1 cells that secretes high levels of pro-inflammatory cytokines.

We next addressed whether the expression of EOMES could be linked to T helper cell polarization by analyzing EOMES expression in memory T_H1 (CCR6⁻, CXCR3⁺, CCR4⁻), T_H2 (CCR6⁻, CXCR3⁻, CCR4⁺), T_H17 (CCR6⁺, CXCR3⁻, CCR4⁺), T_H1* (CCR6⁺, CXCR3⁺, CCR4⁻) (Becattini, Latorre et al. 2015). We showed that the frequency of EOMES is higher in T_H1 and T_H1* whereas it is not or barely expressed by T_H2 and T_H17 (**Figure 2A**). When the expression of chemokine receptors was assessed individually, we noticed that EOMES expression in CD4 T cells correlated with decreased CCR4 and increased CXCR3 expression whereas the expression of CCR6, CXCR5 and CCR10 was unchanged (**Figure 2B**). These results suggest that EOMES⁺ CD4 T cells detected in PBMC from healthy donors might be more prone to differentiate into type 1 CD4 T cells. We therefore assessed cytokines secretion by effector and effector memory CD4 T cells since these cells expressed higher levels of EOMES. PBMC were stimulated for 4 hours with low doses of PMA/ionomycin and cytokines secretion was assessed by intracellular staining on CD3⁺CD4⁺CCR7⁻ cells which include effector and effector memory CD4 T cells. EOMES⁺ CD4 T cells secreted higher level of IFN- γ and TNF- α as compared to EOMES⁻ CD4 T cells (**Figure 2C**). We also observed that EOMES expression correlated with a decreased IL-2 secretion by CD4 T cells upon PMA and Ionomycine stimulation (need to be confirmed) whereas the secretion of IL-13, IL-17 or GM-CSF were undetectable in this culture condition. Since Eomes expression has been associated with cytotoxicity, we also analyzed perforin and Granzyme B expression. A modest proportion of circulating CD4 T cells from healthy donors expressed these molecules although granzyme B-expressing cells were enriched in EOMES⁺ CD4 T cells while the same frequency of perforin⁺ CD4 T cell were found in EOMES⁺ and EOMES⁻ cells (**Figure 2D**).

Collectively, these data show that EOMES expression defines a subpopulation of Type 1 T_H cells which secrete high level of TNF- α and IFN- γ upon restimulation.

EOMES is induced upon TCR and CD28 triggering and defines a population of long-lived effector CD4 T Cells

Since EOMES expressing cells is higher in effector and effector memory CD4 T cells than in naïve CD4 T cells, we assessed whether CD4 T cell activation has an impact on EOMES expression. Naïve CD4 T cells were purified from PBMC of healthy donors and stimulated with plate-bound anti-CD3 mAb and soluble anti-CD28 mAb. Stimulation resulted in an upregulation of EOMES expression in CD4 T cells, with increased EOMES expression over time (**Figure 3A**). Indeed, after 5 days of stimulation, less than 5% of CD4 T cells expressed EOMES while almost 50% of CD4 T cells are EOMES⁺ at day 20 of stimulation. These results indicate that prolonged stimulation is required for Eomes expression by CD4 T cells suggesting that this TF might play a role in acquisition of terminal effector function.

The accumulation of EOMES⁺ CD4 T cells over-time after *in vitro* stimulation might be due to an increased proliferation rate of EOMES⁺ CD4 T cells or might be the consequence of an increased survival of these cells as compared to EOMES⁻ CD4 T cells. To assess this issue, proliferation and survival were measured over time by Cell Trace Violet dilution and viability dye staining. EOMES⁺ CD4 T cells were more enriched in divided cells (CTV^{low}) as compared to EOMES⁻ CD4 T cells (**Figure 3B**). These results suggest that CD4 T cells expressing EOMES exhibited increased proliferative capacities. Actually, we observed that cells that underwent more than 5 divisions exhibited increased expression of EOMES suggesting that CD4 T cells need to undergo several cycles of divisions to differentiate into EOMES⁺ cells (**Figure 3C**). Moreover, assessment of cell viability showed that EOMES⁺ CD4 T cells exhibited increased survival as compared to EOMES⁻ CD4 T cells. Indeed, very few EOMES⁺ CD4 T cells were positive for the cell viability dye (which is incorporated by dying cells) in contrast to what was observed for EOMES⁻ CD4 T cells in which, at 20 days post-stimulation, 70% of the cells were dead (**Figure 3D**). This increased survival is associated with an enhanced expression of the pro-survival protein BCL-2 in activated EOMES⁺ CD4 T cells as compared to EOMES⁻ CD4 T cells (**Figure 3E**). Herein we show that EOMES⁺ CD4 T cells accumulate over time and were less sensitive to cell death, thus suggesting that EOMES could drive long-term survival of T cells upon activation.

EOMES drives IFN- γ and GM-CSF secretion by CD4 T cells

We next assessed cytokine secretion according to the expression of EOMES in CD4 T cells stimulated *in vitro* for 10 days with coated anti-CD3 and soluble anti-CD28. The frequency of IFN- γ producing cells was highly enriched in the EOMES⁺ CD4 T cells population with an average of 50% of IFN- γ ⁺ EOMES⁺

CD4 T as compared to 25% in EOMES⁻ CD4 T cells (**Figure 4A**). The same phenotype was observed when analyzing GM-CSF secretion demonstrating that EOMES⁺ CD4 T cells are more prone to secrete pro-inflammatory cytokines than EOMES⁻ CD4 T cells. By contrast, the frequency of IL17⁺ cells was significantly lower in EOMES⁺ CD4 T cells as compared to EOMES⁻ CD4 T cells. No difference was observed for IL-13 secretion whereas IL-10 was not detected. We next assess whether EOMES⁺ CD4 T cell differentiated *in vitro* also exhibited cytotoxic properties. We observed a significantly increased expression of perforin and Granzyme B by CD4 T cells expressing EOMES (**Figure 4B**), suggesting that EOMES plays a role in cytotoxic CD4 T cell differentiation.

Therefore, our results demonstrate that EOMES expression is induced in CD4 T cells following sustained TCR/CD28 stimulation, and EOMES⁺ CD4 T cells expressed cytotoxic molecules and exhibited a specific pattern of cytokine secretion with an increased secretion of both IFN γ and GM-CSF associated with decreased secretion of IL-17.

DISCUSSION

The signaling events and environment cues leading to EOMES expression by CD4 T cells are not fully understood. Increased frequencies of EOMES⁺ CD4 T cells were found in several pathologic conditions such as secondary progressive form of Multiple Sclerosis (SPMS) (Raveney, Oki et al. 2015), psoriasis (Sahmatova, Sugis et al. 2017), chronic infections (Buggert, Tauriainen et al. 2014, Sen, Kaminski et al. 2016, Utzschneider, Delpoux et al. 2018) or in patients with malignancies including those treated with immune checkpoint therapies (Qui, Hagymasi et al. 2011, Wang, Yu et al. 2012, Curran, Geiger et al. 2013, Kitano, Tsuji et al. 2013). In non-pathologic conditions, we show here that EOMES is actually detectable in a small fraction of circulating CD4 T cells from healthy donors. EOMES is mainly expressed by effector and effector memory cells whereas its expression is barely detectable in naive cells (McLane, Banerjee et al. 2013, Knox, Cosma et al. 2014). These results are consistent with the pattern of Eomes expression in mice CD4 T cells in which Eomes was only detected in CD4 T cells that display characteristics of previous activation (CD62L⁻, CD44⁺). Moreover, in our previous study in mice, we demonstrated that Eomes expression in CD4 T cells is controlled by TCR signaling strength and duration (Stienne, Michieletto et al. 2016). In human CD4 T cells, EOMES expression is induced in naive CD4 T cells after a prolonged *in vitro* stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 mAbs and that EOMES⁺ CD4 T cell accumulate over time. These results suggest that persistent TCR engagement might be needed for EOMES CD4 T cells differentiation which could explain why an accumulation of EOMES⁺

CD4 T cell was detected in patients suffering from chronic infections or autoimmune diseases in which the antigen or auto-antigen is constantly present.

Analysis of chemokine receptor expression and cytokine secretion suggests that EOMES⁺ CD4 T cells might have specific functions. Indeed, the majority of EOMES⁺ CD4 T cells expressed the chemokine CXCR3. CXCR3 is rapidly induced on naïve CD4 T cells following activation and remains highly expressed preferentially on Th1-type CD4⁺ T cells (Lord, Rao et al. 2005). Moreover, it was demonstrated that CXCR3 and its ligand regulate the migration of Th1 cells into Th1-driven inflammation sites which could explain the accumulation of EOMES⁺ CD4 T cells in the CSF of patients with MS (Raveney, Oki et al. 2015) or in the lesional skin from patients with psoriasis. CXCR3 is actually the hallmark of both human and mouse Th1 cells as T-bet, the master regulator of Th1 differentiation, directly transactivates the CXCR3 gene. Since Eomes and T-bet have the same DNA binding domain, CXCR3 might also be a direct target gene of EOMES. Our recent data in mice also showed that Eomes deletion leads to decrease CXCR3 expression on CD4 T cells and affects T cell migration into the CNS during EAE development (data not shown). In agreement with CXCR3 expression, EOMES⁺ CD4 T cells exhibited many features of Th1 cells. Indeed, circulating EOMES⁺ CD4 T cells from PBMC of healthy donors secreted high level of IFN- γ after *ex vivo* re-stimulation. Moreover, high levels of IFN- γ secretion was also observed when analyzing *in vitro* differentiated EOMES⁺ CD4 T cells as compared to EOMES⁻ CD4 T cells. These results are in agreement with several studies showing that EOMES and T-BET might be redundant for the control of *IFN γ* , particularly in human CD4 T cells (Pearce, Mullen et al. 2003 , Serroukh, Gu-Trantien et al. 2018).

After *in vitro* stimulation, EOMES⁺ CD4 T cells also produced increased quantity of GM-CSF. This is in accordance with our previous study in mice which demonstrate that Eomes is required for the differentiation of CD4 T cells into IFN- γ and GM-CSF producing cells. Although the factors regulating *csf2* expression remain to be defined, we previously showed that GM-CSF-producing CD4 T cells exhibit high and sustained expression of Eomes while Eomes deficiency impaired the differentiation of GM-CSF producing CD4 T cells. These data suggest the implication of this TF in the gene program of GM-CSF secreting CD4 T cells. In line with our data, recent transcriptomic studies showed that Eomes is among the genes that are specifically expressed by the GM-CSF⁺ Th lineage.

EOMES expression in CD4 T cells is also inversely correlated with IL-17 secretion suggesting that EOMES expression in CD4 T cells might constrain Th17 differentiation (Intlekofer, Banerjee et al.

2008 , Yang, Xu et al. 2008, Zhu, Ju et al. 2010 , Ichiyama, Sekiya et al. 2011). This hypothesis was indeed established for primary mouse T cells in which overexpression of Eomes substantially suppressed Th17 cell differentiation, whereas knock-down of Eomes expression could substitute for TGF- β in Th17 cell induction. Indeed, as described for T-bet (Mukasa et al. 2010), Eomes binds to *Rorc* and *Il17a* promoters through the T-box domain; this interaction suppresses *Rorc* and *Il17a* promoter activity(Ichiyama, Sekiya et al. 2011). Nevertheless, *Eomes* expression can be induced in committed TGF β 1/IL-6-driven Th17 cells (Wang, Y. *et al*, *Immunity*, 2014) and Eomes has been shown to promote the differentiation of a specific sub-population of GM-CSF/IFN- γ -producing Th17 cells which express CCR6⁺CCR2⁺ that play pathogenic role in EAE and experimental persistent extracellular bacterial infection (Kara, McKenzie et al. 2015). This suggest that Eomes might be required for pathogenic Th17 differentiation found in inflammatory and autoimmune diseases.

Knowing the important role of Eomes in the acquisition of cytotoxic functions by other immune cells, the role of Eomes in cytotoxic CD4 T cells was evaluated. The expression of EOMES in human and in several mouse models is correlated with an increased proportion of CD4 cells expressing Perforin and Granzyme B both *in vivo* and *in vitro* (Zhu, Ju et al. 2010, Qui, Hagymasi et al. 2011, Eshima, Chiba et al. 2012, Kitano, Tsuji et al. 2013, Raveney, Oki et al. 2015, Takeuchi and Saito 2017). Here we show that Perforin and Granzyme B-expressing CD4 T cells were found in low frequency in PBMC from healthy donor and this so--called cytotoxic CD4 T cell population was enriched in EOMES⁺ CD4 T cells. In addition to Eomes, other TF were shown to be involved for the acquisition of cytotoxicity by CD4 T cells, such as T-bet and Runx3 which are required for the regulation of the *Prf1* and *Grzb* loci in both CD4 and CD8 T cells (Woolf, Xiao et al. 2003, Serroukh, Gu-Trantien et al. 2018). Moreover, it was shown that the role of EOMES in the acquisition of cytotoxic function by human CD4 T cells may be limited as its knockdown in Th1 cells did not affect perforin expression(Serroukh, Gu-Trantien et al. 2018).

In PBMC from healthy donor, EOMES⁺ CD4 T cells exhibited an activated phenotype with an increased expression of several exhaustion markers such as PD1, TIGIT or TIM3. In both mice and human CD8 T cells, Eomes expression was also associated with expression of these inhibitory receptors which are linked to a progressive loss of effector function and exhaustion mirrored by the decreased secretion of the pro-inflammatory cytokines IFN- γ and TNF- α (Doering, Crawford et al. 2012). However, EOMES⁺ CD4 T cells produce high levels of cytokines after *ex vivo* re-stimulation, suggesting that

EOMES might play different functions in CD8 and CD4 T cells. Moreover, when activated *in vitro* following anti-CD3/anti-CD28 mAbs, EOMES⁺ CD4 T cells exhibited high proliferation rate and their ability to secrete cytokine was preserved even after a prolonged stimulation suggesting that EOMES⁺ CD4 T are far from being exhausted. It is also worth noting that expression of inhibitory receptors is not restricted to exhausted cells and is commonly found on activated effector cells with a transient increased expression early after activation. Therefore, augmented inhibitory receptors expression by EOMES CD4 T cells might only reveal increased activation state of these cells.

One of the main characteristics of EOMES⁺ CD4 T cells is their increased capacity to survive after prolonged *in vitro* stimulation. Indeed, analysis of the viability by Propidium Iodide (PI) incorporation or viability dye staining shows that, while activated EOMES⁻ CD4 T gradually enter into apoptosis or convert into EOMES⁺ CD4 T cells, cells that express EOMES accumulate over time and were less sensitive to cell death. In CD8 T cells, EOMES expression is associated with the transition from effector to memory CD8 T cells. One of the characteristics of memory cells lies in their increased ability to survive in absence of stimulation, which allow to preserve a reservoir of specific T cells capable of responding more rapidly in case of reinfection (Doering, Crawford et al. 2012, Sen, Kaminski et al. 2016, Bengsch, Ohtani et al. 2018). Therefore, Eomes expression in memory cells might be important for long term survival. However, no study so far had addressed the role of Eomes in survival of Immune cells. Interestingly, it has been shown that in some cancers, including colon cancer in humans and rats, that cells overexpressing EOMES have an increased ability to survive and are protected against staurosporine-induced death (Wang, Kang et al. 2016). This increased survival of EOMES-expressing cancer cells is associated with an increased expression of the anti-apoptotic factor BIRC5 (or Survivin) and a decreased expression in BMF (Bcl-2 Modifying Factor) an anti-apoptotic factor. Here, we showed that EOMES expression correlates with increased expression of BCL-2, a pro-survival factor. Deeper investigation on the role of EOMES in the acquisition and increased survival potential of CD4 T cells will be required.

Together, our data show that EOMES expression is induced after prolonged TCR engagement and is associated with an increased pro-inflammatory capacities and proliferation rate, and also that EOMES might directly or indirectly participate to the increased long-term survival of CD4 T cells.

METHODS

Collect of PBMCs and storage and thawing

Cryopreservation of PBMCs from healthy volunteers was performed at Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1043 (Toulouse, France) within 24h of blood collection. Cells were stored in 20M vials in liquid nitrogen before use. For each experiment, frozen PBMCs were thawed during 1min at 37°C in a water bath and then diluted in warm complete RPMI medium. PBMCs were then centrifuged at 1500 RPM during 5 min then seeded at a concentration of 2×10^6 cells/mL in complete RPMI medium. Cells were thawed the day before each experiment in order to let them rest.

TaqMan genotyping

DNA from healthy donor were extracted using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) following manufacturer's instruction. DNA was then diluted at a concentration of 4 ng/ml in a final volume of 10 µL with 5 µL of TaqMan Genotyping Master Mix (ThermoFischer), 0,5 µL of 20X primers for the rs2371108 (C_16215086_10) or the rs170934 (C_5572_20) and volume was adjusted to 10 µl with RNaseFree water. TaqMan genotyping was performed in a LC480 from Roche.

Naïve CD4 T cells purification and stimulation

Thawed PBMCs were rested overnight before purification of naïve CD4 T cells. Purification was performed using the naïve CD4⁺ isolation kit II purchased from Miltenyi biotech using manufacturer recommendation. Briefly, PBMC were incubated with 0.25 µL of cocktail antibodies/µL of MACS Buffer per 2.5×10^6 cells during 5 mins at 4°C. Cells were then incubated with 20 µL of beads per 10^7 cells during 15 min. During this time LS column were washed 3 times with MACS buffer and after incubation cells were purified by negative selection. Cells were then labeled with Cell Trace Violet (Invitrogen).

Cell Trace Violet Staining

Naive CD4 T cells were resuspended in PBS at a concentration of 10^7 cells/ml in warmed PBS. Then CTV diluted in DMSO (4 µM) was added volume to volume and cells were incubated at 37°C during 10 min. After incubation cells were washed 1 time with 5 volumes of warmed SVF, centrifuged at 1500 RPM during 5 min and washed two time with complete RPMI.

***In vitro* stimulation of naïve CD4 T cells**

2×10^5 naïve CD4 T cells were stimulated with 2 µg/ml of coated anti-CD3 antibody (Biolegend) with 1 µg/ml of soluble anti-CD28 (Biolegend) in complete RPMI in non-polarizing condition. Medium was fully replaced every 5 days in order to keep cells with a constant amount of nutrients.

Analysis of activated CD4 T cells by Flow cytometry

Cytokines secretion and transcription factor expression were measured by intracellular staining in thawed PBMCs incubated 3 hours with phorbol-12-miristate-13-acetate (5 ng/mL) Ionomycin (5 ng/mL) and GolgiPlug (BD Bioscience, 1 µg/mL). For stimulated CD4 T cells, after stimulation cells were incubated with phorbol-12-miristate-13-acetate (50 ng/mL) Ionomycin (50 ng/mL) and GolgiPlug (BD Bioscience, 1 µg/mL) during 4 hours after stimulation. Intracellular staining was performed using the Foxp3 staining Buffer (Ebioscience). Antibodies were used are listed in Table S1. In all experiments, dying CD4 T cells were excluded using Fixable viability dye (Ebioscience). All samples were acquired and analyzed with the Fortessa flow cytometer (Becton Dickinson) and FlowJo software (TreeStar).

Phenotyping of PBMCs by Flow cytometry

After overnight resting, thawed PBMC were either stimulated during 3h with low dose of PMA/Ionomycine and GolgiPlug or directly stained with fixable viability dye (Ebioscience) diluted in PBS during 15 min at 4°C. After incubation cells were washed once with PBS and incubated with surface antibodies diluted in PBS+5% FBS during 30 min at 4°C. Cells were then washed in PBS+5% SVF and then incubated with intracellular antibodies diluted in the Foxp3 staining buffer. All samples were acquired and analyzed with the Fortessa flow cytometer (Becton Dickinson) and FlowJo software (TreeStar).

Statistical Analysis

p values were determined by Mann-Whitney test. p values < 0.05 were considered statistically significant (** = $P < 0.0001$, * = $P < 0.001$, * = $P < 0.05$). For comparison of EOMES⁺ and EOMES⁻ populations, Wilcoxon Matched-pairs test was used assuming a non Gaussian distribution of samples. All error bars represent the SEM. Experiments are representatives of at least 3 independent experiments.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported financially by grants from the ANR (Agence Nationale de la Recherche, project ANR-09-RPDOC-015-01) and FRM Fondation. M.M was the recipient of a doctoral fellowship from FRM Fondation (1 year).

FIGURES LEGENDS

Figure 1:

A. Representative dot plot of EOMES expression in CD4 T cells from PBMC of an healthy subject. Numbers adjacent to outlined areas indicate percent cells. **B.** Left, representative histogram of EOMES expression in naive ($CCR7^+CD45RA^+$, Blue), effector ($CCR7^-CD45RA^+$, Red), TCM ($CCR7^+CD45RA^-$, Orange) or TEM ($CCR7^-CD45RA^-$, Green) CD4 T cells and left, mean $\pm$ SEM of the frequency of EOMES⁺ CD4 T cells in each subset from 18 healthy donors. **C, D, E.** Analysis of expression of activation markers CCR7, CD45RA, HLA-DR, CD27, CD25 (**C**), costimulatory receptors CD28, CTLA-4 and 4-1BB (**D**) or inhibitory receptors PD-1, TIGIT and TIM3 (**E**) by EOMES⁺ (open circles) or EOMES⁻ (black circles) CD4 T from PBMCs of 8 to 15 Healthy controls. Data were analyzed using either One-Way ANOVA (**B**) or Wilcoxon-Matched Paired Test (**C, D**): ns=Not Significant, * p-value <0.05, **p-value <0.005, ***p-value <0.0005 and data are representative of at least 3 independent experiments.

Figure 2:

A. Left, representative histogram of EOMES expression in memory T_H1 ($CCR6^-,CXCR3^+,CCR4^+$), T_H2 ($CCR6^-,CXCR3^-,CCR4^+$), T_H17 ($CCR6^+,CXCR3^-,CCR4^+$), T_H1^* ($CCR6^+,CXCR3^+,CCR4^-$). Right, frequency of EOMES⁺ CD4 T Cells in Th1, Th2, Th17, TH1* from PBMC of 18 healthy subjects. **B.** Analysis of CXCR3, CCR4, CCR6, CCR10, CXCR5 and CCR7 by EOMES⁺ or EOMES⁻ CD4 T from PBMCs of 8 to 15 healthy controls. **C.** Representative dot plot and quantification of IFN- γ , TNF- α and IL-2 and production by EOMES⁺ (open circles) and EOMES⁻ (black circles) effector and effector memory CCR7⁻ CD4 T cells from PBMCs of 5 to 8 healthy subjects after PMA and ionomycin stimulation for 4 hours. **D.** Analysis of the frequency of Perforin and Granzyme B expression by EOMES⁺ (open circles) and EOMES⁻ (black circles) effector and effector memory CD4 T cells from PBMCs of 5 healthy subjects. Data were analyzed using either One-Way ANOVA (**A**) or Wilcoxon-Matched Paired Test (**B, C, D**): ns=Not Significant, * p-value <0.05, **p-value <0.005, ***p-value <0.0005 and data are representative of at 3 (**A, B**) or 2 (**C**) or 1 (**D**) independent experiments.

Figure 3:

A. Analysis of the frequency of EOMES expression by naïve CD4 T cells prior to and following stimulation with 2 μ g/ml of coated anti-CD3 and 1 μ g/ml of soluble CD28 for 5, 10, 15 or 20 days. **B.**

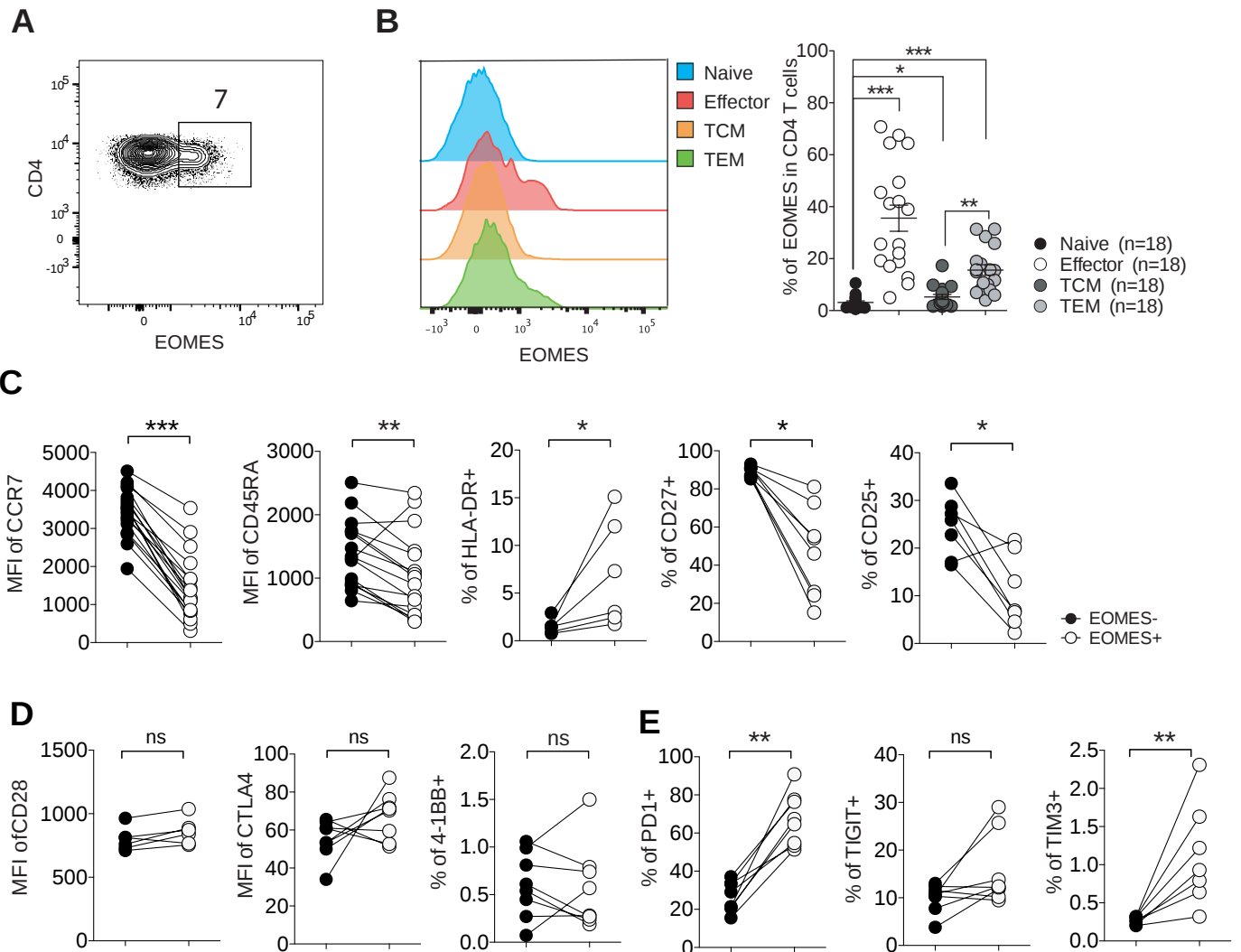
Quantification of proliferative CD4 T cells stimulated *in vitro* as in (A) during 5, 10, 15 or 20 days by CTV dilution in EOMES⁺ and EOMES⁻ CD4 T cells. **C** Representative dot plot of EOMES expression according to CTV dilution in naive CD4 T cells stimulated as in (A) for the indicated period of time. **D** Analysis of the frequency of viable cells in naive CD4 T cells stimulated as in (A) for the indicated period of time by viability dye incorporation. **E** BCL-2 expression by EOMES⁺ and EOMES⁻ CD4 T cells after 10 days of stimulation. Data were analyzed using Mann Whitney Test (**A**), (**B**) or Wilcoxon-Matched Paired Test (**E**): ns=Not Significant, * p-value <0.05, **p-value <0.005, ***p-value <0.0005 and data are representative of at least 3 independent experiments.

Figure 4:

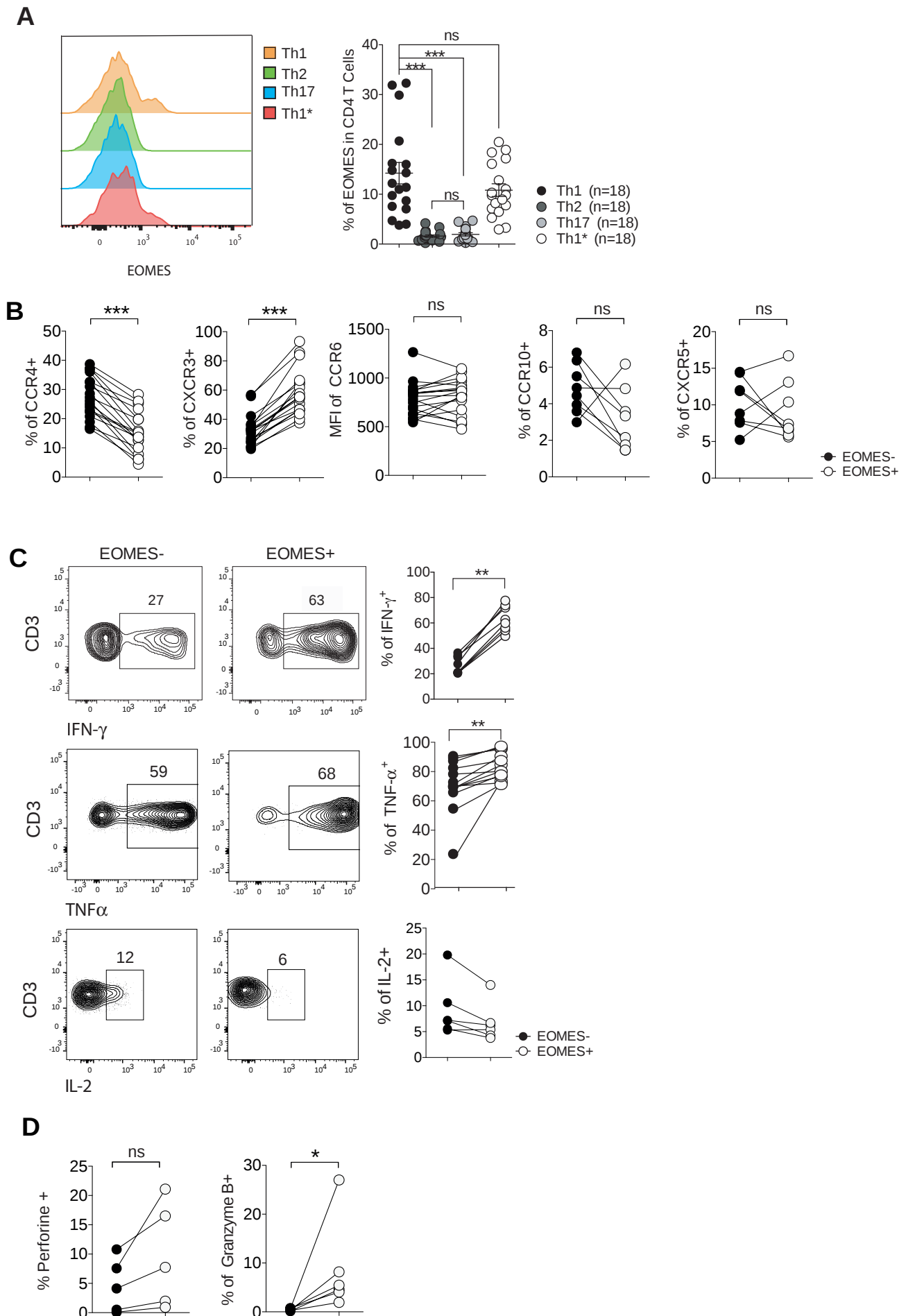
A. Cytokines production by EOMES⁺ versus EOMES⁻ CD4 T cells stimulated during 10 days with 2 µg/ml of coated anti-CD3 and 1 µg/ml of soluble CD28 and re-stimulation with PMA, Ionomycin and GolgiPlug during the last 4h (n=5-12 healthy donors). **B.** Analysis of the frequency of Perforin and Granzyme B expression by EOMES⁺ and EOMES⁻ CD4 T cells stimulated during 10 days with 2 µg/ml of coated anti-CD3 and 1 µg/ml of soluble CD28 (n=5-6 healthy donors). Data were analyzed using Wilcoxon-Matched Paired Test (**A, B**): ns=Not Significant, * p-value <0.05, **p-value <0.005, ***p-value <0.0005 and data are representative of at least 3 independent experiments.

Supplementary Figure1:

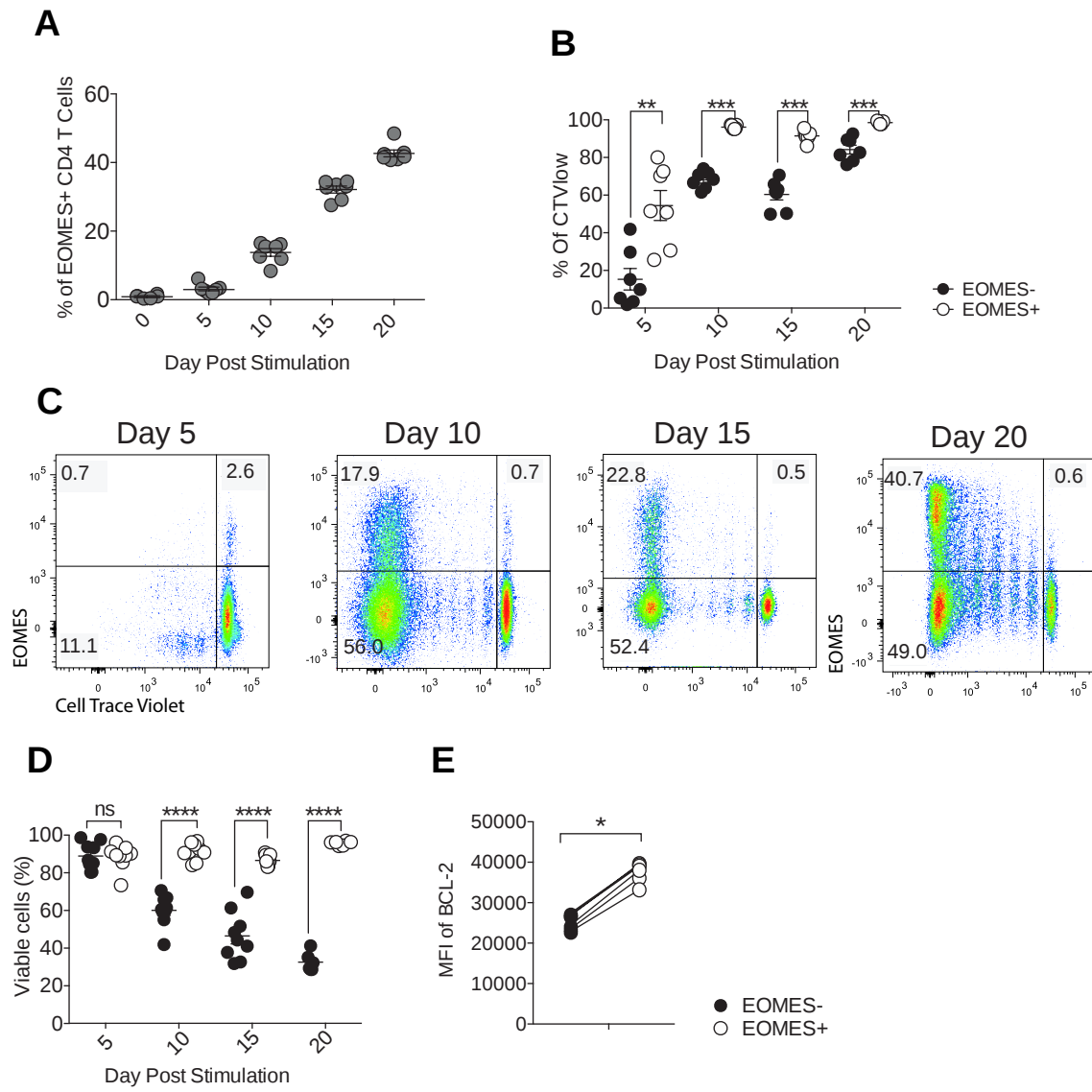
A. Representative histogram of EOMES and frequency of EOMES CD8 T cells in Naive (CCR7⁺CD45RA⁺, Blue), Effector (CCR7⁻CD45RA⁺, Red), TCM (CCR7⁺CD45RA⁻, Orange) or TEM (CCR7⁻CD45RA⁻, Green) from unstimulated PBMC of 18 healthy subjects. **B.** Frequency of EOMES⁺ CD4 and CD8 T Cells between male (20 donors) and female (18 donors). **C.** Correlation of EOMES⁺ CD4 T cells (left panel) and CD8 T cells (right panel) with age of donors (Data are representative of 38 donors). **D.** Frequencies of EOMES⁺ CD4 and CD8 T cells in Naive (CCR7⁺CD45RA⁺), Effector (CCR7⁻CD45RA⁺), TCM (CCR7⁺CD45RA⁻) or TEM (CCR7⁻CD45RA⁻) from donors carrying the rs170934 (T/C) and rs2371108 (T/G) SNPs at homozygous state (TT/TT or CC/GG). Data were analyzed using either One-Way ANOVA (**A**) Mann Whitney Test (**B, D**), or Spearman correlation Test (**C**): ns=Not Significant, * p-value <0,05, **p-value <0,005, ***p-value <0,0005 and data are representative of at least 3 independent experiments.



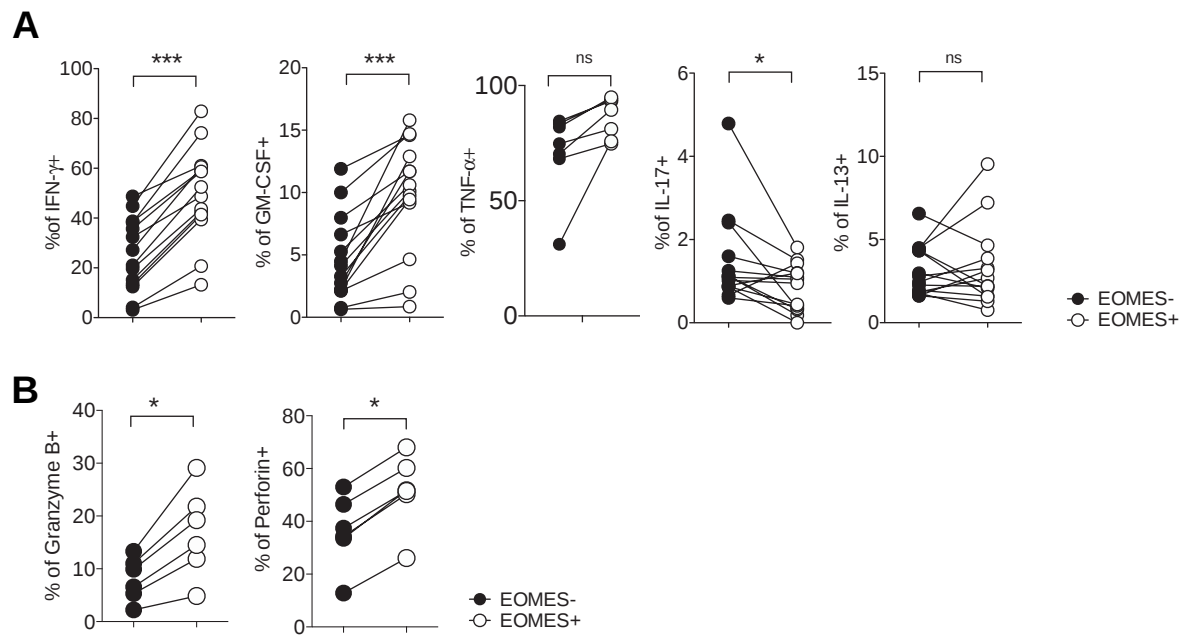
Michieletto et al, Figure 1



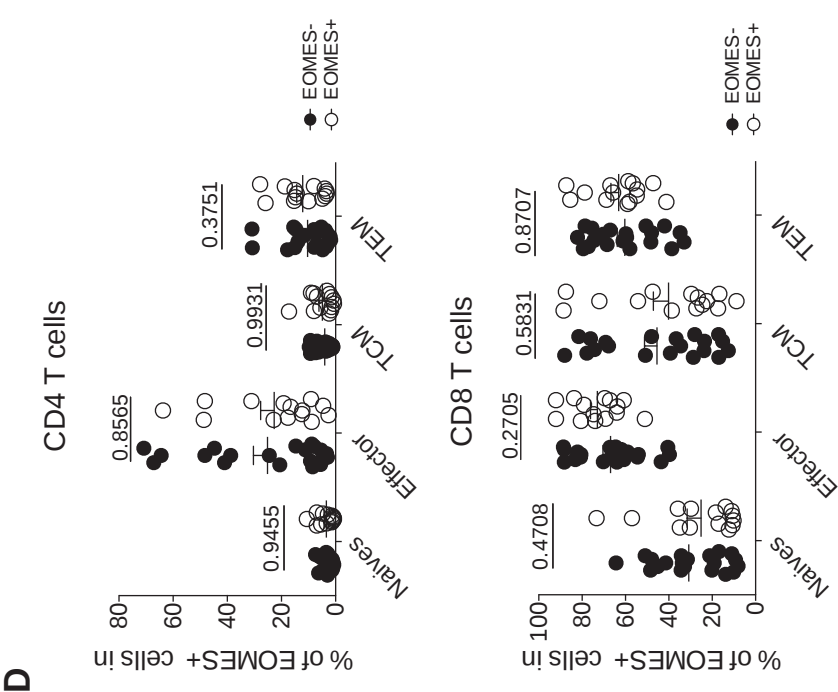
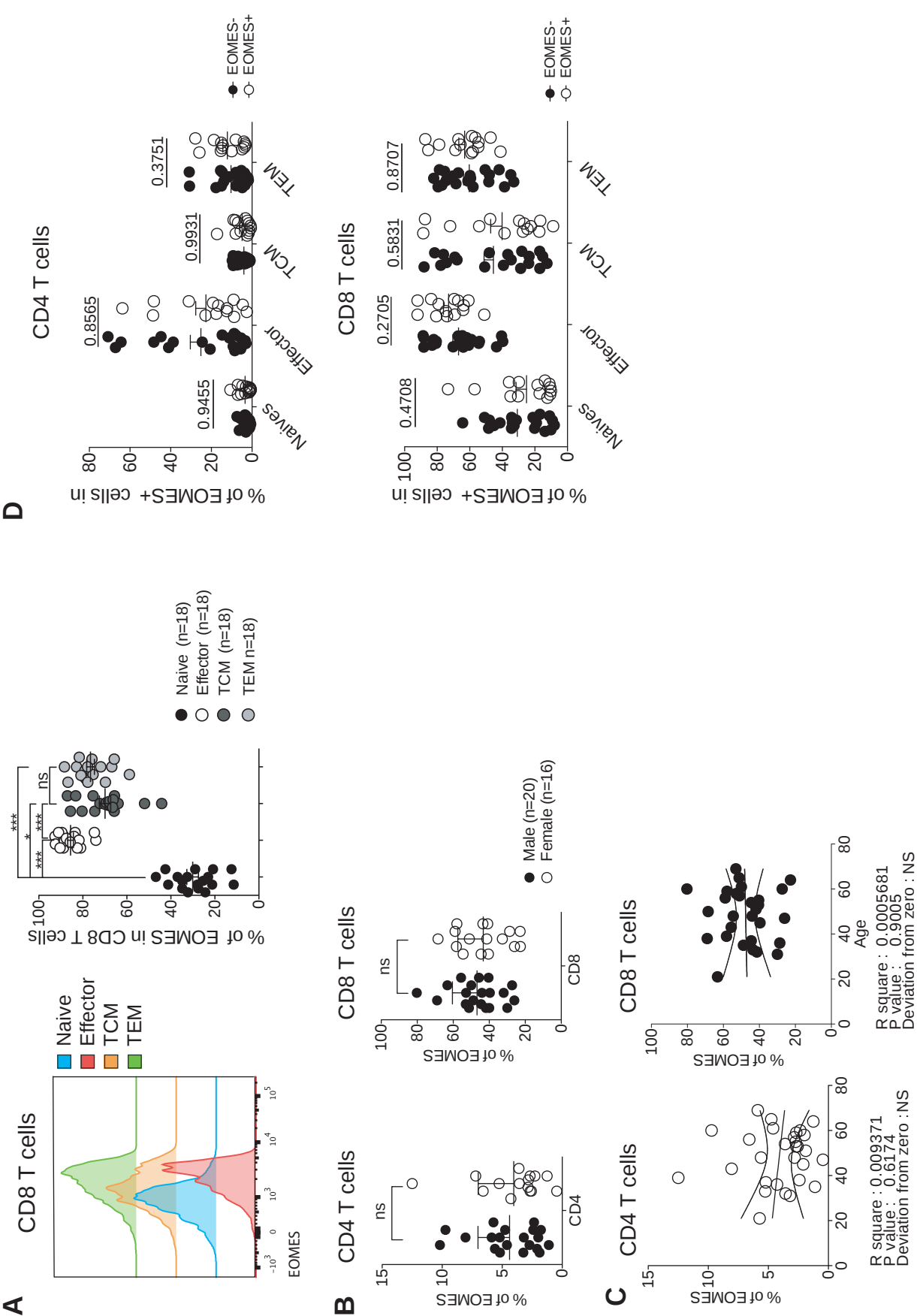
Michieletto et al, Figure 2



Michieletto et al, Figure 3



Michieletto et al, Figure 4



Michieletto et al, Supplementary Figure 1

References

- Becattini, S., D. Latorre, F. Mele, M. Foglierini, C. De Gregorio, A. Cassotta, B. Fernandez, S. Kelderman, T. N. Schumacher, D. Corti, A. Lanzavecchia and F. Sallusto (2015). "T cell immunity. Functional heterogeneity of human memory CD4(+) T cell clones primed by pathogens or vaccines." *Science* **347**(6220): 400-406.
- Bensch, B., T. Ohtani, O. Khan, M. Setty, S. Manne, S. O'Brien, P. F. Gherardini, R. S. Herati, A. C. Huang, K. M. Chang, E. W. Newell, N. Bovenschen, D. Pe'er, S. M. Albelda and E. J. Wherry (2018). "Epigenomic-Guided Mass Cytometry Profiling Reveals Disease-Specific Features of Exhausted CD8 T Cells." *Immunity* **48**(5): 1029-1045 e1025.
- Buggert, M., J. Tauriainen, T. Yamamoto, J. Frederiksen, M. A. Ivarsson, J. Michaelsson, O. Lund, B. Hejdeman, M. Jansson, A. Sonnerborg, R. A. Koup, M. R. Betts and A. C. Karlsson (2014). "T-bet and Eomes are differentially linked to the exhausted phenotype of CD8+ T cells in HIV infection." *PLoS Pathog* **10**(7): e1004251.
- Chen, L., W. He, S. T. Kim, J. Tao, Y. Gao, H. Chi, A. M. Intlekofer, B. Harvey, S. L. Reiner, Z. Yin, R. A. Flavell and J. Craft (2007). "Epigenetic and transcriptional programs lead to default IFN-gamma production by gammadelta T cells." *J Immunol* **178**(5): 2730-2736.
- Cruz-Guilloty, F., M. E. Pipkin, I. M. Djuretic, D. Levanon, J. Lotem, M. G. Lichtenheld, Y. Groner and A. Rao (2009). "Runx3 and T-box proteins cooperate to establish the transcriptional program of effector CTLs." *J Exp Med* **206**(1): 51-59.
- Curran, M. A., T. L. Geiger, W. Montalvo, M. Kim, S. L. Reiner, A. Al-Shamkhani, J. C. Sun and J. P. Allison (2013). "Systemic 4-1BB activation induces a novel T cell phenotype driven by high expression of Eomesodermin." *J Exp Med* **210**(4): 743-755.
- Daussy, C., F. Faure, K. Mayol, S. Viel, G. Gasteiger, E. Charrier, J. Bienvenu, T. Henry, E. Debien, U. A. Hasan, J. Marvel, K. Yoh, S. Takahashi, I. Prinz, S. de Bernard, L. Buffat and T. Walzer (2014). "T-bet and Eomes instruct the development of two distinct natural killer cell lineages in the liver and in the bone marrow." *J Exp Med* **211**(3): 563-577.
- Doering, T. A., A. Crawford, J. M. Angelosanto, M. A. Paley, C. G. Ziegler and E. J. Wherry (2012). "Network analysis reveals centrally connected genes and pathways involved in CD8+ T cell exhaustion versus memory." *Immunity* **37**(6): 1130-1144.
- Endo, Y., C. Iwamura, M. Kuwahara, A. Suzuki, K. Sugaya, D. J. Tumes, K. Tokoyoda, H. Hosokawa, M. Yamashita and T. Nakayama (2011). "Eomesodermin controls interleukin-5 production in memory T helper 2 cells through inhibition of activity of the transcription factor GATA3." *Immunity* **35**(5): 733-745.
- Eshima, K., S. Chiba, H. Suzuki, K. Kokubo, H. Kobayashi, M. Iizuka, K. Iwabuchi and N. Shinohara (2012). "Ectopic expression of a T-box transcription factor, eomesodermin, renders

CD4(+) Th cells cytotoxic by activating both perforin- and FasL-pathways." *Immunol Lett* **144**(1-2): 7-15.

Hoffmann, M., N. Pantazis, G. E. Martin, S. Hickling, J. Hurst, J. Meyerowitz, C. B. Willberg, N. Robinson, H. Brown, M. Fisher, S. Kinloch, A. Babiker, J. Weber, N. Nwokolo, J. Fox, S. Fidler, R. Phillips, J. Frater, Spartac and C. Investigators (2016). "Exhaustion of Activated CD8 T Cells Predicts Disease Progression in Primary HIV-1 Infection." *PLoS Pathog* **12**(7): e1005661.

Ichiyama, K., T. Sekiya, N. Inoue, T. Tamiya, I. Kashiwagi, A. Kimura, R. Morita, G. Muto, T. Shichita, R. Takahashi and A. Yoshimura (2011). "Transcription factor Smad-independent T helper 17 cell induction by transforming-growth factor-beta is mediated by suppression of eomesodermin." *Immunity* **34**(5): 741-754.

Ihle, J. N. (1996). "STATs: signal transducers and activators of transcription." *Cell* **84**(3): 331-334.

International Multiple Sclerosis Genetics, C., A. H. Beecham, N. A. Patsopoulos, D. K. Xifara, M. F. Davis, A. Kempainen, C. Cotsapas, T. S. Shah, C. Spencer, D. Booth, A. Goris, A. Oturai, J. Saarela, B. Fontaine, B. Hemmer, C. Martin, F. Zipp, S. D'Alfonso, F. Martinelli-Boneschi, B. Taylor, H. F. Harbo, I. Kockum, J. Hillert, T. Olsson, M. Ban, J. R. Oksenberg, R. Hintzen, L. F. Barcellos, C. Wellcome Trust Case Control, I. B. D. G. C. International, C. Agliardi, L. Alfredsson, M. Alizadeh, C. Anderson, R. Andrews, H. B. Sondergaard, A. Baker, G. Band, S. E. Baranzini, N. Barizzzone, J. Barrett, C. Bellenguez, L. Bergamaschi, L. Bernardinelli, A. Berthele, V. Biberacher, T. M. Binder, H. Blackburn, I. L. Bomfim, P. Brambilla, S. Broadley, B. Brochet, L. Brundin, D. Buck, H. Butzkueven, S. J. Caillier, W. Camu, W. Carpentier, P. Cavalla, E. G. Celius, I. Coman, G. Comi, L. Corrado, L. Cosemans, I. Cournu-Rebeix, B. A. Cree, D. Cusi, V. Damotte, G. Defer, S. R. Delgado, P. Deloukas, A. di Sapio, A. T. Dilthey, P. Donnelly, B. Dubois, M. Duddy, S. Edkins, I. Elovaaara, F. Esposito, N. Evangelou, B. Fiddes, J. Field, A. Franke, C. Freeman, I. Y. Frohlich, D. Galimberti, C. Gieger, P. A. Gourraud, C. Graetz, A. Graham, V. Grummel, C. Guaschino, A. Hadjixenofontos, H. Hakonarson, C. Halfpenny, G. Hall, P. Hall, A. Hamsten, J. Harley, T. Harrower, C. Hawkins, G. Hellenthal, C. Hillier, J. Hobart, M. Hoshi, S. E. Hunt, M. Jagodic, I. Jelcic, A. Jochim, B. Kendall, A. Kermode, T. Kilpatrick, K. Koivisto, I. Konidari, T. Korn, H. Kronsbein, C. Langford, M. Larsson, M. Lathrop, C. Lebrun-Frenay, J. Lechner-Scott, M. H. Lee, M. A. Leone, V. Leppa, G. Liberatore, B. A. Lie, C. M. Lill, M. Linden, J. Link, F. Luessi, J. Lycke, F. Macchiardi, S. Mannisto, C. P. Manrique, R. Martin, V. Martinelli, D. Mason, G. Mazibrada, C. McCabe, I. L. Mero, J. Mescheriakova, L. Moutsianas, K. M. Myhr, G. Nagels, R. Nicholas, P. Nilsson, F. Piehl, M. Pirinen, S. E. Price, H. Quach, M. Reunanen, W. Robberecht, N. P. Robertson, M. Rodegher, D. Rog, M. Salvetti, N. C. Schnetz-Boutaud, F. Sellebjerg, R. C. Selter, C. Schaefer, S. Shaunak, L. Shen, S. Shields, V. Siffrin, M. Slee, P. S. Sorensen, M. Sorosina, M. Sospedra, A. Spurkland, A. Strange, E. Sundqvist, V. Thijs, J. Thorpe, A. Ticca, P. Tienari, C. van Duijn, E. M. Visser, S. Vucic, H. Westerlind, J. S. Wiley, A. Wilkins, J. F. Wilson, J. Winkelmann, J. Zajicek, E. Zindler, J. L. Haines, M. A. Pericak-Vance, A. J. Iverson, G. Stewart, D. Hafler, S. L. Hauser, A. Compston, G. McVean, P. De Jager, S. J. Sawcer and J. L. McCauley (2013). "Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis." *Nat Genet* **45**(11): 1353-1360.

Intlekofer, A. M., A. Banerjee, N. Takemoto, S. M. Gordon, C. S. Dejong, H. Shin, C. A. Hunter, E. J. Wherry, T. Lindsten and S. L. Reiner (2008). "Anomalous type 17 response to viral infection by CD8+ T cells lacking T-bet and eomesodermin." Science **321**(5887): 408-411.

Intlekofer, A. M., N. Takemoto, E. J. Wherry, S. A. Longworth, J. T. Northrup, V. R. Palanivel, A. C. Mullen, C. R. Gasink, S. M. Kaech, J. D. Miller, L. Gapin, K. Ryan, A. P. Russ, T. Lindsten, J. S. Orange, A. W. Goldrath, R. Ahmed and S. L. Reiner (2005). "Effector and memory CD8+ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin." Nat Immunol **6**(12): 1236-1244.

Jenner, R. G., M. J. Townsend, I. Jackson, K. Sun, R. D. Bouwman, R. A. Young, L. H. Glimcher and G. M. Lord (2009). "The transcription factors T-bet and GATA-3 control alternative pathways of T-cell differentiation through a shared set of target genes." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(42): 17876-17881.

Kara, E. E., D. R. McKenzie, C. R. Bastow, C. E. Gregor, K. A. Fenix, A. D. Ogunniyi, J. C. Paton, M. Mack, D. R. Pombal, C. Seillet, B. Dubois, A. Liston, K. P. MacDonald, G. T. Belz, M. J. Smyth, G. R. Hill, I. Comerford and S. R. McColl (2015). "CCR2 defines in vivo development and homing of IL-23-driven GM-CSF-producing Th17 cells." Nat Commun **6**: 8644.

Kitano, S., T. Tsuji, C. Liu, D. Hirschhorn-Cymerman, C. Kyi, Z. Mu, J. P. Allison, S. Gnajatic, J. D. Yuan and J. D. Wolchok (2013). "Enhancement of tumor-reactive cytotoxic CD4+ T cell responses after ipilimumab treatment in four advanced melanoma patients." Cancer Immunol Res **1**(4): 235-244.

Knox, J. J., G. L. Cosma, M. R. Betts and L. M. McLane (2014). "Characterization of T-bet and eomes in peripheral human immune cells." Front Immunol **5**: 217.

Lord, G. M., R. M. Rao, H. Choe, B. M. Sullivan, A. H. Lichtman, F. W. Luscinskas and L. H. Glimcher (2005). "T-bet is required for optimal proinflammatory CD4+ T-cell trafficking." Blood **106**(10): 3432-3439.

Lupar, E., M. Brack, L. Garnier, S. Laffont, K. S. Rauch, K. Schachtrup, S. J. Arnold, J. C. Guery and A. Izcue (2015). "Eomesodermin Expression in CD4+ T Cells Restricts Peripheral Foxp3 Induction." J Immunol **195**(10): 4742-4752.

McLane, L. M., P. P. Banerjee, G. L. Cosma, G. Makedonas, E. J. Wherry, J. S. Orange and M. R. Betts (2013). "Differential localization of T-bet and Eomes in CD8 T cell memory populations." J Immunol **190**(7): 3207-3215.

Patsopoulos, N. A., M. S. G. W. G. Bayer Pharma, I.-b. Steering Committees of Studies Evaluating, C. C. R. A. a, A. N. Consortium, GeneMsa, C. International Multiple Sclerosis Genetics, F. Esposito, J. Reischl, S. Lehr, D. Bauer, J. Heubach, R. Sandbrink, C. Pohl, G. Edan, L. Kappos, D. Miller, J. Montalban, C. H. Polman, M. S. Freedman, H. P. Hartung, B. G. Arnason, G. Comi, S. Cook, M. Filippi, D. S. Goodin, D. Jeffery, P. O'Connor, G. C. Ebers, D. Langdon, A. T. Reder, A. Traboulsee, F. Zipp, S. Schimrigk, J. Hillert, M. Bahlo, D. R. Booth, S. Broadley, M. A. Brown, B. L. Browning, S. R. Browning, H. Butzkueven, W. M. Carroll, C. Chapman, S. J. Foote, L. Griffiths, A. G. Kermode, T. J. Kilpatrick, J. Lechner-Scott, M. Marriott,

D. Mason, P. Moscato, R. N. Heard, M. P. Pender, V. M. Perreau, D. Perera, J. P. Rubio, R. J. Scott, M. Slee, J. Stankovich, G. J. Stewart, B. V. Taylor, N. Tubridy, E. Willoughby, J. Wiley, P. Matthews, F. M. Boneschi, A. Compston, J. Haines, S. L. Hauser, J. McCauley, A. Ivanson, J. R. Oksenberg, M. Pericak-Vance, S. J. Sawcer, P. L. De Jager, D. A. Hafler and P. I. de Bakker (2011). "Genome-wide meta-analysis identifies novel multiple sclerosis susceptibility loci." Ann Neurol **70**(6): 897-912.

Pearce, E. L., A. C. Mullen, G. A. Martins, C. M. Krawczyk, A. S. Hutchins, V. P. Zediak, M. Banica, C. B. DiCioccio, D. A. Gross, C. A. Mao, H. Shen, N. Cereb, S. Y. Yang, T. Lindsten, J. Rossant, C. A. Hunter and S. L. Reiner (2003). "Control of effector CD8+ T cell function by the transcription factor Eomesodermin." Science **302**(5647): 1041-1043.

Qui, H. Z., A. T. Hagymasi, S. Bandyopadhyay, M. C. St Rose, R. Ramanarasimhaiah, A. Menoret, R. S. Mittler, S. M. Gordon, S. L. Reiner, A. T. Vella and A. J. Adler (2011). "CD134 plus CD137 dual costimulation induces Eomesodermin in CD4 T cells to program cytotoxic Th1 differentiation." J Immunol **187**(7): 3555-3564.

Raveney, B. J., S. Oki, H. Hohjoh, M. Nakamura, W. Sato, M. Murata and T. Yamamura (2015). "Eomesodermin-expressing T-helper cells are essential for chronic neuroinflammation." Nat Commun **6**: 8437.

Sahmatova, L., E. Sugis, M. Sunina, H. Hermann, E. Prans, M. Pihlap, K. Abram, A. Rebane, H. Peterson, P. Peterson, K. Kingo and K. Kisand (2017). "Signs of innate immune activation and premature immunosenescence in psoriasis patients." Sci Rep **7**(1): 7553.

Sen, D. R., J. Kaminski, R. A. Barnitz, M. Kurachi, U. Gerdemann, K. B. Yates, H. W. Tsao, J. Godec, M. W. LaFleur, F. D. Brown, P. Tonnerre, R. T. Chung, D. C. Tully, T. M. Allen, N. Frahm, G. M. Lauer, E. J. Wherry, N. Yosef and W. N. Haining (2016). "The epigenetic landscape of T cell exhaustion." Science **354**(6316): 1165-1169.

Serroukh, Y., C. Gu-Trantien, B. Hooshir Kashani, M. Defrance, T. P. Vu Manh, A. Azouz, A. Detavernier, A. Hoyois, J. Das, M. Bizet, E. Pollet, T. Tabbuso, E. Calonne, K. van Gisbergen, M. Dalod, F. Fuks, S. Goriely and A. Marchant (2018). "The transcription factors Runx3 and ThPOK cross-regulate acquisition of cytotoxic function by human Th1 lymphocytes." Elife **7**.

Stienne, C., M. F. Michieletto, M. Benamar, N. Carrie, I. Bernard, X. H. Nguyen, Y. Lippi, F. Duguet, R. S. Liblau, S. M. Hedrick, A. Saoudi and A. S. Dejean (2016). "Foxo3 Transcription Factor Drives Pathogenic T Helper 1 Differentiation by Inducing the Expression of Eomes." Immunity **45**(4): 774-787.

Suto, A., A. L. Wurster, S. L. Reiner and M. J. Grusby (2006). "IL-21 inhibits IFN-gamma production in developing Th1 cells through the repression of Eomesodermin expression." J Immunol **177**(6): 3721-3727.

Szabo, S. J., S. T. Kim, G. L. Costa, X. Zhang, C. G. Fathman and L. H. Glimcher (2000). "A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment." Cell **100**(6): 655-669.

Takemoto, N., A. M. Intlekofer, J. T. Northrup, E. J. Wherry and S. L. Reiner (2006). "Cutting Edge: IL-12 inversely regulates T-bet and eomesodermin expression during pathogen-induced CD8+ T cell differentiation." J Immunol **177**(11): 7515-7519.

Takeuchi, A. and T. Saito (2017). "CD4 CTL, a Cytotoxic Subset of CD4(+) T Cells, Their Differentiation and Function." Front Immunol **8**: 194.

Townsend, M. J., A. S. Weinmann, J. L. Matsuda, R. Salomon, P. J. Farnham, C. A. Biron, L. Gapin and L. H. Glimcher (2004). "T-bet regulates the terminal maturation and homeostasis of NK and Valpha14i NKT cells." Immunity **20**(4): 477-494.

Utzschneider, D. T., A. Delpoux, D. Wieland, X. Huang, C. Y. Lai, M. Hofmann, R. Thimme and S. M. Hedrick (2018). "Active Maintenance of T Cell Memory in Acute and Chronic Viral Infection Depends on Continuous Expression of FOXO1." Cell Rep **22**(13): 3454-3467.

Wang, R., Y. Kang, C. V. Lohr, K. A. Fischer, C. S. Bradford, G. Johnson, W. M. Dashwood, D. E. Williams, E. Ho and R. H. Dashwood (2016). "Reciprocal regulation of BMF and BIRC5 (Survivin) linked to Eomes overexpression in colorectal cancer." Cancer Lett **381**(2): 341-348.

Wang, W., D. Yu, A. A. Sarnaik, B. Yu, M. Hall, D. Morelli, Y. Zhang, X. Zhao and J. S. Weber (2012). "Biomarkers on melanoma patient T cells associated with ipilimumab treatment." J Transl Med **10**: 146.

Woolf, E., C. Xiao, O. Fainaru, J. Lotem, D. Rosen, V. Negreanu, Y. Bernstein, D. Goldenberg, O. Brenner, G. Berke, D. Levanon and Y. Groner (2003). "Runx3 and Runx1 are required for CD8 T cell development during thymopoiesis." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(13): 7731-7736.

Yang, Y., J. Xu, Y. Niu, J. S. Bromberg and Y. Ding (2008). "T-bet and eomesodermin play critical roles in directing T cell differentiation to Th1 versus Th17." J Immunol **181**(12): 8700-8710.

Zhang, P., J. S. Lee, K. H. Gartlan, I. S. Schuster, I. Comerford, A. Varelias, M. A. Ullah, S. Vuckovic, M. Koyama, R. D. Kuns, K. R. Locke, K. J. Beckett, S. D. Olver, L. D. Samson, M. Montes de Oca, F. de Labastida Rivera, A. D. Clouston, G. T. Belz, B. R. Blazar, K. P. MacDonald, S. R. McColl, R. Thomas, C. R. Engwerda, M. A. Degli-Esposti, A. Kallies, S. K. Tey and G. R. Hill (2017). "Eomesodermin promotes the development of type 1 regulatory T (TR1) cells." Sci Immunol **2**(10).

Zhu, Y., S. Ju, E. Chen, S. Dai, C. Li, P. Morel, L. Liu, X. Zhang and B. Lu (2010). "T-bet and eomesodermin are required for T cell-mediated antitumor immune responses." J Immunol **185**(6): 3174-3183.

Discussion

Rôle de Foxo3 lors de l'activation des lymphocytes T CD4.

Jusqu'à présent, le rôle de Foxo3 a surtout été étudié dans les cellules myéloïdes, à cause de son expression plus forte dans ce compartiment par rapport au compartiment lymphoïde. En effet, les premières études sur le rôle de Foxo3 montrent que ce facteur de transcription permet de contrôler l'amplitude de la réponse immunitaire antivirale. Les souris déficientes pour ce FT présentent un nombre de LT CD4 et T CD8 spécifiques 3 à 4 fois supérieur par rapport aux souris contrôles. Ce phénotype n'est pas dépendant du compartiment T mais dépend du compartiment myéloïde. En effet, la déficience en Foxo3 s'accompagne d'une augmentation drastique de la quantité de cytokines pro-inflammatoires produites par les cellules dendritiques, les monocytes et les macrophages dans un contexte infectieux (Dejean, Beisner et al. 2009, Litvak, Ratushny et al. 2012, Lee, Espeli et al. 2013). Ces travaux suggèrent donc que Foxo3 joue un rôle inhibiteur lors de réponses antivirales en limitant la sécrétion de cytokines par les cellules myéloïdes.

Des études faites sur les facteurs Foxo dans les lymphocytes T montrent que, très rapidement après engagement du TCR, ces protéines sont exclues du noyau par phosphorylation *via* la voie PI3K-Akt (Brunet, Bonni et al. 1999, Ouyang, Liao et al. 2012). Il est connu que Foxo1 et Foxo3 peuvent être phosphorylés sur 3 résidus par Akt (T24, S256, S319 pour Foxo1 et T32, S253 et S315 pour Foxo3). Cette phosphorylation induit l'exclusion nucléaire des facteurs Foxo et leur dégradation par protéolyse (Biggs, Meisenhelder et al. 1999). Nos résultats montrent pourtant que, malgré cette régulation dynamique lors des phases précoces de l'engagement du TCR, l'expression de Foxo3 augmente lorsque les LT CD4 sont stimulés de façon prolongée, soit *in vitro* avec de l'anti-CD3, soit dans un contexte plus physiologique en présence d'APC et de peptides. Nous avons montré que l'expression de Foxo3 est proportionnelle à l'intensité du signal du TCR, et également que Foxo3 s'accumule dans le noyau au cours du temps. Ces résultats, en conjonction avec ceux de la littérature, montrent donc que la régulation spatiotemporelle des facteurs Foxo est dynamique lors de l'activation des LT CD4. De façon intéressante, le fait que Foxo3 se relocalise et s'accumule très rapidement dans le noyau nous amène à penser que

ce FT pourrait jouer un rôle important lors de l'activation et de la différenciation des LT.

Néanmoins, le rôle de Foxo3 dans les lymphocytes T n'a été que très peu étudié. Deux études, également réalisées dans un contexte antiviral, montrent un possible rôle de Foxo3 dans les lymphocytes T CD8. Dans cette étude, les auteurs ont pu mettre en évidence que la déficience en Foxo3 s'accompagne d'une augmentation de la proportion des lymphocytes T CD8 mémoires spécifiques du LCMV, et que ce phénotype serait dû à une augmentation de la survie et non à une prolifération accrue des LT CD8 (Sullivan, Kim et al. 2012). Cette diminution de l'apoptose des LT CD8 résulte de la augmentation du facteur anti-apoptotique Bcl-2 et d'une diminution du facteur pro-apoptotique BIM dans les LT CD8, mais n'impacte pas pour autant la qualité de la réponse immunitaire (Sullivan, Kim et al. 2012).

Il a été montré que Foxo3 joue un rôle dans les LT CD8 et dans de nombreuses lignées cellulaires, où il contrôle de l'apoptose et l'entrée dans le cycle cellulaire des cellules (Brunet, Bonni et al. 1999, Stahl, Dijkers et al. 2002, You, Pellegrini et al. 2006). Notre étude sur le rôle de Foxo3 ne nous a pas permis de mettre en évidence des différences en termes de prolifération ou de survie des LT CD4, que ce soit *in vitro* ou *in vivo* dans le modèle de l'EAE. En revanche, nous avons mis en évidence que l'inactivation de Foxo3 perturbe la différenciation des LT CD4. En effet, *in vitro* les LT CD4 Foxo3^{-/-} produisent moins d'IFN- γ et de GM-CSF que les LT CD4 WT, suggérant un rôle clé de Foxo3 dans la différenciation T CD4. De nombreux rôles ont été attribués à Foxo1 dans ce processus de différenciation des T CD4. En effet, il a été montré que Foxo1 était nécessaire à la différenciation des LT CD4 en Treg et Th9, et qu'il inhibait la différenciation TFh et Th17 en activant ou réprimant des gènes clés de chaque lignage (Laine, Martin et al. 2015, Stone, Pepper et al. 2015, Buttrick, Wang et al. 2018). En particulier pour lignage Treg, il a été montré que Foxo1 et Foxo3 sont nécessaires à l'induction du programme Treg, notamment via le contrôle de l'expression de Foxp3 (Harada, Harada et al. 2010). Cette participation de Foxo3 au programme Treg semble être mineure car les souris Foxo3^{-/-} présentent une proportion et un nombre normaux de Treg, que ce soit dans le thymus ou en périphérie, à l'état basal, ou suite à l'induction de l'EAE. De plus, les LT CD4 Foxo3^{-/-} sont capables de se différencier en iTreg en présence de TGF- β . Les Treg déficients pour Foxo3 sont également fonctionnels car ils inhibent aussi efficacement la prolifération des LT

effecteurs que les Treg WT. *In vitro*, nos expériences montrent que Foxo3 joue un rôle majeur dans les LT CD4 différenciés en condition non polarisante et en condition Th1 mais pas en conditions Th2 et Th17 où l'on observe la même proportion de cellules productrices d'IL-13, d'IL-17 respectivement. En revanche dans les LT CD4 stimulés en condition neutre et en condition Th1, la production d'IFN- γ et de GM-CSF est fortement diminuée. Cette diminution d'IFN- γ et de GM-CSF est également observée *in vivo* suite à l'immunisation des souris Foxo3KO avec le peptide MOG₃₅₋₅₅ suggérant que Foxo3 participe au contrôle de la production de ces deux cytokines qui jouent un rôle majeur dans le développement de l'EAE. Ces résultats sont très intéressants car ils montrent pour la première fois un rôle de Foxo3 dans les LT qui est indépendant du rôle de Foxo1. En effet, il a longtemps été supposé que ces deux facteurs de transcription pourraient avoir des fonctions redondantes car ils sont hautement similaires au niveau de leurs séquences et possèdent le même site de liaison à l'ADN. Ainsi, la délétion d'un des facteurs Foxo pourrait être compensée par le second. Néanmoins, même si Foxo1 est exprimé à de plus forts niveaux que Foxo3 dans les LT, il ne semble pas être capable de réguler les mêmes gènes, et ce, probablement du fait d'associations avec des cofacteurs différents.

Mécanismes moléculaires par lesquels Foxo3 contrôle l'activation des lymphocytes T CD4.

Afin de mieux comprendre le rôle de Foxo3 dans les lymphocytes T CD4 et d'avoir une idée des gènes régulés par Foxo3 dans les LT CD4, nous avons analysé par « microarray », l'expression globale des transcrits dans les LT CD4 compétents ou déficients pour Foxo3, naïfs ou stimulés avec de l'anti-CD3 durant 12 ou 24 heures. A l'état basal, seulement 4 gènes sont différentiellement exprimés entre les LT CD4 Foxo3^{+/+} et Foxo3^{-/-}, ce qui suggère soit que Foxo3 n'est pas ou peu impliqué dans les LT CD4 naïfs, soit que Foxo1 jouerait un rôle redondant et permettrait de maintenir la quasi-totalité des gènes contrôlés par Foxo3. En revanche, à 12 heures post-stimulation, de nombreux gènes se retrouvent différentiellement exprimés et 2 voies majeures apparaissent fortement impactées : la voie « trafic cellulaire » qui est

fortement surexprimée et la voie « IFN- γ /réponse à l'IFN- γ » qui est au contraire sous-exprimée dans les LT Foxo3 KO.

Parmi les gènes surexprimés appartenant au trafic cellulaire, de nombreux gènes sont des gènes cibles connus de Foxo1 comme notamment *Fam65b*, *Sell* et *S1pr1* qui codent respectivement pour Fam65b, CD62L et S1P1 (Kerdiles, Beisner et al. 2009, Rougerie, Largeteau et al. 2013).

Ces résultats laissent penser qu'en absence de Foxo3, Foxo1 serait plus actif afin de compenser l'absence de Foxo3. Une autre explication serait que Foxo3 pourrait moduler l'activité de Foxo1. Cette modulation pourrait passer par la compétition pour des cofacteurs communs aux deux protéines.

Cependant, cet impact de la déficience en Foxo3 sur la migration des LT ne semble pas être impliqué dans la résistance des souris Foxo3 KO à l'EAE. En effet, nous avons pu mettre en évidence que les souris Foxo3^{-/-} présentent une susceptibilité diminuée à la maladie. Or, cette pathologie est fortement dépendante de la migration des LT pathogéniques au niveau du système nerveux central (Stromnes, Cerretti et al. 2008). Pourtant, nos résultats montrent que les LT CD4 Foxo3KO sont bel et bien capables de migrer au niveau du cerveau et de la moelle épinière, ce qui exclue donc un défaut de migration de ces cellules. En revanche, la capacité pro-inflammatoire des LT CD4, que ce soit en périphérie ou au niveau du SNC, est fortement diminuée, surtout en ce qui concerne les LT CD4 producteurs d'IFN- γ et de GM-CSF.

Ainsi, au vu de nos résultats *in vitro* et *in vivo*, l'impact de la déficience en Foxo3 sur la voie de l'IFN- γ et de sa réponse, semble relever d'un intérêt particulier pour expliquer notre phénotype. En effet, l'analyse par microarray a révélé que le gène le plus différenciellement sous-exprimé entre les LT CD4 WT et Foxo3^{-/-} est le gène qui code pour Eomesodermin (ou Eomes). Nous avons confirmé ces résultats par qPCR et au niveau protéique par cytométrie en flux. Afin de déterminer si Eomes est bien un gène cible de Foxo3, nous avons cherchés *in silico* des sites putatifs des facteurs Foxo (5'-TTGTTT(A/T)C-3' ou 5' C(A/T)AAAGAA-3' à l'aide des sites rVista et USCD genome browser (<https://rvista.dcode.org> et <https://genome.ucsc.edu>). Nous avons trouvé 3 sites potentiels, un premier situé dans la région promotrice et un second après le gène *Eomes*, au sein d'une région hautement conservée au cours de l'évolution. Cette région hautement conservée est riche en sites de fixation de facteurs de transcription et est sensible à la DNase I, ce qui suggère que cette zone pourrait être

une zone de régulation de type « enhancer » que nous avons nommés « 3'UTR-E ». Par la suite nous avons pu mettre en évidence grâce à des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine que Foxo3 est capable de se fixer au niveau de ces 3 régions avec une fixation préférentielle au niveau des sites de fixation de la région enhancer « 3'-UTR-E ». Ces résultats sont très intéressants pour plusieurs raisons : premièrement, dans les LT CD8, plusieurs études ont montré que Foxo1 permettait d'induire l'expression d'Eomes, qui est lui-même nécessaire à la transition vers un phénotype T CD8 mémoire (Rao, Li et al. 2012, Hess Michelini, Doedens et al. 2013, Tejera, Kim et al. 2013). Dans notre cas, bien que Foxo1 soit exprimé par les LT CD4, son expression n'est pas suffisante pour induire l'expression d'Eomes et ainsi compenser l'absence de Foxo3. Ces résultats suggèrent donc un rôle non-redondant de Foxo1 et Foxo3 dans les LT CD4 et les LT CD8. En effet, nous avons montré que la déficience en Foxo3 dans le compartiment T CD8 n'impacte pas l'expression d'Eomes, suggérant que Foxo1 suffit au contrôle d'Eomes dans les LT CD8. Deuxièmement, il a été mis en évidence que Foxo3 se fixe préférentiellement au niveau de zones de type « enhancer » et que sa fixation permet d'amplifier les marques actives de la transcription telles que l'acétylation de l'histone H3 sur sa lysine 27 (H3K27Ac) ou le recrutement de l'ARN polymérase II. Néanmoins, il semblerait que la fixation de Foxo3 puisse réguler un grand nombre de gènes et que sa fixation au niveau des régions « enhancer » soit hautement dépendante de l'activité de celui-ci. En parallèle, Foxo3 peut lui-même se fixer sur des régions « enhancer » non actives, y recruter des modificateurs d'histones et les rendre permissives (Eijkelenboom, Mokry et al. 2013, Eijkelenboom, Mokry et al. 2013). Ainsi, Foxo3 agirait comme un activateur de la transcription des gènes *via* le recrutement de l'ARN polymérase II et par le remodelage de la structure de la chromatine afin de rapprocher les régions « enhancer » des régions promotrices (Eijkelenboom, Mokry et al. 2013). Le modèle proposé du mode d'action de Foxo3 est représenté ci-dessous (**Figure 26**).

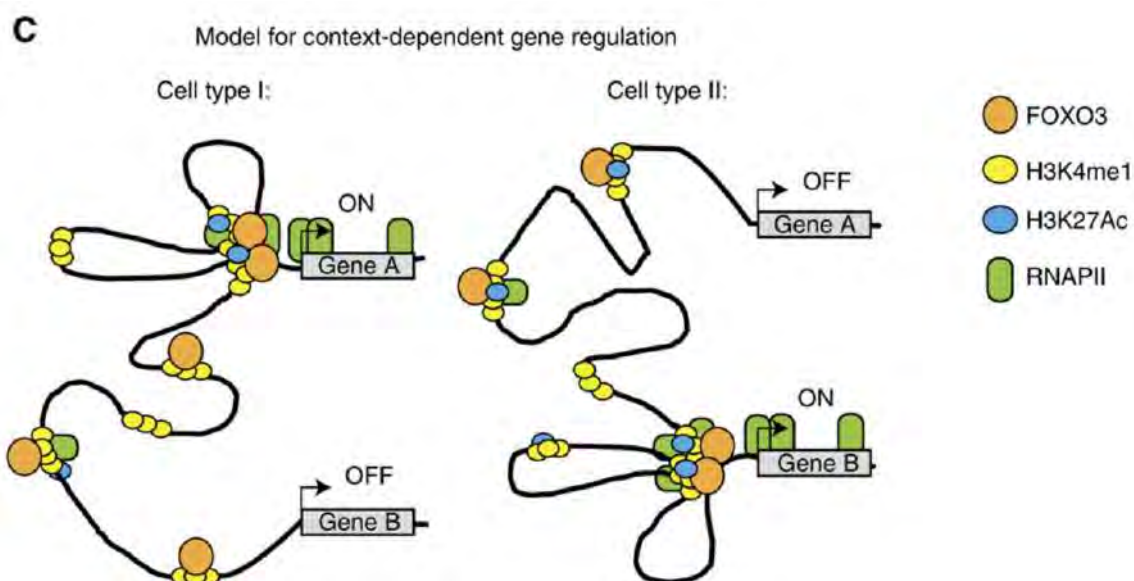


Figure 26 – Modèle proposé pour la régulation des gènes cibles de Foxo3
(Extrait de Eijkelenboom et al., 2013)

Des études ont montré que Foxo3 régule la majeure partie de ses gènes cibles de manière directe (Eijkelenboom, Mokry et al. 2013). Pour ce qui est de la régulation d'*Eomes*, nos résultats de ChIP montrent que Foxo3 est capable de se fixer au niveau de régions qui correspondent au locus d'*Eomes*, mais cette technique n'apporte pas la preuve irréfutable d'une liaison directe de Foxo3 à l'ADN (Gordan, Hartemink et al. 2009). En effet, il est possible que Foxo3 fasse partie d'un complexe transcriptionnel où il jouerait le rôle de cofacteur et exercerait ses fonctions *via* des interactions protéines-protéines. Afin d'apporter la preuve formelle que Foxo3 régule directement l'expression d'*Eomes*, une forme mutée sur le domaine de fixation à l'ADN de Foxo3 a été générée et des expériences de « gène-rapporteur » ont été réalisées. Nos résultats montrent que l'interaction du DBD (DNA-Binding Domain) est indispensable à l'activation du promoteur *Eomes*, démontrant ainsi qu'*Eomes* est bien un gène cible direct de Foxo3 dans les LT CD4.

Régulation de l'expression d'EOMES et ses fonctions dans les lymphocytes T CD4.

Eomes code pour un facteur de transcription appartenant à la famille T-box et est exprimé par les LT CD8 et les NK, où son rôle a été particulièrement bien décrit

(Pearce, Mullen et al. 2003, Daussy, Faure et al. 2014). En effet, dans les NK, Eomes contrôle la production d'IFN- γ et de CCL3 ainsi que l'acquisition de Granzyme et l'expression de CD122 (Daussy, Faure et al. 2014). Dans les LT CD8, Eomes contrôle également la production d'IFN- γ et l'expression de molécules cytotoxiques ainsi que la transition des LT CD8 effecteurs en LT CD8 mémoires (Pearce, Mullen et al. 2003, Intlekofer, Takemoto et al. 2005, Banerjee, Gordon et al. 2010, Rao, Li et al. 2010). De plus, Eomes est également exprimé par des « Innate Like memory CD8 T cells » en présence d'IL-15 et d'IL-4 (Martinet, Tonon et al. 2015, Renkema, Lee et al. 2016). Dans les LT CD4, il a été montré qu'Eomes pouvait se substituer à T-bet pour la production d'IFN- γ et également que ce facteur de transcription serait associé à une sous-population particulière de LT CD4 dite cytotoxique (Yang, Xu et al. 2008, Qui, Hagymasi et al. 2011, Eshima, Chiba et al. 2012, Takeuchi and Saito 2017). Dans les LT CD4 naïfs, Eomes et T-bet ne sont pas détectables, mais leur expression est induite suite à l'activation des LT. Nos résultats montrent qu'à des temps précoces post-activation, l'expression de T-bet n'est pas affectée alors que l'expression d'Eomes est déjà diminuée dans les LT CD4 Foxo3^{-/-} ce qui suggère que la dynamique d'expression de ces deux facteurs est différente. La régulation de ces deux FT a très bien été décrite dans les LT CD8 grâce à la génération de souris invalidées pour ces gènes. Ainsi, dans les LT CD8, T-bet est principalement exprimé suite à l'engagement du TCR dans les effecteurs et est induit sous l'effet de l'IL-12 via STAT4, alors qu'Eomes est surtout nécessaire dans la phase mémoire et est exprimé en présence d'IL-15 et sous la dépendance des facteurs Tcf-7 et Foxo1 (Intlekofer, Takemoto et al. 2005, Paley and Wherry 2010, Hess Michelini, Doedens et al. 2013). Dans les LT CD4, nos résultats et ceux de la littérature montrent que T-bet est également exprimé en présence d'IL-12, cytokine indispensable à la différenciation Th1 (Thieu, Yu et al. 2008). En revanche, dans les LT CD8, l'IL-12 réprime l'expression d'Eomes ce qui n'est pas le cas dans les LT CD4 où l'ajout d'IL-12 n'impacte pas son niveau d'expression (Takemoto, Intlekofer et al. 2006). Cependant, l'IL-15 ne semble pas avoir d'impact sur l'expression d'Eomes ni sur celle de T-bet dans les LT CD4 (résultats non montrés). T-bet peut également réguler sa propre expression en présence d'IFN- γ . En effet, l'IFN- γ est une cible transcriptionnelle directe de T-bet dans les LT CD4 et permet, lors de sa fixation sur son récepteur, d'amplifier l'expression de T-bet *via* la

translocation dans le noyau des protéines STAT1. Ce dernier mode de régulation semble très important pour l'expression de T-bet, car nous avons montré que la culture des LT CD4 en présence d'anti-IFN- γ abolit l'expression de T-bet alors que nous n'observons pas de changement dans l'expression d'Eomes. Ces résultats peuvent donc expliquer pourquoi dans nos conditions expérimentales et dans nos puces, nous observons une légère diminution de l'expression de T-bet à des temps tardifs, alors que l'expression d'Eomes à T12 est déjà impactée par la déficience en Foxo3.

De nombreuses études ont montrés que T-bet est le facteur de transcription indispensable au lignage Th1, que ce soit pour leur différenciation ou pour le maintien du lignage. L'étude de la cinétique d'expression de T-bet, Eomes et de l'IFN- γ dans les Th0 et les Th1 suggère que les LT CD4 expriment dans un premier temps Eomes. Eomes, à son tour, va permettre l'expression de l'IFN- γ en se fixant directement au niveau de son promoteur dans les LT CD4, pour induire y son expression. Dans un deuxième temps l'IFN- γ va permettre l'expression de T-bet sous l'influence de cette première vague d'IFN- γ qui elle-même dépend d'Eomes. De plus la surexpression d'Eomes dans des LT déficients pour Foxo3 permet de restaurer la proportion de cellules productrices d'IFN- γ montrant que dans les LT CD4 primaires, Eomes peut favoriser la production d'IFN- γ . Nos résultats ajoutent donc une étape séquentielle du contrôle de l'expression de T-bet suite à l'engagement du TCR. En effet, il a été montré que l'engagement du TCR peut induire l'expression de T-bet indépendamment de l'IL-12 dans les LT CD4 (Boothby 2009). Dans notre étude, nous avons montré que l'expression d'Eomes est dépendante de l'intensité et de la durée du signal du TCR et que son expression dépend de la fixation de Foxo3, dont l'expression dépend également l'engagement du TCR et de la voie Nf-kB.

Des résultats récents obtenus dans les souris Eomes^{fl/fl}xCD4Cre⁻ suggèrent que l'engagement du CD28 potentialise la proportion de cellules Eomes⁺ alors que l'engagement du CD28 n'influence pas l'expression de Foxo3. Ces résultats laissent donc penser qu'Eomes peut être induit indépendamment de Foxo3, ce qui explique pourquoi nous observons une diminution de la proportion des cellules Eomes⁺ mais pas une disparition totale de cette population. La co-stimulation par CD28 réduit le seuil d'activation des LT CD4 via l'engagement du TCR et augmente la prolifération des cellules grâce à la sécrétion d'IL-2. Or l'IL-2 pourrait jouer un rôle important dans

la régulation d'Eomes. En effet, en plus de la voie en aval du signal du TCR, Eomes peut être exprimé sous l'influence du FT STAT5. Dans les CTL, l'IL-2 est un fort inducteur d'Eomes et permet également l'expression de *Pfr1* qui est un gène cible d'Eomes et de STAT5 (Pipkin, Sacks et al. 2010). Ce mécanisme d'action de l'IL-2 semble dépendant de la cascade de signalisation déclenchée par la fixation de l'IL-2 sur son récepteur puisque STAT5, le facteur de transcription en aval de la signalisation, est capable de se fixer au niveau des régions -3.3 et +14.6kb en amont et en aval d'Eomes dans les LT CD8 (Grange, Verdeil et al. 2013). Il est donc difficile d'attribuer l'augmentation de la proportion des cellules Eomes⁺ à l'engagement du CD28 ou à la production d'IL-2. Grâce à l'utilisation de souris Eomes^{GFP}, nous avons pu mettre en évidence que le pourcentage de cellules GFP⁺ augmente en présence d'IL-2 ce qui suggère que, comme dans les LT CD8, l'IL-2 *via* STAT 5 pourrait potentialiser l'effet du signal du TCR pour l'induction d'Eomes dans les T CD4.

Eomes semble jouer un rôle pléiotrope dans les LT CD4. En effet, l'expression d'Eomes n'est pas restreinte aux cellules Th1 puisque des études ont montré qu'Eomes pouvait être exprimé par les Th2, les Th17, les Tr1, ainsi que par des LT producteurs de GM-CSF (Yang, Xu et al. 2008, Endo, Iwamura et al. 2011, Qui, Hagymasi et al. 2011, Kara, McKenzie et al. 2015, Zhang, Lee et al. 2017).

Dans les Th2, Eomes est exprimé par une sous-population particulière de Th2 mémoire, et dans les Th2 différenciés *in vitro* chez l'Homme (Endo, Iwamura et al. 2011, Serroukh, Gu-Trantien et al. 2018). Chez la souris dans un modèle d'asthme chronique, l'expression d'Eomes inhibe l'interaction de GATA3 avec le locus de *Il5*, sans aucune mention d'une acquisition de fonctions cytotoxiques où de production d'IFN- γ par ces cellules (Endo, Iwamura et al. 2011). Néanmoins *in vitro*, lorsque l'on traite des Th2 et des Th9 avec de l'IFN- γ , seuls les Th9 acquièrent l'expression d'Eomes (Tofukuji, Kuwahara et al. 2012). Ces résultats sont intéressants car les Th9 sont considérés comme un stade de différenciation terminal des Th2. Or dans les Th9 mais pas dans les Th2, Eomes peut être exprimé par un mécanisme en présence d'IFN- γ , et de PU.1 (Tofukuji, Kuwahara et al. 2012). Ainsi, on peut penser qu'en condition inflammatoire, l'accès au locus *Eomes* serait favorisé par des facteurs de transcription exprimés dans certaines cellules permissives, comme par exemple les Th9. De plus, dans nos conditions de culture, nous n'avons pas observé d'expression d'Eomes par les Th2 induits *in vitro*, ce qui suggère que l'expression d'Eomes dans

les Th2 dépend probablement de l'intensité des différents signaux perçus par les LT CD4 lors de la différenciation *in vitro*.

Eomes est également exprimé par les LT régulateurs qui n'expriment pas Foxp3 : les Tr1. En effet, dans les Tr1, Eomes est exprimé sous l'influence du facteur de transcription Blimp-1 et via l'IL-27 *in vivo* et permet la production d'IFN- γ , d'IL-10 et de Granzyme B par les Tr1. Dans ces cellules, les gènes *Il10*, *Ifng* et *Grzb* sont tous trois des gènes cibles directs d'Eomes (Pearce, Mullen et al. 2003, Intlekofer, Takemoto et al. 2005, Zhang, Lee et al. 2017). La déficience en Blimp-1 induit une diminution de l'expression d'Eomes dans les Tr1 et la surexpression d'Eomes dans les LT CD4 Blimp-1^{-/-} permet de restaurer la proportion de cellules productrices d'IFN- γ , d'IL-10 et Granzyme B. Que ce soit *in vitro* ou *in vivo* nous n'observons pas de production d'IL-10 par les LT CD4 EOMES⁺, néanmoins on retrouve des LT CD4 EOMES⁺ qui sont capables de produire des molécules cytotoxiques dans le sang circulant de patients sains.

Dans les Th17, Eomes réprime le lignage Th17 en réprimant la transcription de ROR γ T et de l'IL17 (Ichiyama, Sekiya et al. 2011). Une autre équipe a pourtant montré à l'aide de souris Eomes-Cherry qu'Eomes serait nécessaire à la différenciation d'une sous-population de Th17 particulière exprimant (CCR6⁻CCR2⁺), qui est retrouvée en condition inflammatoire (Kara, McKenzie et al. 2015). Néanmoins nos résultats et ainsi que ceux de la littérature montrent que les LT CD4 issus de souris Eomes^{fl/fl}xCD4Cre⁺ ne présentent pas de biais de différenciation Th17 lorsqu'ils sont différenciés *in vitro* en présence d'IL-6 et de TGF- β . En revanche, nos résultats montrent qu'Eomes et la production d'IL-17 sont mutuellement exclusifs car *in vitro* nous n'observons pas de production d'IL-17 par les LT CD4 EOMES⁺, ce qui est en accord avec les résultats montrant qu'Eomes réprime les loci *Rorc* et *Il17*.

Enfin, son rôle le plus important se situe dans le compartiment Th1 où il contrôle directement la production d'IFN- γ , Perforine et de Granzyme B. En plus de ces fonctions, nous avons pu mettre en évidence une participation d'Eomes dans le contrôle du GM-CSF. Ces résultats montrent donc qu'Eomes participe activement au programme pro-inflammatoire des LT CD4 et pourrait permettre aux LT CD4 d'exercer des fonctions cytotoxiques. En effet, de nombreuses études montrent que dans certains cas, les LT CD4 peuvent acquérir des fonctions cytotoxiques qui sont

habituellement dédiées aux LT CD8. Ces lymphocytes T « cytotoxiques » sont utiles pour contrôler et éradiquer les cellules cancéreuses et dans les réponses antivirales, mais elles jouent également des rôles néfastes dans les maladies auto-immunes et en particulier dans la Sclérose en Plaques (Quezada, Simpson et al. 2010 , Brown, Lee et al. 2012, Raveney, Oki et al. 2015).

Sachant le rôle important d'Eomes dans l'acquisition des fonctions cytotoxiques des LT CD8, le rôle d'Eomes dans les LT CD4 cytotoxiques à très vite été adressé. L'expression d'EOMES chez l'homme et dans plusieurs modèles murins est corrélée à une augmentation de la proportion des lymphocytes CD4 exprimant Perforine et Granzyme B *in vivo* et *in vitro* après re-stimulation (Eshima, Chiba et al. 2012 , Tofukuji, Kuwahara et al. 2012, Curran, Geiger et al. 2013, Kitano, Tsuji et al. 2013, Redmond, Linch et al. 2014). Néanmoins, d'autres facteurs de transcription entrent en jeu, comme Runx3 qui, en plus d'Eomes, est impliqué dans la régulation du locus de *Prf1* et *Grzb* dans les lymphocytes T CD8 (Cruz-Guilloty, Pipkin et al. 2009). Ces fonctions cytotoxiques semblent fonctionnelles puisque les LTCD4 Eomes⁺ sont capables de lyser des cibles lorsqu'ils sont activés (Eshima, Chiba et al. 2012). Cependant, cette fonction dans les LT CD4 n'est pas très claire car les Th2 humain qui expriment EOMES n'expriment pas Perforine, et l'inhibition d'EOMES dans les Th1 à l'aide de siRNA n'influe pas la production de Perforine (Serroukh, Gu-Trantien et al. 2018).

Ces différentes études ont mis en évidence qu'Eomes peut être exprimé par des LT de type Th1, Th17, Th2 ou Tr1, ce qui suggèrent qu'EOMES n'est pas associé à un profil de cytokine défini. Par contre, dans toutes ces études, la population T CD4 Eomes⁺ est retrouvée dans des contextes d'inflammation chronique comme dans les maladies auto-immunes, infections chroniques ou des cancers. Cette observation laisse penser que cette population émergerait suite à une exposition constante et prolongée à un antigène ou dans un contexte inflammatoire. En effet, par exemple, lorsque l'on traite des Th9 *in vitro* avec de l'IFN- γ , les Th9 se mettent à exprimer Eomes et produisent de l'IFN- γ (Tofukuji, Kuwahara et al. 2012). Ce mécanisme de stimulation soutenu serait requis pour la différenciation des T CD4 Eomes⁺ ressemble fortement à ce qui est reproduit *in vitro* lorsque l'on stimule des LT CD4 avec de l'anti-CD3. En effet, nos expériences réalisées *in vitro* aussi bien chez la souris que chez l'Homme, montrent que la proportion de LT CD4 exprimant Eomes augmente au cours du temps,

et que si l'on rompt l'interaction du TCR avec son ligand, l'expression d'Eomes décroît (résultat non montré). Cette accumulation de LT CD4 EOMES⁺ au cours du temps peut être expliquée par plusieurs hypothèses. On peut supposer que les LT CD4 ont besoin, pour exprimer EOMES, d'une interaction modérée mais prolongée du TCR avec un complexe CMH-II/peptide (ou de l'anti-CD3 *in vitro*), ce qui va permettre l'expression d'EOMES. Il se pourrait également que cette accumulation de cellules EOMES⁺ soit la résultante d'une prolifération accrue des LT qui expriment Eomes. Enfin, l'accumulation des cellules EOMES⁺ pourrait être due au fait que ces cellules, après activation, se différencient en cellules à longue durée de vie.

Fonction d'Eomes dans les LT CD4

En revanche, nous mettons pour la première fois en évidence un rôle potentiel d'Eomes dans le contrôle du GM-CSF. En effet, différentes observations suggèrent qu'Eomes mais pas T-bet semble requis pour l'expression du GM-CSF. Premièrement, nos résultats montrent que l'expression d'Eomes est plus importante dans les LT CD4 IFN- γ ⁺/GM-CSF⁺ que dans les LT CD4 IFN- γ ⁺/GM-CSF⁻. Deuxièmement, la surexpression d'Eomes dans les LT CD4 Foxo3KO permet de restaurer la proportion des LT CD4 IFN- γ ⁺/GM-CSF⁺ et IFN- γ ⁻/GM-CSF⁺. Enfin les souris déficientes pour Eomes (Eomes^{fl/fl}xCD4Cre) présentent également un défaut de production d'IFN- γ et de GM-CSF, ce qui renforce encore notre hypothèse, et suggère que Foxo3 n'exerce pas un rôle direct dans la régulation de *Csf2* ou alors, que la coopération d'Eomes et Foxo3 est nécessaire pour réguler de manière adéquate son expression. Ces expériences ont également révélé que T-bet n'est pas impliqué car lorsque les LT CD4 sont activés en présence d'anti-IFN- γ , le niveau de T-bet est identique entre les LT CD4 Foxo3WT et Foxo3KO, pourtant, la proportion de cellules produisant du GM-CSF reste inférieure dans les souris Foxo3KO. Cette hypothèse est appuyée par le fait que lorsqu'Eomes est surexprimé dans les LT CD4 Foxo3KO stimulés en présence d'anti-IFN- γ qui inhibe l'expression de T-bet, la proportion de cellules GM-CSF⁺ reste augmentée par rapport aux LT CD4 Foxo3KO infectés par un vecteur contrôle. Ces résultats montrent donc qu'Eomes, mais pas T-bet, participe au contrôle du GM-CSF de façon directe ou indirecte.

Nous avons par lui suite identifié *in silico* plusieurs sites de fixation potentiels de type T-box autour des principales zones d'ADN qui sont conservées entre les différentes espèces, et qui pourraient correspondre à des zones de régulations de *Csf2*. Malheureusement nous n'avons pas pu mettre en évidence une régulation directe d'Eomes sur ces régions, lorsque nous les avons testées dans des expériences de type « gène rapporteur » en association avec le promoteur de *CSF2*. La régulation du locus *Csf2* est très complexe et de nombreuses zones ont été décrites comme pouvant réguler l'expression de *Csf2*. Une équipe a pu mettre en évidence que ROR γ t participerait à la régulation de ce gène car sa surexpression dans les LT CD4 induit une augmentation de la proportion des cellules ROR γ T⁺/GM-CSF⁺. Néanmoins son rôle n'est pas très clair et aucune preuve n'a montré que la régulation du GM-CSF par le FT ROR γ T se faisait par fixation directe au niveau de l'ADN²⁹⁵. Par contre, parmi tous les facteurs de transcription proposés comme régulant l'expression de *Csf2*, on retrouve les protéines de la famille STAT, et plus particulièrement STAT5 et STAT4 (Hartmann, Khademi et al. 2014, Sheng, Yang et al. 2014, McWilliams, Rajbhandari et al. 2015). En effet, plusieurs études ont mis en évidence que STAT5 sous l'influence de l'IL-7 et de l'IL-2, et STAT4 sous l'influence de l'IL-12, permettent d'augmenter la production de GM-CSF par les LT CD4. T-bet ne semblent pas impliqué dans l'expression du GM-CSF car ce FT n'est pas exprimé par les « GM-CSF⁺ Th » différenciés en présence d'IL-7 et d'IL3 (Sheng, Yang et al. 2014).

Les lymphocytes T CD4 expriment des marqueurs d'épuisement mais restent néanmoins fonctionnels.

L'analyse de l'expression d'Eomes au sein du compartiment T CD4 montre qu'Eomes est exprimé par les LT CD4 ayant déjà au moins été activé une fois en périphérie. Chez l'Homme comme chez la souris, Eomes n'est pas exprimé par les LT CD4 naïfs, alors que son expression est détectable à de faibles niveaux dans les LT CD8. Néanmoins, les LT Effecteurs et Effecteurs mémoires gardent ou réacquièrent l'expression d'Eomes après activation. Dans les LT CD8, Eomes est surtout exprimé par les effecteurs comme nous l'avons vu précédemment, mais est également exprimé par les LT CD8 activés de façon chronique (Tex pour « exhausted CD8 T cells ») et

qui sont caractérisés par l'expression de molécules inhibitrices comme PD-1, LAG3, 2B4, CD160 ou encore TIM3 et présentent une forte expression d'Eomes mais pas de T-bet (T-bet^{int}Eomes^{High}) (Doering, Crawford et al. 2012, Paley, Kroy et al. 2012, Hoffmann, Pantazis et al. 2016). Ces cellules exprimant hautement Eomes, produisent de faibles quantités d'IFN- γ et de TNF- α mais sont capables de produire de grandes quantités de molécules cytotoxiques et prolifèrent très rapidement après re-stimulation (Paley, Kroy et al. 2012).

Dans les lymphocytes T CD4, une fraction des LT CD4 Eomes⁺ exprime certains marqueurs d'épuisement mais reste néanmoins capable de produire des cytokines pro-inflammatoires suite à une stimulation *ex vivo*. La même observation peut être faite suite à l'activation de LT CD4 naïfs chez l'Homme, où une stimulation des LT CD4 avec de l'anti-CD3 et de l'anti-CD28 durant 20 jours induit une forte prolifération des LT CD4 qui expriment EOMES, mais n'affecte pas la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN- γ et de TNF- α ou encore le GM-CSF qui restent eux plus fortement exprimés par les LT CD4 EOMES⁺ que par les LT EOMES⁻. L'expression d'EOMES dans les LT CD4 et les LT CD8 semble différente puisque ces LT CD4 EOMES⁺ restent fonctionnels, prolifèrent plus rapidement et sont dotés d'un plus fort potentiel pro-inflammatoire. De plus, dans le sang circulant, EOMES est exprimé par les Th1 et Th1* Centraux mémoires, cette dernière étant une population hybride Th1/Th17 capable de produire de l'IFN- γ et exprimant les facteurs de transcription T-bet et ROR γ T (Becattini, Latorre et al. 2015). Ces résultats sont confortés par le fait que l'expression d'EOMES est plutôt restreinte aux cellules CXCR3⁺CCR6⁺ et qu'EOMES n'est pas ou peu exprimé par les cellules CXCR5⁺ (TFh), CCR4⁺ (Th2), CCR10⁺ (LT CD4 migrant vers la peau).

Il semblerait donc que chez l'Homme comme chez la souris, Eomes permet d'orienter la réponse CD4 vers une réponse immunitaire de type 1, et que dans un contexte d'activation chronique du système immunitaire comme les cancers, l'auto-immunité et dans les maladies inflammatoires chroniques, l'environnement pro-inflammatoire et l'exposition chronique des LT CD4 à leurs antigènes permettent d'induire l'expression d'EOMES. Donc, cette population peut à la fois être bénéfique dans le cadre de cancers ou d'infection chronique, ou délétère dans l'auto-immunité.

EOMES joue des rôles majeurs dans la pathogénicité des lymphocytes T CD4 et la susceptibilité à l'auto-immunité.

De plus en plus d'évidences montrent qu'Eomes joue un rôle important dans la sévérité et le développement des maladies auto-immunes. En effet, nos études *in vivo* montrent que la sévérité de l'Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale (EAE), un modèle murin de Sclérose en Plaques (SEP), est fortement impactée lorsque l'expression d'Eomes est diminuée (cas des souris Foxo3^{-/-}) ou invalidée dans les LT (souris EOMES^{fl/fl}xCD4Cre). On sait que dans l'EAE et la SEP, les Th1 et les Th17 sont les acteurs majeurs dans la pathologie car ils produisent de grandes quantités d'IFN- γ , d'IL-17 et surtout de GM-CSF qui amplifient les réponses immunes dans le CNS (Stromnes, Cerretti et al. 2008 , Codarri, Gyulveszi et al. 2011, Hartmann, Khademi et al. 2014). Grâce à l'utilisation de souris déficientes pour Eomes, une équipe a pu mettre en évidence que les souris Eomes^{fl/fl}xCD4Cre⁺ présentaient une sévérité diminuée de la maladie (Raveney, Oki et al. 2015). Néanmoins dans cette dernière étude, la délétion d'Eomes est présente dans tout le compartiment T, et notamment dans les LT CD8 où Eomes joue un rôle critique. Par contre, les auteurs ont pu montrer de façon élégante que ces LT CD4 Eomes⁺ partageaient des propriétés cytotoxiques telles que l'expression de Granzyme B et sont capables de relâcher lesdites granules car ces cellules expriment le marqueur de dégranulation LAMP-1 (CD107a). La contribution d'Eomes dans l'EAE semble passer par le Granzyme B car l'inhibition de PAR-1 (Protease-activated receptor 1) à l'aide d'injections de SiRNA *in vivo*, induit une diminution des signes cliniques chez la souris dans la phase tardive/chronique de l'EAE.

Chez l'Homme, EOMES est également critique pour le développement de maladies inflammatoires telles que la Sclérose en Plaques, la Polyarthrite Rhumatoïde, et le Psoriasis (Okada, Wu et al. 2014, Raveney, Oki et al. 2015, Sahmatova, Sugis et al. 2017). En effet, plusieurs arguments viennent étayer cette hypothèse. Le premier provient d'études d'association pangénomiques où il a été montré que des polymorphismes d'un seul nucléotide (Single Nucléotide Polymorphisms) à proximité du locus *EOMES* sont retrouvés plus fréquemment chez des patients atteints de maladies inflammatoires (SEP & PR) que chez des patients

contrôles (International Multiple Sclerosis Genetics, Beecham et al. 2013, Okada, Wu et al. 2014).

EOMES est donc un gène de susceptibilité aux maladies auto-immunes et inflammatoires, mais ces études restent purement associatives et il n'y a pas eu à ce jour de preuves concrètes que ces variations génétiques influencent l'expression ou les fonctions d'*EOMES* chez l'Homme. De plus, en analysant l'expression d'*EOMES* dans les PBMC de patients porteurs des deux principaux polymorphismes associés à la SEP, nous n'avons pas pu mettre en évidence un quelconque impact de ces SNP sur le niveau d'expression d'*EOMES* ou les proportions de cellules *EOMES*⁺ dans les compartiments CD4 et CD8. Ces résultats négatifs pourraient être expliqués par le fait que nous ne nous sommes pas placés dans un contexte inflammatoire qui pourrait être propice à l'observation d'un effet sur l'expression d'*EOMES*. Enfin il est possible que nous n'ayons pas analysé le bon type ou la bonne sous-population cellulaire. En effet, nous avons analysé l'expression d'*EOMES* dans les PBMC or nous avons pu mettre en évidence qu'*EOMES* est associé à une plus forte expression de récepteurs aux chimiokines. Il se pourrait donc que la plus grande partie de les CD4 *EOMES*⁺ soient localisés au niveau de tissus et non dans le sang périphérique. Ainsi, on retrouve une grande proportion de LT CD4 *EOMES*⁺ dans le liquide céphalorachidien (LCR) de ces patients atteints de forme sévère de SEP montrant donc que ces cellules sont capables de migrer au niveau du CNS (Raveney, Oki et al. 2015). Ces cellules ont un profil cytotoxique, ce qui indique qu'elles pourraient participer directement aux lésions dans le CNS. Il a en outre été montré qu'un polymorphisme sur le récepteur à l'IL-2 induit une augmentation de la production de GM-CSF par les LT CD4 chez des patients SEP (Hartmann, Khademi et al. 2014). Ces résultats sont intéressants car nous avons montré qu'*EOMES* participe à la production de GM-CSF chez la souris et également que les LT CD4 *EOMES*⁺ produisent plus de GM-CSF que les LT CD4 *EOMES*⁻. Il serait intéressant de tester si le polymorphisme de l'IL-2R modifie la proportion de cellules *EOMES*⁺ chez des patients SEP et chez des donneurs sains, et si ces cellules produisent plus de molécules cytotoxiques après réactivation *in vitro*. On pourrait ainsi imaginer que, dans un contexte inflammatoire, les *loci* associés à l'inflammation sont également permissifs à la transcription dans les LT CD4 et qu'*EOMES*, en association avec d'autres FT, pourrait être capable de se fixer au

niveau de séquences cibles communes afin d'induire la différenciation des LT CD4 en LT hautement pro-inflammatoires.

EOMES confère une survie accrue aux LT.

L'expression d'Eomes dans les LT CD8 est associée au phénotype mémoire et épuisé. Une des caractéristiques des LT mémoires réside dans leur capacité accrue à survivre. Cette caractéristique permet de garder un réservoir de LT spécifiques d'antigènes exogènes, afin de permettre une réponse plus rapide en cas de réinfection. Dans un contexte d'inflammation chronique, on assiste à l'apparition d'une population CD8 Eomes⁺PDI^{High} qui persiste lors de la phase chronique de l'inflammation.

Dans le cadre des LT CD4, nos résultats montrent qu'une stimulation prolongée de ces cellules induit l'accumulation et la prolifération des cellules EOMES⁺. De plus dans le sang circulant, EOMES reste exprimé par les LT CD4 Effecteurs Mémoires ce qui laisse penser qu'EOMES est nécessaire pour le maintien des fonctions effectrices des CD4. *In vitro*, ces cellules semblent extrêmement robustes car, suite à une stimulation prolongée pendant 20 jours, elles continuent de proliférer et produisent des cytokines, alors qu'on observe une grande mortalité cellulaire. De plus, l'analyse de la viabilité par incorporation du colorant de Propidium (PI) ou l'incubation des LT CD4 avec un marqueur de viabilité montre que ces cellules meurent beaucoup moins que les LT CD4 n'exprimant pas EOMES.

Dans les maladies inflammatoires chroniques, qui sont des maladies pouvant durer des années, on assiste à une accumulation de cellules EOMES⁺ qui est associée à un moins bon pronostic de la maladie. Ces résultats laissent penser que dans un contexte d'inflammation chronique, les LT CD4 EOMES⁺ ont une survie accrue ou alors que ces cellules sont générées tout au long de la maladie. Nos résultats préliminaires chez la souris montrent que la survie pourrait être la cause principale de l'accumulation de ces cellules en conditions pathologiques. En effet, l'analyse par « RNA-sequencing » révèle que de nombreux gènes impliqués dans la survie sont dérégulés dans les LT CD4 déficients pour Eomes (résultats non montrés). De façon intéressante, il a été montré que dans certains cancers, notamment le cancer du côlon chez l'Homme, les cellules cancéreuses qui sur-expriment EOMES, ont une capacité

accrue à survivre et sont protégées contre la morte induite par la staurosporine (Wang, Kang et al. 2016). Cette survie accrue des cellules cancéreuses exprimant EOMES est associée à une augmentation du facteur anti-apoptotique BIRC5 (ou Survivin) et à une diminution du facteur anti-apoptotique BMF (Bcl-2 Modifying Factor). Ces résultats sont à mettre en parallèle avec la survie accrue que nous avons observée dans les LT CD4, et pourraient expliquer pourquoi les LT CD4 qui expriment EOMES survivent mieux.

Notre analyse RNA-Sequencing montre également que l'une des voies impactées par la déficience en Eomes est la voie mitochondriale. En effet, les LT CD4 Eomes^{fl/fl}CD4Cre⁺ présentent un défaut de fonctionnement de la mitochondrie, notamment au niveau de la chaîne respiratoire. Or, on sait que des dysfonctionnements mitochondriaux peuvent entraîner l'apoptose des cellules via la libération de médiateurs pro-apoptotiques contenus dans la membrane interne des mitochondries telles que le cytochrome C ou les protéines « Second mitochondria-derived activator of caspase » (Smac) et « Direct Inhibitor of Apoptosis-Binding Protein with low pI » (DIABLO) qui vont induire l'activation des caspases, et ainsi provoquer la mort cellulaire (Parsons and Green 2010).

Pour conclure, nos résultats nous ont permis de mettre en évidence une nouvelle voie de signalisation par laquelle les lymphocytes T CD4 acquièrent leurs propriétés effectrices, et deviennent pathogéniques dans un contexte d'auto-immunité. Nous mettons également en évidence que la stimulation chronique des LT CD4 induit l'apparition d'une population EOMES⁺, qui est hautement pro-inflammatoire et semble jouer des rôles néfastes dans les maladies inflammatoires de par ses grandes capacités à survivre dans ce microenvironnement particulier.

Il reste néanmoins à déterminer si cette population constitue un sous-type particulier de LT CD4 et s'il est possible d'identifier par ChIP-Sequencing une signature moléculaire particulière conférant ces propriétés pro-inflammatoires et ce profil de cellules effectrices à longue durée de vie.

Références

Afkarian, M., J. R. Sedy, J. Yang, N. G. Jacobson, N. Cereb, S. Y. Yang, T. L. Murphy and K. M. Murphy (2002). "T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells." Nat Immunol **3**(6): 549-557.

Ahmed, R. and D. Gray (1996). "Immunological memory and protective immunity: understanding their relation." Science **272**(5258): 54-60.

Alam, S. M. and N. R. Gascoigne (1998). "Posttranslational regulation of TCR Valpha allelic exclusion during T cell differentiation." J Immunol **160**(8): 3883-3890.

Annibali, V., G. Ristori, D. F. Angelini, B. Serafini, R. Mechelli, S. Cannoni, S. Romano, A. Paolillo, H. Abderrahim, A. Diamantini, G. Borsellino, F. Aloisi, L. Battistini and M. Salvetti (2011). "CD161(high)CD8+T cells bear pathogenetic potential in multiple sclerosis." Brain **134**(Pt 2): 542-554.

Avni, O., D. Lee, F. Macian, S. J. Szabo, L. H. Glimcher and A. Rao (2002). "T(H) cell differentiation is accompanied by dynamic changes in histone acetylation of cytokine genes." Nat Immunol **3**(7): 643-651.

Babbe, H., A. Roers, A. Waisman, H. Lassmann, N. Goebels, R. Hohlfeld, M. Friesse, R. Schroder, M. Deckert, S. Schmidt, R. Ravid and K. Rajewsky (2000). "Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction." J Exp Med **192**(3): 393-404.

Bacchetta, R., B. Lucarelli, C. Sartirana, S. Gregori, M. T. Lupo Stanghellini, P. Miqueu, S. Tomiuk, M. Hernandez-Fuentes, M. E. Gianolini, R. Greco, M. Bernardi, E. Zappone, S. Rossini, U. Janssen, A. Ambrosi, M. Salomoni, J. Peccatori, F. Ciceri and M. G. Roncarolo (2014). "Immunological Outcome in Haploidentical-HSC Transplanted Patients Treated with IL-10-Anergized Donor T Cells." Front Immunol **5**: 16.

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**(1): 35-47.

Banerjee, A., S. M. Gordon, A. M. Intlekofer, M. A. Paley, E. C. Mooney, T. Lindsten, E. J. Wherry and S. L. Reiner (2010). "Cutting edge: The transcription factor eomesodermin enables CD8+ T cells to compete for the memory cell niche." J Immunol **185**(9): 4988-4992.

Bar-Or, A., L. Fawaz, B. Fan, P. J. Darlington, A. Rieger, C. Ghorayeb, P. A. Calabresi, E. Waubant, S. L. Hauser, J. Zhang and C. H. Smith (2010). "Abnormal B-cell cytokine responses a trigger of T-cell-mediated disease in MS?" Ann Neurol **67**(4): 452-461.

Baron, A., K. Hafen and H. von Boehmer (1994). "A human CD4 transgene rescues CD4-CD8+ cells in beta 2-microglobulin-deficient mice." Eur J Immunol **24**(8): 1933-1936.

- Barr, T. A., P. Shen, S. Brown, V. Lampropoulou, T. Roch, S. Lawrie, B. Fan, R. A. O'Connor, S. M. Anderton, A. Bar-Or, S. Fillatreau and D. Gray (2012). "B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells." J Exp Med **209**(5): 1001-1010.
- Bassil, R., W. Orent, M. Olah, A. T. Kurdi, M. Frangieh, T. Buttrick, S. J. Khoury and W. Elyaman (2014). "BCL6 controls Th9 cell development by repressing IL9 transcription." J Immunol **193**(1): 198-207.
- Bauquet, A. T., H. Jin, A. M. Paterson, M. Mitsdoerffer, I. C. Ho, A. H. Sharpe and V. K. Kuchroo (2009). "The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and TH-17 cells." Nat Immunol **10**(2): 167-175.
- Becattini, S., D. Latorre, F. Mele, M. Foglierini, C. De Gregorio, A. Cassotta, B. Fernandez, S. Kelderman, T. N. Schumacher, D. Corti, A. Lanzavecchia and F. Sallusto (2015). "T cell immunity. Functional heterogeneity of human memory CD4(+) T cell clones primed by pathogens or vaccines." Science **347**(6220): 400-406.
- Becher, B., B. G. Durell and R. J. Noelle (2002). "Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12." J Clin Invest **110**(4): 493-497.
- Belanger, S. and S. Crotty (2016). "Dances with cytokines, featuring TFH cells, IL-21, IL-4 and B cells." Nat Immunol **17**(10): 1135-1136.
- Bengsch, B., T. Ohtani, O. Khan, M. Setty, S. Manne, S. O'Brien, P. F. Gherardini, R. S. Herati, A. C. Huang, K. M. Chang, E. W. Newell, N. Bovenschen, D. Pe'er, S. M. Albelda and E. J. Wherry (2018). "Epigenomic-Guided Mass Cytometry Profiling Reveals Disease-Specific Features of Exhausted CD8 T Cells." Immunity **48**(5): 1029-1045 e1025.
- Bennett, C. L., M. E. Brunkow, F. Ramsdell, K. C. O'Briant, Q. Zhu, R. L. Fuleihan, A. O. Shigeoka, H. D. Ochs and P. F. Chance (2001). "A rare polyadenylation signal mutation of the FOXP3 gene (AAUAAA-->AAUGAA) leads to the IPEX syndrome." Immunogenetics **53**(6): 435-439.
- Bennett, C. L., J. Christie, F. Ramsdell, M. E. Brunkow, P. J. Ferguson, L. Whitesell, T. E. Kelly, F. T. Saulsbury, P. F. Chance and H. D. Ochs (2001). "The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3." Nat Genet **27**(1): 20-21.
- Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner and V. K. Kuchroo (2006). "Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells." Nature **441**(7090): 235-238.
- Bettelli, E., B. Sullivan, S. J. Szabo, R. A. Sobel, L. H. Glimcher and V. K. Kuchroo (2004). "Loss of T-bet, but not STAT1, prevents the development of experimental autoimmune encephalomyelitis." J Exp Med **200**(1): 79-87.

Beura, L. K., S. Wijeyesinghe, E. A. Thompson, M. G. Macchietto, P. C. Rosato, M. J. Pierson, J. M. Schenkel, J. S. Mitchell, V. Vezys, B. T. Fife, S. Shen and D. Masopust (2018). "T Cells in Nonlymphoid Tissues Give Rise to Lymph-Node-Resident Memory T Cells." Immunity **48**(2): 327-338 e325.

Biggs, W. H., 3rd, J. Meisenhelder, T. Hunter, W. K. Cavenee and K. C. Arden (1999). "Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(13): 7421-7426.

Bloomgren, G., S. Richman, C. Hotermans, M. Subramanyam, S. Goelz, A. Natarajan, S. Lee, T. Plavina, J. V. Scanlon, A. Sandrock and C. Bozic (2012). "Risk of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy." N Engl J Med **366**(20): 1870-1880.

Bonasio, R., M. L. Scimone, P. Schaerli, N. Grabie, A. H. Lichtman and U. H. von Andrian (2006). "Clonal deletion of thymocytes by circulating dendritic cells homing to the thymus." Nat Immunol **7**(10): 1092-1100.

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

Boothby, M. (2009). "The calculus of integrating differentiation: timing control of T-bet." Immunity **30**(5): 666-668.

Borgulya, P., H. Kishi, U. Muller, J. Kirberg and H. von Boehmer (1991). "Development of the CD4 and CD8 lineage of T cells: instruction versus selection." EMBO J **10**(4): 913-918.

Bradley, L. M., D. K. Dalton and M. Croft (1996). "A direct role for IFN-gamma in regulation of Th1 cell development." J Immunol **157**(4): 1350-1358.

Brand, O. J., C. E. Lowe, J. M. Heward, J. A. Franklyn, J. D. Cooper, J. A. Todd and S. C. Gough (2007). "Association of the interleukin-2 receptor alpha (IL-2Ralpha)/CD25 gene region with Graves' disease using a multilocus test and tag SNPs." Clin Endocrinol (Oxf) **66**(4): 508-512.

Brown, D. M., S. Lee, L. Garcia-Hernandez Mde and S. L. Swain (2012). "Multifunctional CD4 cells expressing gamma interferon and perforin mediate protection against lethal influenza virus infection." J Virol **86**(12): 6792-6803.

Brunet, A., A. Bonni, M. J. Zigmond, M. Z. Lin, P. Juo, L. S. Hu, M. J. Anderson, K. C. Arden, J. Blenis and M. E. Greenberg (1999). "Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor." Cell **96**(6): 857-868.

Brunet, A., L. B. Sweeney, J. F. Sturgill, K. F. Chua, P. L. Greer, Y. Lin, H. Tran, S. E. Ross, R. Mostoslavsky, H. Y. Cohen, L. S. Hu, H. L. Cheng, M. P. Jedrychowski, S. P. Gygi, D. A. Sinclair, F. W. Alt and M. E. Greenberg (2004). "Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase." Science **303**(5666): 2011-2015.

Brunkow, M. E., E. W. Jeffery, K. A. Hjerrild, B. Paeper, L. B. Clark, S. A. Yasayko, J. E. Wilkinson, D. Galas, S. F. Ziegler and F. Ramsdell (2001). "Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse." Nat Genet **27**(1): 68-73.

Buggert, M., J. Tauriainen, T. Yamamoto, J. Frederiksen, M. A. Ivarsson, J. Michaelsson, O. Lund, B. Hejdeman, M. Jansson, A. Sonnerborg, R. A. Koup, M. R. Betts and A. C. Karlsson (2014). "T-bet and Eomes are differentially linked to the exhausted phenotype of CD8+ T cells in HIV infection." PLoS Pathog **10**(7): e1004251.

Buttrick, T. S., W. Wang, C. Yung, K. G. Trieu, K. Patel, S. J. Khoury, X. Ai and W. Elyaman (2018). "Foxo1 Promotes Th9 Cell Differentiation and Airway Allergy." Sci Rep **8**(1): 818.

Cabaniols, J. P., N. Fazilleau, A. Casrouge, P. Kourilsky and J. M. Kanellopoulos (2001). "Most alpha/beta T cell receptor diversity is due to terminal deoxynucleotidyl transferase." J Exp Med **194**(9): 1385-1390.

Calnan, D. R. and A. Brunet (2008). "The FoxO code." Oncogene **27**(16): 2276-2288.

Carrieri, P. B., V. Provitera, T. De Rosa, G. Tartaglia, F. Gorga and O. Perrella (1998). "Profile of cerebrospinal fluid and serum cytokines in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a correlation with clinical activity." Immunopharmacol Immunotoxicol **20**(3): 373-382.

Carty, S. A., G. A. Koretzky and M. S. Jordan (2014). "Interleukin-4 regulates eomesodermin in CD8+ T cell development and differentiation." PLoS One **9**(9): e106659.

Chang, H. C., S. Sehra, R. Goswami, W. Yao, Q. Yu, G. L. Stritesky, R. Jabeen, C. McKinley, A. N. Ahyi, L. Han, E. T. Nguyen, M. J. Robertson, N. B. Perumal, R. S. Tepper, S. L. Nutt and M. H. Kaplan (2010). "The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation." Nat Immunol **11**(6): 527-534.

Chang, H. C., S. Zhang, V. T. Thieu, R. B. Slee, H. A. Bruns, R. N. Laribee, M. J. Klemsz and M. H. Kaplan (2005). "PU.1 expression delineates heterogeneity in primary Th2 cells." Immunity **22**(6): 693-703.

Charvet, C., A. J. Canonigo, S. Becart, U. Maurer, A. V. Miletic, W. Swat, M. Deckert and A. Altman (2006). "Vav1 promotes T cell cycle progression by linking TCR/CD28 costimulation to FOXO1 and p27kip1 expression." J Immunol **177**(8): 5024-5031.

Chen, C., E. A. Rowell, R. M. Thomas, W. W. Hancock and A. D. Wells (2006). "Transcriptional regulation by Foxp3 is associated with direct promoter occupancy and modulation of histone acetylation." J Biol Chem **281**(48): 36828-36834.

Chi, T. H., M. Wan, K. Zhao, I. Taniuchi, L. Chen, D. R. Littman and G. R. Crabtree (2002). "Reciprocal regulation of CD4/CD8 expression by SWI/SNF-like BAF complexes." Nature **418**(6894): 195-199.

Ciccia, F., G. Guggino, A. Rizzo, A. Manzo, B. Vitolo, M. P. La Manna, G. Giardina, G. Sireci, F. Dieli, C. M. Montecucco, R. Alessandro and G. Triolo (2015). "Potential involvement of IL-9 and Th9 cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis." Rheumatology (Oxford) **54**(12): 2264-2272.

Ciofani, M., A. Madar, C. Galan, M. Sellars, K. Mace, F. Pauli, A. Agarwal, W. Huang, C. N. Parkhurst, M. Muratet, K. M. Newberry, S. Meadows, A. Greenfield, Y. Yang, P. Jain, F. K. Kirigin, C. Birchmeier, E. F. Wagner, K. M. Murphy, R. M. Myers, R. Bonneau and D. R. Littman (2012). "A validated regulatory network for Th17 cell specification." Cell **151**(2): 289-303.

Ciucci, T., M. S. Vacchio and R. Bosselut (2017). "A STAT3-dependent transcriptional circuitry inhibits cytotoxic gene expression in T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **114**(50): 13236-13241.

Codarri, L., G. Gyulveszi, V. Tosevski, L. Hesske, A. Fontana, L. Magnenat, T. Suter and B. Becher (2011). "RORgammat drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation." Nat Immunol **12**(6): 560-567.

Crotty, S., R. J. Johnston and S. P. Schoenberger (2010). "Effectors and memories: Bcl-6 and Blimp-1 in T and B lymphocyte differentiation." Nat Immunol **11**(2): 114-120.

Cruz-Guilloty, F., M. E. Pipkin, I. M. Djuretic, D. Levanon, J. Lotem, M. G. Lichtenheld, Y. Groner and A. Rao (2009). "Runx3 and T-box proteins cooperate to establish the transcriptional program of effector CTLs." J Exp Med **206**(1): 51-59.

Cui, W., Y. Liu, J. S. Weinstein, J. Craft and S. M. Kaech (2011). "An interleukin-21-interleukin-10-STAT3 pathway is critical for functional maturation of memory CD8+ T cells." Immunity **35**(5): 792-805.

Curran, M. A., T. L. Geiger, W. Montalvo, M. Kim, S. L. Reiner, A. Al-Shamkhani, J. C. Sun and J. P. Allison (2013). "Systemic 4-1BB activation induces a novel T cell phenotype driven by high expression of Eomesodermin." J Exp Med **210**(4): 743-755.

Dabrowska, A., N. Kim and A. Aldovini (2008). "Tat-induced FOXO3a is a key mediator of apoptosis in HIV-1-infected human CD4+ T lymphocytes." J Immunol **181**(12): 8460-8477.

Daitoku, H., M. Hatta, H. Matsuzaki, S. Aratani, T. Ohshima, M. Miyagishi, T. Nakajima and A. Fukamizu (2004). "Silent information regulator 2 potentiates Foxo1-mediated transcription through its deacetylase activity." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(27): 10042-10047.

Dang, E. V., J. Barbi, H. Y. Yang, D. Jinasena, H. Yu, Y. Zheng, Z. Bordman, J. Fu, Y. Kim, H. R. Yen, W. Luo, K. Zeller, L. Shimoda, S. L. Topalian, G. L. Semenza, C. V. Dang, D. M. Pardoll and

F. Pan (2011). "Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1." Cell **146**(5): 772-784.

Dardalhon, V., A. Awasthi, H. Kwon, G. Galileos, W. Gao, R. A. Sobel, M. Mitsdoerffer, T. B. Strom, W. Elyaman, I. C. Ho, S. Khoury, M. Oukka and V. K. Kuchroo (2008). "IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells." Nat Immunol **9**(12): 1347-1355.

Daussy, C., F. Faure, K. Mayol, S. Viel, G. Gasteiger, E. Charrier, J. Bienvenu, T. Henry, E. Debien, U. A. Hasan, J. Marvel, K. Yoh, S. Takahashi, I. Prinz, S. de Bernard, L. Buffat and T. Walzer (2014). "T-bet and Eomes instruct the development of two distinct natural killer cell lineages in the liver and in the bone marrow." J Exp Med **211**(3): 563-577.

Dave, V. P., D. Allman, R. Keefe, R. R. Hardy and D. J. Kappes (1998). "HD mice: a novel mouse mutant with a specific defect in the generation of CD4(+) T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(14): 8187-8192.

Deftos, M. L. and M. J. Bevan (2000). "Notch signaling in T cell development." Curr Opin Immunol **12**(2): 166-172.

Dejean, A. S., D. R. Beisner, I. L. Ch'en, Y. M. Kerdiles, A. Babour, K. C. Arden, D. H. Castrillon, R. A. DePinho and S. M. Hedrick (2009). "Transcription factor Foxo3 controls the magnitude of T cell immune responses by modulating the function of dendritic cells." Nat Immunol **10**(5): 504-513.

Delpoux, A., R. H. Michelini, S. Verma, C. Y. Lai, K. D. Omilusik, D. T. Utzschneider, A. J. Redwood, A. W. Goldrath, C. A. Benedict and S. M. Hedrick (2018). "Continuous activity of Foxo1 is required to prevent anergy and maintain the memory state of CD8(+) T cells." J Exp Med **215**(2): 575-594.

Djuretic, I. M., D. Levanon, V. Negreanu, Y. Groner, A. Rao and K. M. Ansel (2007). "Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Ifng and silence Il4 in T helper type 1 cells." Nat Immunol **8**(2): 145-153.

Doering, T. A., A. Crawford, J. M. Angelosanto, M. A. Paley, C. G. Ziegler and E. J. Wherry (2012). "Network analysis reveals centrally connected genes and pathways involved in CD8+ T cell exhaustion versus memory." Immunity **37**(6): 1130-1144.

Dooms, H., K. Wolslegel, P. Lin and A. K. Abbas (2007). "Interleukin-2 enhances CD4+ T cell memory by promoting the generation of IL-7R alpha-expressing cells." J Exp Med **204**(3): 547-557.

Duda, P. W., M. C. Schmied, S. L. Cook, J. I. Krieger and D. A. Hafler (2000). "Glatiramer acetate (Copaxone) induces degenerate, Th2-polarized immune responses in patients with multiple sclerosis." J Clin Invest **105**(7): 967-976.

Duhen, T., R. Duhen, A. Lanzavecchia, F. Sallusto and D. J. Campbell (2012). "Functionally distinct subsets of human FOXP3⁺ Treg cells that phenotypically mirror effector Th cells." Blood **119**(19): 4430-4440.

Duhen, T., R. Geiger, D. Jarrossay, A. Lanzavecchia and F. Sallusto (2009). "Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells." Nat Immunol **10**(8): 857-863.

Durant, L., W. T. Watford, H. L. Ramos, A. Laurence, G. Vahedi, L. Wei, H. Takahashi, H. W. Sun, Y. Kanno, F. Powrie and J. J. O'Shea (2010). "Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis." Immunity **32**(5): 605-615.

Eijkelenboom, A., M. Mokry, E. de Wit, L. M. Smits, P. E. Polderman, M. H. van Triest, R. van Bortel, A. Schulze, W. de Laat, E. Cuppen and B. M. Burgering (2013). "Genome-wide analysis of FOXO3 mediated transcription regulation through RNA polymerase II profiling." Mol Syst Biol **9**: 638.

Eijkelenboom, A., M. Mokry, L. M. Smits, E. E. Nieuwenhuis and B. M. Burgering (2013). "FOXO3 selectively amplifies enhancer activity to establish target gene regulation." Cell Rep **5**(6): 1664-1678.

Ellmeier, W., M. J. Sunshine, K. Losos, F. Hatam and D. R. Littman (1997). "An enhancer that directs lineage-specific expression of CD8 in positively selected thymocytes and mature T cells." Immunity **7**(4): 537-547.

Ellmeier, W., M. J. Sunshine, K. Losos and D. R. Littman (1998). "Multiple developmental stage-specific enhancers regulate CD8 expression in developing thymocytes and in thymus-independent T cells." Immunity **9**(4): 485-496.

Elo, L. L., H. Jarvenpaa, S. Tuomela, S. Raghav, H. Ahlfors, K. Laurila, B. Gupta, R. J. Lund, J. Tahvanainen, R. D. Hawkins, M. Oresic, H. Lahdesmaki, O. Rasool, K. V. Rao, T. Aittokallio and R. Lahesmaa (2010). "Genome-wide profiling of interleukin-4 and STAT6 transcription factor regulation of human Th2 cell programming." Immunity **32**(6): 852-862.

Endo, Y., C. Iwamura, M. Kuwahara, A. Suzuki, K. Sugaya, D. J. Tumes, K. Tokoyoda, H. Hosokawa, M. Yamashita and T. Nakayama (2011). "Eomesodermin controls interleukin-5 production in memory T helper 2 cells through inhibition of activity of the transcription factor GATA3." Immunity **35**(5): 733-745.

Eshima, K., S. Chiba, H. Suzuki, K. Kokubo, H. Kobayashi, M. Iizuka, K. Iwabuchi and N. Shinohara (2012). "Ectopic expression of a T-box transcription factor, eomesodermin, renders CD4(+) Th cells cytotoxic by activating both perforin- and FasL-pathways." Immunol Lett **144**(1-2): 7-15.

Essig, K., D. Hu, J. C. Guimaraes, D. Alterauge, S. Edelmann, T. Raj, J. Kranich, G. Behrens, A. Heiseke, S. Floess, J. Klein, A. Maiser, S. Marschall, M. Hrabe de Angelis, H. Leonhardt, C. F.

Calkhoven, E. Noessner, T. Bocker, J. Huehn, A. B. Krug, M. Zavolan, D. Baumjohann and V. Heissmeyer (2017). "Roquin Suppresses the PI3K-mTOR Signaling Pathway to Inhibit T Helper Cell Differentiation and Conversion of Treg to Tfr Cells." Immunity **47**(6): 1067-1082 e1012.

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

Fabre, S., F. Carrette, J. Chen, V. Lang, M. Semichon, C. Denoyelle, V. Lazar, N. Cagnard, A. Dubart-Kupperschmitt, M. Mangeney, D. A. Fruman and G. Bismuth (2008). "FOXO1 regulates L-Selectin and a network of human T cell homing molecules downstream of phosphatidylinositol 3-kinase." J Immunol **181**(5): 2980-2989.

Fabre, S., V. Lang, J. Harriague, A. Jobart, T. G. Unterman, A. Trautmann and G. Bismuth (2005). "Stable activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the T cell immunological synapse stimulates Akt signaling to FoxO1 nuclear exclusion and cell growth control." J Immunol **174**(7): 4161-4171.

Feldman, M. W., R. C. Lewontin, I. R. Frankin and R. B. Christiansen (1975). "Selection in complex genetic systems III. An effect of allele multiplicity with two loci." Genetics **79**(2): 333-347.

Ferber, I. A., S. Brocke, C. Taylor-Edwards, W. Ridgway, C. Dinisco, L. Steinman, D. Dalton and C. G. Fathman (1996). "Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)." J Immunol **156**(1): 5-7.

Finnish-German, A. C. (1997). "An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring two PHD-type zinc-finger domains." Nat Genet **17**(4): 399-403.

Gagliani, N., T. Jofra, A. Valle, A. Stabilini, C. Morsiani, S. Gregori, S. Deng, D. M. Rothstein, M. Atkinson, M. Kamanaka, R. A. Flavell, M. G. Roncarolo and M. Battaglia (2013). "Transplant tolerance to pancreatic islets is initiated in the graft and sustained in the spleen." Am J Transplant **13**(8): 1963-1975.

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

Gallegos, A. M. and M. J. Bevan (2004). "Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation." J Exp Med **200**(8): 1039-1049.

Gebhardt, T., P. G. Whitney, A. Zaid, L. K. Mackay, A. G. Brooks, W. R. Heath, F. R. Carbone and S. N. Mueller (2011). "Different patterns of peripheral migration by memory CD4+ and CD8+ T cells." Nature **477**(7363): 216-219.

Gebuhr, T. C., G. I. Kovalev, S. Bultman, V. Godfrey, L. Su and T. Magnuson (2003). "The role of Brg1, a catalytic subunit of mammalian chromatin-remodeling complexes, in T cell development." J Exp Med **198**(12): 1937-1949.

Goldberg, A. D., C. D. Allis and E. Bernstein (2007). "Epigenetics: a landscape takes shape." Cell **128**(4): 635-638.

Gordan, R., A. J. Hartemink and M. L. Bulyk (2009). "Distinguishing direct versus indirect transcription factor-DNA interactions." Genome Res **19**(11): 2090-2100.

Gordon, S. M., J. Chaix, L. J. Rupp, J. Wu, S. Madera, J. C. Sun, T. Lindsten and S. L. Reiner (2012). "The transcription factors T-bet and Eomes control key checkpoints of natural killer cell maturation." Immunity **36**(1): 55-67.

Goswami, R., R. Jabeen, R. Yagi, D. Pham, J. Zhu, S. Goenka and M. H. Kaplan (2012). "STAT6-dependent regulation of Th9 development." J Immunol **188**(3): 968-975.

Grange, M., G. Verdeil, F. Arnoux, A. Griffon, S. Spicuglia, J. Maurizio, M. Buferne, A. M. Schmitt-Verhulst and N. Auphan-Anezin (2013). "Active STAT5 regulates T-bet and eomesodermin expression in CD8 T cells and imprints a T-bet-dependent Tc1 program with repressed IL-6/TGF-beta1 signaling." J Immunol **191**(7): 3712-3724.

Grewal, I. S., J. Xu and R. A. Flavell (1995). "Impairment of antigen-specific T-cell priming in mice lacking CD40 ligand." Nature **378**(6557): 617-620.

Grifka-Walk, H. M., S. J. Lalor and B. M. Segal (2013). "Highly polarized Th17 cells induce EAE via a T-bet independent mechanism." Eur J Immunol **43**(11): 2824-2831.

Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J. E. de Vries and M. G. Roncarolo (1997). "A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis." Nature **389**(6652): 737-742.

Gubbels Bupp, M. R., B. Edwards, C. Guo, D. Wei, G. Chen, B. Wong, E. Masteller and S. L. Peng (2009). "T cells require Foxo1 to populate the peripheral lymphoid organs." Eur J Immunol **39**(11): 2991-2999.

Hadeiba, H. and E. C. Butcher (2013). "Thymus-homing dendritic cells in central tolerance." Eur J Immunol **43**(6): 1425-1429.

Haluszczak, C., A. D. Akue, S. E. Hamilton, L. D. Johnson, L. Pujanauski, L. Teodorovic, S. C. Jameson and R. M. Kedl (2009). "The antigen-specific CD8+ T cell repertoire in unimmunized mice includes memory phenotype cells bearing markers of homeostatic expansion." J Exp Med **206**(2): 435-448.

- Harada, Y., Y. Harada, C. Elly, G. Ying, J. H. Paik, R. A. DePinho and Y. C. Liu (2010). "Transcription factors Foxo3a and Foxo1 couple the E3 ligase Cbl-b to the induction of Foxp3 expression in induced regulatory T cells." J Exp Med **207**(7): 1381-1391.
- Hardardottir, F., J. L. Baron and C. A. Janeway, Jr. (1995). "T cells with two functional antigen-specific receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(2): 354-358.
- Hartmann, F. J., M. Khademi, J. Aram, S. Ammann, I. Kockum, C. Constantinescu, B. Gran, F. Piehl, T. Olsson, L. Codarri and B. Becher (2014). "Multiple sclerosis-associated IL2RA polymorphism controls GM-CSF production in human TH cells." Nat Commun **5**: 5056.
- Hassan, A. H., K. E. Neely and J. L. Workman (2001). "Histone acetyltransferase complexes stabilize swi/snf binding to promoter nucleosomes." Cell **104**(6): 817-827.
- Hatton, R. D., L. E. Harrington, R. J. Luther, T. Wakefield, K. M. Janowski, J. R. Oliver, R. L. Lallone, K. M. Murphy and C. T. Weaver (2006). "A distal conserved sequence element controls Ifng gene expression by T cells and NK cells." Immunity **25**(5): 717-729.
- Hauser, S. L., E. Waubant, D. L. Arnold, T. Vollmer, J. Antel, R. J. Fox, A. Bar-Or, M. Panzara, N. Sarkar, S. Agarwal, A. Langer-Gould, C. H. Smith and H. T. Group (2008). "B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis." N Engl J Med **358**(7): 676-688.
- He, X., X. He, V. P. Dave, Y. Zhang, X. Hua, E. Nicolas, W. Xu, B. A. Roe and D. J. Kappes (2005). "The zinc finger transcription factor Th-POK regulates CD4 versus CD8 T-cell lineage commitment." Nature **433**(7028): 826-833.
- Heath, W. R. and J. F. Miller (1993). "Expression of two alpha chains on the surface of T cells in T cell receptor transgenic mice." J Exp Med **178**(5): 1807-1811.
- Held, K., L. Bhonsle-Deeng, K. Siewert, W. Sato, E. Beltran, S. Schmidt, G. Ruhl, J. K. Ng, P. Engerer, M. Moser, W. E. Klinkert, H. Babbe, T. Misgeld, H. Wekerle, D. A. Laplaud, R. Hohlfeld and K. Dornmair (2015). "alphabeta T-cell receptors from multiple sclerosis brain lesions show MAIT cell-related features." Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm **2**(4): e107.
- Hernandez-Hoyos, G., M. K. Anderson, C. Wang, E. V. Rothenberg and J. Alberola-Ila (2003). "GATA-3 expression is controlled by TCR signals and regulates CD4/CD8 differentiation." Immunity **19**(1): 83-94.
- Hess Michelini, R., A. L. Doedens, A. W. Goldrath and S. M. Hedrick (2013). "Differentiation of CD8 memory T cells depends on Foxo1." J Exp Med **210**(6): 1189-1200.
- Hinterberger, M., M. Aichinger, O. Prazeres da Costa, D. Voehringer, R. Hoffmann and L. Klein (2010). "Autonomous role of medullary thymic epithelial cells in central CD4(+) T cell tolerance." Nat Immunol **11**(6): 512-519.

Hiramatsu, Y., A. Suto, D. Kashiwakuma, H. Kanari, S. Kagami, K. Ikeda, K. Hirose, N. Watanabe, M. J. Grusby, I. Iwamoto and H. Nakajima (2010). "c-Maf activates the promoter and enhancer of the IL-21 gene, and TGF-beta inhibits c-Maf-induced IL-21 production in CD4+ T cells." J Leukoc Biol **87**(4): 703-712.

Hirota, K., J. H. Duarte, M. Veldhoen, E. Hornsby, Y. Li, D. J. Cua, H. Ahlfors, C. Wilhelm, M. Tolaini, U. Menzel, A. Garefalaki, A. J. Potocnik and B. Stockinger (2011). "Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses." Nat Immunol **12**(3): 255-263.

Hoffmann, M., N. Pantazis, G. E. Martin, S. Hickling, J. Hurst, J. Meyerowitz, C. B. Willberg, N. Robinson, H. Brown, M. Fisher, S. Kinloch, A. Babiker, J. Weber, N. Nwokolo, J. Fox, S. Fidler, R. Phillips, J. Frater, Spartac and C. Investigators (2016). "Exhaustion of Activated CD8 T Cells Predicts Disease Progression in Primary HIV-1 Infection." PLoS Pathog **12**(7): e1005661.

Hosken, N. A., K. Shibuya, A. W. Heath, K. M. Murphy and A. O'Garra (1995). "The effect of antigen dose on CD4+ T helper cell phenotype development in a T cell receptor-alpha beta-transgenic model." J Exp Med **182**(5): 1579-1584.

Hsieh, C. S., S. E. Macatonia, C. S. Tripp, S. F. Wolf, A. O'Garra and K. M. Murphy (1993). "Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages." Science **260**(5107): 547-549.

Humblin, E., M. Thibaudin, F. Chalmin, V. Derangere, E. Limagne, C. Richard, R. A. Flavell, S. Chevrier, S. Ladoire, H. Berger, R. Boidot, L. Apetoh, F. Vegran and F. Ghiringhelli (2017). "IRF8-dependent molecular complexes control the Th9 transcriptional program." Nat Commun **8**(1): 2085.

Hussman, J. P., A. H. Beecham, M. Schmidt, E. R. Martin, J. L. McCauley, J. M. Vance, J. L. Haines and M. A. Pericak-Vance (2016). "GWAS analysis implicates NF-kappaB-mediated induction of inflammatory T cells in multiple sclerosis." Genes Immun **17**(5): 305-312.

Hutloff, A., A. M. Dittrich, K. C. Beier, B. Eljaschewitsch, R. Kraft, I. Anagnostopoulos and R. A. Krocze (1999). "ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28." Nature **397**(6716): 263-266.

Hwang, E. S., S. J. Szabo, P. L. Schwartzberg and L. H. Glimcher (2005). "T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3." Science **307**(5708): 430-433.

Ichiyama, K., T. Sekiya, N. Inoue, T. Tamiya, I. Kashiwagi, A. Kimura, R. Morita, G. Muto, T. Shichita, R. Takahashi and A. Yoshimura (2011). "Transcription factor Smad-independent T helper 17 cell induction by transforming-growth factor-beta is mediated by suppression of eomesodermin." Immunity **34**(5): 741-754.

Ifergan, I., H. Kebir, J. I. Alvarez, G. Marceau, M. Bernard, L. Bourbonniere, J. Poirier, P. Duquette, P. J. Talbot, N. Arbour and A. Prat (2011). "Central nervous system recruitment of

effector memory CD8+ T lymphocytes during neuroinflammation is dependent on alpha4 integrin." Brain **134**(Pt 12): 3560-3577.

Ihle, J. N. (1996). "STATs: signal transducers and activators of transcription." Cell **84**(3): 331-334.

International Multiple Sclerosis Genetics, C., A. H. Beecham, N. A. Patsopoulos, D. K. Xifara, M. F. Davis, A. Kempainen, C. Cotsapas, T. S. Shah, C. Spencer, D. Booth, A. Goris, A. Oturai, J. Saarela, B. Fontaine, B. Hemmer, C. Martin, F. Zipp, S. D'Alfonso, F. Martinelli-Boneschi, B. Taylor, H. F. Harbo, I. Kockum, J. Hillert, T. Olsson, M. Ban, J. R. Oksenberg, R. Hintzen, L. F. Barcellos, C. Wellcome Trust Case Control, I. B. D. G. C. International, C. Agliardi, L. Alfredsson, M. Alizadeh, C. Anderson, R. Andrews, H. B. Sondergaard, A. Baker, G. Band, S. E. Baranzini, N. Barizzone, J. Barrett, C. Bellenguez, L. Bergamaschi, L. Bernardinelli, A. Berthele, V. Biberacher, T. M. Binder, H. Blackburn, I. L. Bomfim, P. Brambilla, S. Broadley, B. Brochet, L. Brundin, D. Buck, H. Butzkueven, S. J. Caillier, W. Camu, W. Carpentier, P. Cavalla, E. G. Celius, I. Coman, G. Comi, L. Corrado, L. Cosemans, I. Cournu-Rebeix, B. A. Cree, D. Cusi, V. Damotte, G. Defer, S. R. Delgado, P. Deloukas, A. di Sapio, A. T. Dilthey, P. Donnelly, B. Dubois, M. Duddy, S. Edkins, I. Elovaara, F. Esposito, N. Evangelou, B. Fiddes, J. Field, A. Franke, C. Freeman, I. Y. Frohlich, D. Galimberti, C. Gieger, P. A. Gourraud, C. Graetz, A. Graham, V. Grummel, C. Guaschino, A. Hadjixenofontos, H. Hakonarson, C. Halfpenny, G. Hall, P. Hall, A. Hamsten, J. Harley, T. Harrower, C. Hawkins, G. Hellenthal, C. Hillier, J. Hobart, M. Hoshi, S. E. Hunt, M. Jagodic, I. Jelcic, A. Jochim, B. Kendall, A. Kermode, T. Kilpatrick, K. Koivisto, I. Konidari, T. Korn, H. Kronsbein, C. Langford, M. Larsson, M. Lathrop, C. Lebrun-Frenay, J. Lechner-Scott, M. H. Lee, M. A. Leone, V. Leppa, G. Liberatore, B. A. Lie, C. M. Lill, M. Linden, J. Link, F. Luessi, J. Lycke, F. Macchiardi, S. Mannisto, C. P. Manrique, R. Martin, V. Martinelli, D. Mason, G. Mazibrada, C. McCabe, I. L. Mero, J. Mescheriakova, L. Moutsianas, K. M. Myhr, G. Nagels, R. Nicholas, P. Nilsson, F. Piehl, M. Pirinen, S. E. Price, H. Quach, M. Reunanen, W. Robberecht, N. P. Robertson, M. Rodegher, D. Rog, M. Salvetti, N. C. Schnetz-Boutaud, F. Sellebjerg, R. C. Selter, C. Schaefer, S. Shaunak, L. Shen, S. Shields, V. Siffrin, M. Slee, P. S. Sorensen, M. Sorosina, M. Sospedra, A. Spurkland, A. Strange, E. Sundqvist, V. Thijs, J. Thorpe, A. Ticca, P. Tienari, C. van Duijn, E. M. Visser, S. Vucic, H. Westerlind, J. S. Wiley, A. Wilkins, J. F. Wilson, J. Winkelmann, J. Zajicek, E. Zindler, J. L. Haines, M. A. Pericak-Vance, A. J. Ivinson, G. Stewart, D. Hafler, S. L. Hauser, A. Compston, G. McVean, P. De Jager, S. J. Sawcer and J. L. McCauley (2013). "Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis." Nat Genet **45**(11): 1353-1360.

International Multiple Sclerosis Genetics, C., D. A. Hafler, A. Compston, S. Sawcer, E. S. Lander, M. J. Daly, P. L. De Jager, P. I. de Bakker, S. B. Gabriel, D. B. Mirel, A. J. Ivinson, M. A. Pericak-Vance, S. G. Gregory, J. D. Rioux, J. L. McCauley, J. L. Haines, L. F. Barcellos, B. Cree, J. R. Oksenberg and S. L. Hauser (2007). "Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study." N Engl J Med **357**(9): 851-862.

International Multiple Sclerosis Genetics, C., C. Wellcome Trust Case Control, S. Sawcer, G. Hellenthal, M. Pirinen, C. C. Spencer, N. A. Patsopoulos, L. Moutsianas, A. Dilthey, Z. Su, C. Freeman, S. E. Hunt, S. Edkins, E. Gray, D. R. Booth, S. C. Potter, A. Goris, G. Band, A. B. Oturai, A. Strange, J. Saarela, C. Bellenguez, B. Fontaine, M. Gillman, B. Hemmer, R. Gwilliam, F. Zipp,

A. Jayakumar, R. Martin, S. Leslie, S. Hawkins, E. Giannoulatou, S. D'Alfonso, H. Blackburn, F. Martinelli Boneschi, J. Liddle, H. F. Harbo, M. L. Perez, A. Spurkland, M. J. Waller, M. P. Mycko, M. Ricketts, M. Comabella, N. Hammond, I. Kockum, O. T. McCann, M. Ban, P. Whittaker, A. Kemppinen, P. Weston, C. Hawkins, S. Widaa, J. Zajicek, S. Dronov, N. Robertson, S. J. Bumpstead, L. F. Barcellos, R. Ravindrarajah, R. Abraham, L. Alfredsson, K. Ardlie, C. Aubin, A. Baker, K. Baker, S. E. Baranzini, L. Bergamaschi, R. Bergamaschi, A. Bernstein, A. Berthele, M. Boggild, J. P. Bradfield, D. Brassat, S. A. Broadley, D. Buck, H. Butzkueven, R. Capra, W. M. Carroll, P. Cavalla, E. G. Celius, S. Cepok, R. Chiavacci, F. Clerget-Darpoux, K. Clysters, G. Comi, M. Cossburn, I. Cournu-Rebeix, M. B. Cox, W. Cozen, B. A. Cree, A. H. Cross, D. Cusi, M. J. Daly, E. Davis, P. I. de Bakker, M. Debouverie, B. D'Hooghe M, K. Dixon, R. Dobosi, B. Dubois, D. Ellinghaus, I. Elovaara, F. Esposito, C. Fontenille, S. Foote, A. Franke, D. Galimberti, A. Ghezzi, J. Glessner, R. Gomez, O. Gout, C. Graham, S. F. Grant, F. R. Guerini, H. Hakonarson, P. Hall, A. Hamsten, H. P. Hartung, R. N. Heard, S. Heath, J. Hobart, M. Hoshi, C. Infante-Duarte, G. Ingram, W. Ingram, T. Islam, M. Jagodic, M. Kabesch, A. G. Kermode, T. J. Kilpatrick, C. Kim, N. Klopp, K. Koivisto, M. Larsson, M. Lathrop, J. S. Lechner-Scott, M. A. Leone, V. Leppa, U. Liljedahl, I. L. Bomfim, R. R. Lincoln, J. Link, J. Liu, A. R. Lorentzen, S. Lupoli, F. Macciardi, T. Mack, M. Marriott, V. Martinelli, D. Mason, J. L. McCauley, F. Mentch, I. L. Mero, T. Mihalova, X. Montalban, J. Mottershead, K. M. Myhr, P. Naldi, W. Ollier, A. Page, A. Palotie, J. Pelletier, L. Piccio, T. Pickersgill, F. Piehl, S. Pobywajlo, H. L. Quach, P. P. Ramsay, M. Reunanen, R. Reynolds, J. D. Rioux, M. Rodegher, S. Roesner, J. P. Rubio, I. M. Ruckert, M. Salvetti, E. Salvi, A. Santaniello, C. A. Schaefer, S. Schreiber, C. Schulze, R. J. Scott, F. Sellebjerg, K. W. Selmaj, D. Sexton, L. Shen, B. Simms-Acuna, S. Skidmore, P. M. Sleiman, C. Smestad, P. S. Sorensen, H. B. Sondergaard, J. Stankovich, R. C. Strange, A. M. Sulonen, E. Sundqvist, A. C. Syvanen, F. Taddeo, B. Taylor, J. M. Blackwell, P. Tienari, E. Bramon, A. Tourbah, M. A. Brown, E. Tronczynska, J. P. Casas, N. Tubridy, A. Corvin, J. Vickery, J. Jankowski, P. Villoslada, H. S. Markus, K. Wang, C. G. Mathew, J. Wason, C. N. Palmer, H. E. Wichmann, R. Plomin, E. Willoughby, A. Rautanen, J. Winkelmann, M. Wittig, R. C. Trembath, J. Yaouanq, A. C. Viswanathan, H. Zhang, N. W. Wood, R. Zuvich, P. Deloukas, C. Langford, A. Duncanson, J. R. Oksenberg, M. A. Pericak-Vance, J. L. Haines, T. Olsson, J. Hillert, A. J. Iverson, P. L. De Jager, L. Peltonen, G. J. Stewart, D. A. Hafler, S. L. Hauser, G. McVean, P. Donnelly and A. Compston (2011). "Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis." *Nature* **476**(7359): 214-219.

Intlekofer, A. M., A. Banerjee, N. Takemoto, S. M. Gordon, C. S. Dejong, H. Shin, C. A. Hunter, E. J. Wherry, T. Lindsten and S. L. Reiner (2008). "Anomalous type 17 response to viral infection by CD8+ T cells lacking T-bet and eomesodermin." *Science* **321**(5887): 408-411.

Intlekofer, A. M., N. Takemoto, E. J. Wherry, S. A. Longworth, J. T. Northrup, V. R. Palanivel, A. C. Mullen, C. R. Gasink, S. M. Kaech, J. D. Miller, L. Gapin, K. Ryan, A. P. Russ, T. Lindsten, J. S. Orange, A. W. Goldrath, R. Ahmed and S. L. Reiner (2005). "Effector and memory CD8+ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin." *Nat Immunol* **6**(12): 1236-1244.

Itano, A., D. Kioussis and E. Robey (1994). "Stochastic component to development of class I major histocompatibility complex-specific T cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(1): 220-224.

Itano, A., P. Salmon, D. Kioussis, M. Tolaini, P. Corbella and E. Robey (1996). "The cytoplasmic domain of CD4 promotes the development of CD4 lineage T cells." J Exp Med **183**(3): 731-741.

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

Jacobs, F. M., L. P. van der Heide, P. J. Wijchers, J. P. Burbach, M. F. Hoekman and M. P. Smidt (2003). "FoxO6, a novel member of the FoxO class of transcription factors with distinct shuttling dynamics." J Biol Chem **278**(38): 35959-35967.

Jager, A., V. Dardalhon, R. A. Sobel, E. Bettelli and V. K. Kuchroo (2009). "Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes." J Immunol **183**(11): 7169-7177.

Jenner, R. G., M. J. Townsend, I. Jackson, K. Sun, R. D. Bouwman, R. A. Young, L. H. Glimcher and G. M. Lord (2009). "The transcription factors T-bet and GATA-3 control alternative pathways of T-cell differentiation through a shared set of target genes." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(42): 17876-17881.

Jiang, H., S. I. Zhang and B. Pernis (1992). "Role of CD8+ T cells in murine experimental allergic encephalomyelitis." Science **256**(5060): 1213-1215.

Jordan, M. S., A. Boesteanu, A. J. Reed, A. L. Petrone, A. E. Holenbeck, M. A. Lerman, A. Naji and A. J. Caton (2001). "Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide." Nat Immunol **2**(4): 301-306.

Josefowicz, S. Z., R. E. Niec, H. Y. Kim, P. Treuting, T. Chinen, Y. Zheng, D. T. Umetsu and A. Y. Rudensky (2012). "Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal TH2 inflammation." Nature **482**(7385): 395-399.

Kappos, L., B. Weinshenker, C. Pozzilli, A. J. Thompson, F. Dahlke, K. Beckmann, C. Polman, H. McFarland, C. European Interferon beta-1b in Secondary Progressive Multiple Sclerosis Trial Steering, B. Independent Advisory, C. North American Interferon beta-1b in Secondary Progressive Multiple Sclerosis Trial Steering and B. Independent Advisory (2004). "Interferon beta-1b in secondary progressive MS: a combined analysis of the two trials." Neurology **63**(10): 1779-1787.

Kara, E. E., D. R. McKenzie, C. R. Bastow, C. E. Gregor, K. A. Fenix, A. D. Ogunniyi, J. C. Paton, M. Mack, D. R. Pombal, C. Seillet, B. Dubois, A. Liston, K. P. MacDonald, G. T. Belz, M. J. Smyth, G. R. Hill, I. Comerford and S. R. McColl (2015). "CCR2 defines in vivo development and homing of IL-23-driven GM-CSF-producing Th17 cells." Nat Commun **6**: 8644.

Karwacz, K., E. R. Miraldi, M. Pokrovskii, A. Madi, N. Yosef, I. Wortman, X. Chen, A. Watters, N. Carriero, A. Awasthi, A. Regev, R. Bonneau, D. Littman and V. K. Kuchroo (2017). "Critical

role of IRF1 and BATF in forming chromatin landscape during type 1 regulatory cell differentiation." Nat Immunol **18**(4): 412-421.

Kashii, Y., M. Uchida, K. Kirito, M. Tanaka, K. Nishijima, M. Toshima, T. Ando, K. Koizumi, T. Endoh, K. Sawada, M. Momoi, Y. Miura, K. Ozawa and N. Komatsu (2000). "A member of Forkhead family transcription factor, FKHL1, is one of the downstream molecules of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt activation pathway in erythropoietin signal transduction." Blood **96**(3): 941-949.

Kawahata, K., Y. Misaki, M. Yamauchi, S. Tsunekawa, K. Setoguchi, J. Miyazaki and K. Yamamoto (2002). "Generation of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells from autoreactive T cells simultaneously with their negative selection in the thymus and from nonautoreactive T cells by endogenous TCR expression." J Immunol **168**(9): 4399-4405.

Kebir, H., I. Ifergan, J. I. Alvarez, M. Bernard, J. Poirier, N. Arbour, P. Duquette and A. Prat (2009). "Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis." Ann Neurol **66**(3): 390-402.

Kerdiles, Y. M., D. R. Beisner, R. Tinoco, A. S. Dejean, D. H. Castrillon, R. A. DePinho and S. M. Hedrick (2009). "Foxo1 links homing and survival of naive T cells by regulating L-selectin, CCR7 and interleukin 7 receptor." Nat Immunol **10**(2): 176-184.

Kerdiles, Y. M., E. L. Stone, D. R. Beisner, M. A. McGargill, I. L. Ch'en, C. Stockmann, C. D. Katayama and S. M. Hedrick (2010). "Foxo transcription factors control regulatory T cell development and function." Immunity **33**(6): 890-904.

Kim, M. V., W. Ouyang, W. Liao, M. Q. Zhang and M. O. Li (2013). "The transcription factor Foxo1 controls central-memory CD8+ T cell responses to infection." Immunity **39**(2): 286-297.
Kim, W. W. and G. Siu (1999). "Subclass-specific nuclear localization of a novel CD4 silencer binding factor." J Exp Med **190**(2): 281-291.

Kioussis, D. and W. Ellmeier (2002). "Chromatin and CD4, CD8A and CD8B gene expression during thymic differentiation." Nat Rev Immunol **2**(12): 909-919.

Kitano, S., T. Tsuji, C. Liu, D. Hirschhorn-Cymerman, C. Kyi, Z. Mu, J. P. Allison, S. Gnjatic, J. D. Yuan and J. D. Wolchok (2013). "Enhancement of tumor-reactive cytotoxic CD4+ T cell responses after ipilimumab treatment in four advanced melanoma patients." Cancer Immunol Res **1**(4): 235-244.

Koble, C. and B. Kyewski (2009). "The thymic medulla: a unique microenvironment for intercellular self-antigen transfer." J Exp Med **206**(7): 1505-1513.

Koch, M. A., G. Tucker-Heard, N. R. Perdue, J. R. Killebrew, K. B. Urdahl and D. J. Campbell (2009). "The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation." Nat Immunol **10**(6): 595-602.

Kwon, H., D. Thierry-Mieg, J. Thierry-Mieg, H. P. Kim, J. Oh, C. Tunyaplin, S. Carotta, C. E. Donovan, M. L. Goldman, P. Taylor, K. Ozato, D. E. Levy, S. L. Nutt, K. Calame and W. J. Leonard (2009). "Analysis of interleukin-21-induced Prdm1 gene regulation reveals functional cooperation of STAT3 and IRF4 transcription factors." Immunity **31**(6): 941-952.

Laine, A., B. Martin, M. Luka, L. Mir, C. Auffray, B. Lucas, G. Bismuth and C. Charvet (2015). "Foxo1 Is a T Cell-Intrinsic Inhibitor of the RORgammat-Th17 Program." J Immunol **195**(4): 1791-1803.

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

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

Lazarevic, V., L. H. Glimcher and G. M. Lord (2013). "T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity." Nat Rev Immunol **13**(11): 777-789.

Lee, H. J., N. Takemoto, H. Kurata, Y. Kamogawa, S. Miyatake, A. O'Garra and N. Arai (2000). "GATA-3 induces T helper cell type 2 (Th2) cytokine expression and chromatin remodeling in committed Th1 cells." J Exp Med **192**(1): 105-115.

Lee, J. C., M. Espeli, C. A. Anderson, M. A. Linterman, J. M. Pocock, N. J. Williams, R. Roberts, S. Viatte, B. Fu, N. Peshu, T. T. Hien, N. H. Phu, E. Wesley, C. Edwards, T. Ahmad, J. C. Mansfield, R. Gearry, S. Dunstan, T. N. Williams, A. Barton, C. G. Vinuesa, U. I. G. Consortium, M. Parkes, P. A. Lyons and K. G. Smith (2013). "Human SNP links differential outcomes in inflammatory and infectious disease to a FOXO3-regulated pathway." Cell **155**(1): 57-69.

Lehtinen, M. K., Z. Yuan, P. R. Boag, Y. Yang, J. Villen, E. B. Becker, S. DiBacco, N. de la Iglesia, S. Gygi, T. K. Blackwell and A. Bonni (2006). "A conserved MST-FOXO signaling pathway mediates oxidative-stress responses and extends life span." Cell **125**(5): 987-1001.

Levanon, D., V. Negreanu, J. Lotem, K. R. Bone, O. Brenner, D. Leshkowitz and Y. Groner (2014). "Transcription factor Runx3 regulates interleukin-15-dependent natural killer cell activation." Mol Cell Biol **34**(6): 1158-1169.

Levings, M. K., S. Gregori, E. Tresoldi, S. Cazzaniga, C. Bonini and M. G. Roncarolo (2005). "Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells." Blood **105**(3): 1162-1169.

Li, R., A. Rezk, L. M. Healy, G. Muirhead, A. Prat, J. L. Gommerman, A. Bar-Or and M. C. B. c. i. M. Team (2015). "Cytokine-Defined B Cell Responses as Therapeutic Targets in Multiple Sclerosis." Front Immunol **6**: 626.

Li, R., A. Rezk, Y. Miyazaki, E. Hilgenberg, H. Touil, P. Shen, C. S. Moore, L. Michel, F. Althekair, S. Rajasekharan, J. L. Gommerman, A. Prat, S. Fillatreau, A. Bar-Or and B. C. I. M. S. T. Canadian (2015). "Proinflammatory GM-CSF-producing B cells in multiple sclerosis and B cell depletion therapy." Sci Transl Med **7**(310): 310ra166.

Licona-Limon, P., J. Henao-Mejia, A. U. Temann, N. Gagliani, I. Licona-Limon, H. Ishigame, L. Hao, D. R. Herbert and R. A. Flavell (2013). "Th9 Cells Drive Host Immunity against Gastrointestinal Worm Infection." Immunity **39**(4): 744-757.

Lighvani, A. A., D. M. Frucht, D. Jankovic, H. Yamane, J. Aliberti, B. D. Hissong, B. V. Nguyen, M. Gadina, A. Sher, W. E. Paul and J. J. O'Shea (2001). "T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(26): 15137-15142.

Litvak, V., A. V. Ratushny, A. E. Lampano, F. Schmitz, A. C. Huang, A. Raman, A. G. Rust, A. Bergthaler, J. D. Aitchison and A. Aderem (2012). "A FOXO3-IRF7 gene regulatory circuit limits inflammatory sequelae of antiviral responses." Nature **490**(7420): 421-425.

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

Lord, G. M., R. M. Rao, H. Choe, B. M. Sullivan, A. H. Lichtman, F. W. Luscinskas and L. H. Glimcher (2005). "T-bet is required for optimal proinflammatory CD4⁺ T-cell trafficking." Blood **106**(10): 3432-3439.

Lyons, J. A., M. L. Zhao and R. B. Fritz (1999). "Pathogenesis of acute passive murine encephalomyelitis II. Th1 phenotype of the inducing population is not sufficient to cause disease." J Neuroimmunol **93**(1-2): 26-36.

Mackay, L. K., E. Wynne-Jones, D. Freestone, D. G. Pellicci, L. A. Mielke, D. M. Newman, A. Braun, F. Masson, A. Kallies, G. T. Belz and F. R. Carbone (2015). "T-box Transcription Factors Combine with the Cytokines TGF-beta and IL-15 to Control Tissue-Resident Memory T Cell Fate." Immunity **43**(6): 1101-1111.

Magnani, C. F., G. Alberigo, R. Bacchetta, G. Serafini, M. Andreani, M. G. Roncarolo and S. Gregori (2011). "Killing of myeloid APCs via HLA class I, CD2 and CD226 defines a novel mechanism of suppression by human Tr1 cells." Eur J Immunol **41**(6): 1652-1662.

Malherbe, L., C. Hausl, L. Teyton and M. G. McHeyzer-Williams (2004). "Clonal selection of helper T cells is determined by an affinity threshold with no further skewing of TCR binding properties." Immunity **21**(5): 669-679.

Man, K., S. S. Gabriel, Y. Liao, R. Gloury, S. Preston, D. C. Henstridge, M. Pellegrini, D. Zehn, F. Berberich-Siebelt, M. A. Febbraio, W. Shi and A. Kallies (2017). "Transcription Factor IRF4

Promotes CD8(+) T Cell Exhaustion and Limits the Development of Memory-like T Cells during Chronic Infection." Immunity **47**(6): 1129-1141 e1125.

Martinet, V., S. Tonon, D. Torres, A. Azouz, M. Nguyen, A. Kohler, V. Flamand, C. A. Mao, W. H. Klein, O. Leo and S. Goriely (2015). "Type I interferons regulate eomesodermin expression and the development of unconventional memory CD8(+) T cells." Nat Commun **6**: 7089.

Masliah-Planchon, J., I. Bieche, J. M. Guinebretiere, F. Bourdeaut and O. Delattre (2015). "SWI/SNF chromatin remodeling and human malignancies." Annu Rev Pathol **10**: 145-171.

Massberg, S. and U. H. von Andrian (2006). "Fingolimod and sphingosine-1-phosphate--modifiers of lymphocyte migration." N Engl J Med **355**(11): 1088-1091.

McWilliams, I. L., R. Rajbhandari, S. Nozell, E. Benveniste and L. E. Harrington (2015). "STAT4 controls GM-CSF production by both Th1 and Th17 cells during EAE." J Neuroinflammation **12**: 128.

Miller, S. A., A. C. Huang, M. M. Miazgowicz, M. M. Brassil and A. S. Weinmann (2008). "Coordinated but physically separable interaction with H3K27-demethylase and H3K4-methyltransferase activities are required for T-box protein-mediated activation of developmental gene expression." Genes Dev **22**(21): 2980-2993.

Milner, J. D., N. Fazilleau, M. McHeyzer-Williams and W. Paul (2010). "Cutting edge: lack of high affinity competition for peptide in polyclonal CD4+ responses unmask IL-4 production." J Immunol **184**(12): 6569-6573.

Molnarfi, N., U. Schulze-Topphoff, M. S. Weber, J. C. Patarroyo, T. Prod'homme, M. Varrin-Doyer, A. Shetty, C. Linington, A. J. Slavin, J. Hidalgo, D. E. Jenne, H. Wekerle, R. A. Sobel, C. C. Bernard, M. J. Shlomchik and S. S. Zamvil (2013). "MHC class II-dependent B cell APC function is required for induction of CNS autoimmunity independent of myelin-specific antibodies." J Exp Med **210**(13): 2921-2937.

Mombaerts, P., J. Iacomini, R. S. Johnson, K. Herrup, S. Tonegawa and V. E. Papaioannou (1992). "RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes." Cell **68**(5): 869-877.

Mosmann, T. R., H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin and R. L. Coffman (1986). "Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins." J Immunol **136**(7): 2348-2357.

Motta, M. C., N. Divecha, M. Lemieux, C. Kamel, D. Chen, W. Gu, Y. Bultsma, M. McBurney and L. Guarente (2004). "Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors." Cell **116**(4): 551-563.

Nagamine, K., P. Peterson, H. S. Scott, J. Kudoh, S. Minoshima, M. Heino, K. J. Krohn, M. D. Lalioti, P. E. Mullis, S. E. Antonarakis, K. Kawasaki, S. Asakawa, F. Ito and N. Shimizu (1997). "Positional cloning of the APECED gene." Nat Genet **17**(4): 393-398.

Naito, T., H. Tanaka, Y. Naoe and I. Taniuchi (2011). "Transcriptional control of T-cell development." Int Immunol **23**(11): 661-668.

Nakazato, K., H. Yamada, T. Yajima, Y. Kagimoto, H. Kuwano and Y. Yoshikai (2007). "Enforced expression of Bcl-2 partially restores cell numbers but not functions of TCRgammadelta intestinal intraepithelial T lymphocytes in IL-15-deficient mice." J Immunol **178**(2): 757-764.

Neumann, H., I. M. Medana, J. Bauer and H. Lassmann (2002). "Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases." Trends Neurosci **25**(6): 313-319.

Nicol, B., M. Salou, I. Vogel, A. Garcia, E. Dugast, J. Morille, S. Kilens, E. Charpentier, A. Donnart, S. Nedellec, M. Jacq-Foucher, F. Le Frere, S. Wiertlewski, A. Bourreille, S. Brouard, L. Michel, L. David, P. A. Gourraud, N. Degauque, A. B. Nicot, L. Berthelot and D. A. Laplaud (2017). "An intermediate level of CD161 expression defines a novel activated, inflammatory, and pathogenic subset of CD8(+) T cells involved in multiple sclerosis." J Autoimmun.

Nicol, B., M. Salou, I. Vogel, A. Garcia, E. Dugast, J. Morille, S. Kilens, E. Charpentier, A. Donnart, S. Nedellec, M. Jacq-Foucher, F. Le Frere, S. Wiertlewski, A. Bourreille, S. Brouard, L. Michel, L. David, P. A. Gourraud, N. Degauque, A. B. Nicot, L. Berthelot and D. A. Laplaud (2018). "An intermediate level of CD161 expression defines a novel activated, inflammatory, and pathogenic subset of CD8(+) T cells involved in multiple sclerosis." J Autoimmun **88**: 61-74.

Noster, R., R. Riedel, M. F. Mashreghi, H. Radbruch, L. Harms, C. Haftmann, H. D. Chang, A. Radbruch and C. E. Zielinski (2014). "IL-17 and GM-CSF expression are antagonistically regulated by human T helper cells." Sci Transl Med **6**(241): 241ra280.

Nurieva, R. I., Y. Chung, D. Hwang, X. O. Yang, H. S. Kang, L. Ma, Y. H. Wang, S. S. Watowich, A. M. Jetten, Q. Tian and C. Dong (2008). "Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages." Immunity **29**(1): 138-149.

Nurieva, R. I., Y. Chung, G. J. Martinez, X. O. Yang, S. Tanaka, T. D. Matskevitch, Y. H. Wang and C. Dong (2009). "Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells." Science **325**(5943): 1001-1005.

O'Connor, R. A., H. Cambrook, K. Huettner and S. M. Anderton (2013). "T-bet is essential for Th1-mediated, but not Th17-mediated, CNS autoimmune disease." Eur J Immunol **43**(11): 2818-2823.

O'Shea, J. J., R. Lahesmaa, G. Vahedi, A. Laurence and Y. Kanno (2011). "Genomic views of STAT function in CD4+ T helper cell differentiation." Nat Rev Immunol **11**(4): 239-250.

Obsilova, V., J. Vecer, P. Herman, A. Pabianova, M. Sulc, J. Teisinger, E. Boura and T. Obsil (2005). "14-3-3 Protein interacts with nuclear localization sequence of forkhead transcription factor FoxO4." Biochemistry **44**(34): 11608-11617.

Oestreich, K. J., A. C. Huang and A. S. Weinmann (2011). "The lineage-defining factors T-bet and Bcl-6 collaborate to regulate Th1 gene expression patterns." *J Exp Med* **208**(5): 1001-1013.

Oestreich, K. J., S. E. Mohn and A. S. Weinmann (2012). "Molecular mechanisms that control the expression and activity of Bcl-6 in TH1 cells to regulate flexibility with a TFH-like gene profile." *Nat Immunol* **13**(4): 405-411.

Ohkura, N., M. Hamaguchi, H. Morikawa, K. Sugimura, A. Tanaka, Y. Ito, M. Osaki, Y. Tanaka, R. Yamashita, N. Nakano, J. Huehn, H. J. Fehling, T. Sparwasser, K. Nakai and S. Sakaguchi (2012). "T cell receptor stimulation-induced epigenetic changes and Foxp3 expression are independent and complementary events required for Treg cell development." *Immunity* **37**(5): 785-799.

Okada, Y., D. Wu, G. Trynka, T. Raj, C. Terao, K. Ikari, Y. Kochi, K. Ohmura, A. Suzuki, S. Yoshida, R. R. Graham, A. Manoharan, W. Ortmann, T. Bhangale, J. C. Denny, R. J. Carroll, A. E. Eyler, J. D. Greenberg, J. M. Kremer, D. A. Pappas, L. Jiang, J. Yin, L. Ye, D. F. Su, J. Yang, G. Xie, E. Keystone, H. J. Westra, T. Esko, A. Metspalu, X. Zhou, N. Gupta, D. Mirel, E. A. Stahl, D. Diogo, J. Cui, K. Liao, M. H. Guo, K. Myouzen, T. Kawaguchi, M. J. Coenen, P. L. van Riel, M. A. van de Laar, H. J. Guchelaar, T. W. Huizinga, P. Dieude, X. Mariette, S. L. Bridges, Jr., A. Zhernakova, R. E. Toes, P. P. Tak, C. Miceli-Richard, S. Y. Bang, H. S. Lee, J. Martin, M. A. Gonzalez-Gay, L. Rodriguez-Rodriguez, S. Rantapaa-Dahlqvist, L. Arlestig, H. K. Choi, Y. Kamatani, P. Galan, M. Lathrop, R. consortium, G. consortium, S. Eyre, J. Bowes, A. Barton, N. de Vries, L. W. Moreland, L. A. Criswell, E. W. Karlson, A. Taniguchi, R. Yamada, M. Kubo, J. S. Liu, S. C. Bae, J. Worthington, L. Padyukov, L. Klareskog, P. K. Gregersen, S. Raychaudhuri, B. E. Stranger, P. L. De Jager, L. Franke, P. M. Visscher, M. A. Brown, H. Yamanaka, T. Mimori, A. Takahashi, H. Xu, T. W. Behrens, K. A. Siminovitch, S. Momohara, F. Matsuda, K. Yamamoto and R. M. Plenge (2014). "Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery." *Nature* **506**(7488): 376-381.

Olagnier, D., A. Sze, S. Bel Hadj, C. Chiang, C. Steel, X. Han, J. P. Routy, R. Lin, J. Hiscott and J. van Grevenynghe (2014). "HTLV-1 Tax-mediated inhibition of FOXO3a activity is critical for the persistence of terminally differentiated CD4+ T cells." *PLoS Pathog* **10**(12): e1004575.

Oppmann, B., R. Lesley, B. Blom, J. C. Timans, Y. Xu, B. Hunte, F. Vega, N. Yu, J. Wang, K. Singh, F. Zonin, E. Vaisberg, T. Churakova, M. Liu, D. Gorman, J. Wagner, S. Zurawski, Y. Liu, J. S. Abrams, K. W. Moore, D. Rennick, R. de Waal-Malefyt, C. Hannum, J. F. Bazan and R. A. Kastelein (2000). "Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12." *Immunity* **13**(5): 715-725.

Ouyang, W., O. Beckett, R. A. Flavell and M. O. Li (2009). "An essential role of the Forkhead-box transcription factor Foxo1 in control of T cell homeostasis and tolerance." *Immunity* **30**(3): 358-371.

Ouyang, W., O. Beckett, Q. Ma, J. H. Paik, R. A. DePinho and M. O. Li (2010). "Foxo proteins cooperatively control the differentiation of Foxp3+ regulatory T cells." *Nat Immunol* **11**(7): 618-627.

Ouyang, W., W. Liao, C. T. Luo, N. Yin, M. Huse, M. V. Kim, M. Peng, P. Chan, Q. Ma, Y. Mo, D. Meijer, K. Zhao, A. Y. Rudensky, G. Atwal, M. Q. Zhang and M. O. Li (2012). "Novel Foxo1-dependent transcriptional programs control T(reg) cell function." Nature **491**(7425): 554-559.

Ouyang, W., M. Lohning, Z. Gao, M. Assenmacher, S. Ranganath, A. Radbruch and K. M. Murphy (2000). "Stat6-independent GATA-3 autoactivation directs IL-4-independent Th2 development and commitment." Immunity **12**(1): 27-37.

Padovan, E., G. Casorati, P. Dellabona, S. Meyer, M. Brockhaus and A. Lanzavecchia (1993). "Expression of two T cell receptor alpha chains: dual receptor T cells." Science **262**(5132): 422-424.

Pagan, A. J., M. Pepper, H. H. Chu, J. M. Green and M. K. Jenkins (2012). "CD28 promotes CD4+ T cell clonal expansion during infection independently of its YMNM and PYAP motifs." J Immunol **189**(6): 2909-2917.

Pai, S. Y., M. L. Truitt, C. N. Ting, J. M. Leiden, L. H. Glimcher and I. C. Ho (2003). "Critical roles for transcription factor GATA-3 in thymocyte development." Immunity **19**(6): 863-875.

Paley, M. A., D. C. Kroy, P. M. Odorizzi, J. B. Johnnidis, D. V. Dolfi, B. E. Barnett, E. K. Bikoff, E. J. Robertson, G. M. Lauer, S. L. Reiner and E. J. Wherry (2012). "Progenitor and terminal subsets of CD8+ T cells cooperate to contain chronic viral infection." Science **338**(6111): 1220-1225.

Paley, M. A. and E. J. Wherry (2010). "TCF-1 flips the switch on Eomes." Immunity **33**(2): 145-147.

Pan, F., J. Barbi and D. M. Pardoll (2012). "Hypoxia-inducible factor 1: A link between metabolism and T cell differentiation and a potential therapeutic target." Oncoimmunology **1**(4): 510-515.

Pan, F., H. Yu, E. V. Dang, J. Barbi, X. Pan, J. F. Grosso, D. Jinasena, S. M. Sharma, E. M. McCadden, D. Getnet, C. G. Drake, J. O. Liu, M. C. Ostrowski and D. M. Pardoll (2009). "Eos mediates Foxp3-dependent gene silencing in CD4+ regulatory T cells." Science **325**(5944): 1142-1146.

Pang, N., F. Zhang, S. Li, Y. Zhu, C. Zhang, M. An, H. Wang, W. Mamuti, J. Ding and H. Fan (2018). "TGF-beta/Smad signaling pathway positively up-regulates the differentiation of Interleukin-9-producing CD4(+) T cells in human Echinococcus granulosus infection." J Infect.

Papaioannou, V. E. (2014). "The T-box gene family: emerging roles in development, stem cells and cancer." Development **141**(20): 3819-3833.

Pappu, R., S. R. Schwab, I. Cornelissen, J. P. Pereira, J. B. Regard, Y. Xu, E. Camerer, Y. W. Zheng, Y. Huang, J. G. Cyster and S. R. Coughlin (2007). "Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate." Science **316**(5822): 295-298.

Park, H., Z. Li, X. O. Yang, S. H. Chang, R. Nurieva, Y. H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu, Q. Tian and C. Dong (2005). "A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17." Nat Immunol **6**(11): 1133-1141.

Parsons, M. J. and D. R. Green (2010). "Mitochondria in cell death." Essays Biochem **47**: 99-114.

Patsopoulos, N. A., M. S. G. W. G. Bayer Pharma, I.-b. Steering Committees of Studies Evaluating, C. C. R. A. a, A. N. Consortium, GeneMsa, C. International Multiple Sclerosis Genetics, F. Esposito, J. Reischl, S. Lehr, D. Bauer, J. Heubach, R. Sandbrink, C. Pohl, G. Edan, L. Kappos, D. Miller, J. Montalban, C. H. Polman, M. S. Freedman, H. P. Hartung, B. G. Arnason, G. Comi, S. Cook, M. Filippi, D. S. Goodin, D. Jeffery, P. O'Connor, G. C. Ebers, D. Langdon, A. T. Reder, A. Traboulsee, F. Zipp, S. Schimrigk, J. Hillert, M. Bahlo, D. R. Booth, S. Broadley, M. A. Brown, B. L. Browning, S. R. Browning, H. Butzkueven, W. M. Carroll, C. Chapman, S. J. Foote, L. Griffiths, A. G. Kermode, T. J. Kilpatrick, J. Lechner-Scott, M. Marriott, D. Mason, P. Moscato, R. N. Heard, M. P. Pender, V. M. Perreau, D. Perera, J. P. Rubio, R. J. Scott, M. Slee, J. Stankovich, G. J. Stewart, B. V. Taylor, N. Tubridy, E. Willoughby, J. Wiley, P. Matthews, F. M. Boneschi, A. Compston, J. Haines, S. L. Hauser, J. McCauley, A. Ivinson, J. R. Oksenberg, M. Pericak-Vance, S. J. Sawcer, P. L. De Jager, D. A. Hafler and P. I. de Bakker (2011). "Genome-wide meta-analysis identifies novel multiple sclerosis susceptibility loci." Ann Neurol **70**(6): 897-912.

Pearce, E. L., A. C. Mullen, G. A. Martins, C. M. Krawczyk, A. S. Hutchins, V. P. Zediak, M. Banica, C. B. DiCioccio, D. A. Gross, C. A. Mao, H. Shen, N. Cereb, S. Y. Yang, T. Lindsten, J. Rossant, C. A. Hunter and S. L. Reiner (2003). "Control of effector CD8+ T cell function by the transcription factor Eomesodermin." Science **302**(5647): 1041-1043.

Pierson, E. R. and J. M. Goverman (2017). "GM-CSF is not essential for experimental autoimmune encephalomyelitis but promotes brain-targeted disease." JCI Insight **2**(7): e92362.

Pierson, E. R., C. A. Wagner and J. M. Goverman (2018). "The contribution of neutrophils to CNS autoimmunity." Clin Immunol **189**: 23-28.

Pikovskaya, O., J. Chaix, N. J. Rothman, A. Collins, Y. H. Chen, A. M. Scipioni, E. Vivier and S. L. Reiner (2016). "Cutting Edge: Eomesodermin Is Sufficient To Direct Type 1 Innate Lymphocyte Development into the Conventional NK Lineage." J Immunol **196**(4): 1449-1454.

Pipkin, M. E., J. A. Sacks, F. Cruz-Guilloty, M. G. Lichtenheld, M. J. Bevan and A. Rao (2010). "Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells." Immunity **32**(1): 79-90.

Plank, M. W., G. E. Kaiko, S. Maltby, J. Weaver, H. L. Tay, W. Shen, M. S. Wilson, S. K. Durum and P. S. Foster (2017). "Th22 Cells Form a Distinct Th Lineage from Th17 Cells In Vitro with Unique Transcriptional Properties and Tbet-Dependent Th1 Plasticity." J Immunol **198**(5): 2182-2190.

Prince, A. L., Z. Kraus, S. A. Carty, C. Ng, C. C. Yin, M. S. Jordan, P. L. Schwartzberg and L. J. Berg (2014). "Development of innate CD4+ and CD8+ T cells in Itk-deficient mice is regulated by distinct pathways." J Immunol **193**(2): 688-699.

Pui, J. C., D. Allman, L. Xu, S. DeRocco, F. G. Karnell, S. Bakkour, J. Y. Lee, T. Kadesch, R. R. Hardy, J. C. Aster and W. S. Pear (1999). "Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination." Immunity **11**(3): 299-308.

Purton, J. F., J. T. Tan, M. P. Rubinstein, D. M. Kim, J. Sprent and C. D. Surh (2007). "Antiviral CD4+ memory T cells are IL-15 dependent." J Exp Med **204**(4): 951-961.

Purwar, R., C. Schlapbach, S. Xiao, H. S. Kang, W. Elyaman, X. Jiang, A. M. Jetten, S. J. Khoury, R. C. Fuhlbrigge, V. K. Kuchroo, R. A. Clark and T. S. Kupper (2012). "Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin-9-producing T cells." Nat Med **18**(8): 1248-1253.

Quezada, S. A., T. R. Simpson, K. S. Peggs, T. Merghoub, J. Vider, X. Fan, R. Blasberg, H. Yagita, P. Muranski, P. A. Antony, N. P. Restifo and J. P. Allison (2010). "Tumor-reactive CD4(+) T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts." J Exp Med **207**(3): 637-650.

Qui, H. Z., A. T. Hagymasi, S. Bandyopadhyay, M. C. St Rose, R. Ramanarasimhaiah, A. Menoret, R. S. Mittler, S. M. Gordon, S. L. Reiner, A. T. Vella and A. J. Adler (2011). "CD134 plus CD137 dual costimulation induces Eomesodermin in CD4 T cells to program cytotoxic Th1 differentiation." J Immunol **187**(7): 3555-3564.

Rangachari, M. and V. K. Kuchroo (2013). "Using EAE to better understand principles of immune function and autoimmune pathology." J Autoimmun **45**: 31-39.

Ranganath, S. and K. M. Murphy (2001). "Structure and specificity of GATA proteins in Th2 development." Mol Cell Biol **21**(8): 2716-2725.

Rao, R. R., Q. Li, M. R. Gubbels Bupp and P. A. Shrikant (2012). "Transcription factor Foxo1 represses T-bet-mediated effector functions and promotes memory CD8(+) T cell differentiation." Immunity **36**(3): 374-387.

Rao, R. R., Q. Li, K. Odunsi and P. A. Shrikant (2010). "The mTOR kinase determines effector versus memory CD8+ T cell fate by regulating the expression of transcription factors T-bet and Eomesodermin." Immunity **32**(1): 67-78.

Rao, R. R., Q. Li and P. A. Shrikant (2010). "Fine-tuning CD8(+) T cell functional responses: mTOR acts as a rheostat for regulating CD8(+) T cell proliferation, survival and differentiation?" Cell Cycle **9**(15): 2996-3001.

Raveney, B. J., S. Oki, H. Hohjoh, M. Nakamura, W. Sato, M. Murata and T. Yamamura (2015). "Eomesodermin-expressing T-helper cells are essential for chronic neuroinflammation." Nat Commun **6**: 8437.

Ravindran, R., J. Foley, T. Stoklasek, L. H. Glimcher and S. J. McSorley (2005). "Expression of T-bet by CD4 T cells is essential for resistance to Salmonella infection." J Immunol **175**(7): 4603-4610.

Redmond, W. L., S. N. Linch and M. J. Kasiewicz (2014). "Combined targeting of costimulatory (OX40) and coinhibitory (CTLA-4) pathways elicits potent effector T cells capable of driving robust antitumor immunity." Cancer Immunol Res **2**(2): 142-153.

Rena, G., Y. L. Woods, A. R. Prescott, M. Pegg, T. G. Unterman, M. R. Williams and P. Cohen (2002). "Two novel phosphorylation sites on FKHR that are critical for its nuclear exclusion." EMBO J **21**(9): 2263-2271.

Renkema, K. R., J. Y. Lee, Y. J. Lee, S. E. Hamilton, K. A. Hogquist and S. C. Jameson (2016). "IL-4 sensitivity shapes the peripheral CD8+ T cell pool and response to infection." J Exp Med **213**(7): 1319-1329.

Rinner, O., L. N. Mueller, M. Hubalek, M. Muller, M. Gstaiger and R. Aebersold (2007). "An integrated mass spectrometric and computational framework for the analysis of protein interaction networks." Nat Biotechnol **25**(3): 345-352.

Robbins, S. H., M. S. Tessmer, L. Van Kaer and L. Brossay (2005). "Direct effects of T-bet and MHC class I expression, but not STAT1, on peripheral NK cell maturation." Eur J Immunol **35**(3): 757-765.

Robey, E., D. Chang, A. Itano, D. Cado, H. Alexander, D. Lans, G. Weinmaster and P. Salmon (1996). "An activated form of Notch influences the choice between CD4 and CD8 T cell lineages." Cell **87**(3): 483-492.

Robey, E. A., B. J. Fowlkes, J. W. Gordon, D. Kioussis, H. von Boehmer, F. Ramsdell and R. Axel (1991). "Thymic selection in CD8 transgenic mice supports an instructive model for commitment to a CD4 or CD8 lineage." Cell **64**(1): 99-107.

Rougerie, P., Q. Largeau, L. Megrelis, F. Carrette, T. Lejeune, L. Toffali, B. Rossi, M. Zeghouf, J. Cherfils, G. Constantin, C. Laudanna, G. Bismuth, M. Mangeney and J. Delon (2013). "Fam65b is a new transcriptional target of FOXO1 that regulates RhoA signaling for T lymphocyte migration." J Immunol **190**(2): 748-755.

- Ruan, Q., V. Kameswaran, Y. Tone, L. Li, H. C. Liou, M. I. Greene, M. Tone and Y. H. Chen (2009). "Development of Foxp3(+) regulatory t cells is driven by the c-Rel enhanceosome." Immunity **31**(6): 932-940.
- Rudra, D., P. deRoos, A. Chaudhry, R. E. Niec, A. Arvey, R. M. Samstein, C. Leslie, S. A. Shaffer, D. R. Goodlett and A. Y. Rudensky (2012). "Transcription factor Foxp3 and its protein partners form a complex regulatory network." Nat Immunol **13**(10): 1010-1019.
- Russ, A. P., S. Wattler, W. H. Colledge, S. A. Aparicio, M. B. Carlton, J. J. Pearce, S. C. Barton, M. A. Surani, K. Ryan, M. C. Nehls, V. Wilson and M. J. Evans (2000). "Eomesodermin is required for mouse trophoblast development and mesoderm formation." Nature **404**(6773): 95-99.
- Sadovnick, A. D., G. C. Ebers, D. A. Dymment and N. J. Risch (1996). "Evidence for genetic basis of multiple sclerosis. The Canadian Collaborative Study Group." Lancet **347**(9017): 1728-1730.
- Sahmatova, L., E. Sugis, M. Sunina, H. Hermann, E. Prans, M. Pihlap, K. Abram, A. Rebane, H. Peterson, P. Peterson, K. Kingo and K. Kisand (2017). "Signs of innate immune activation and premature immunosenescence in psoriasis patients." Sci Rep **7**(1): 7553.
- Sahoo, A., A. Alekseev, K. Tanaka, L. Obertas, B. Lerman, C. Haymaker, K. Clise-Dwyer, J. S. McMurray and R. Nurieva (2015). "Batf is important for IL-4 expression in T follicular helper cells." Nat Commun **6**: 7997.
- Sallusto, F., D. Lenig, R. Forster, M. Lipp and A. Lanzavecchia (1999). "Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions." Nature **401**(6754): 708-712.
- Sato, T., S. Ohno, T. Hayashi, C. Sato, K. Kohu, M. Satake and S. Habu (2005). "Dual functions of Runx proteins for reactivating CD8 and silencing CD4 at the commitment process into CD8 thymocytes." Immunity **22**(3): 317-328.
- Sawada, S. and D. R. Littman (1991). "Identification and characterization of a T-cell-specific enhancer adjacent to the murine CD4 gene." Mol Cell Biol **11**(11): 5506-5515.
- Schmetterer, K. G., A. Neunkirchner, D. Wojta-Stremayr, J. Leitner, P. Steinberger and W. F. Pickl (2015). "STAT3 governs hyporesponsiveness and granzyme B-dependent suppressive capacity in human CD4+ T cells." FASEB J **29**(3): 759-771.
- Schmitt, E., T. Germann, S. Goedert, P. Hoehn, C. Huels, S. Koelsch, R. Kuhn, W. Muller, N. Palm and E. Rude (1994). "IL-9 production of naive CD4+ 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 **153**(9): 3989-3996.

Schneider, R., A. N. Mohebiany, I. Ifergan, D. Beauseigle, P. Duquette, A. Prat and N. Arbour (2011). "B cell-derived IL-15 enhances CD8 T cell cytotoxicity and is increased in multiple sclerosis patients." J Immunol **187**(8): 4119-4128.

Schulz, E. G., L. Mariani, A. Radbruch and T. Hofer (2009). "Sequential polarization and imprinting of type 1 T helper lymphocytes by interferon-gamma and interleukin-12." Immunity **30**(5): 673-683.

Schwartz, R., I. Engel, M. Fallahi-Sichani, H. T. Petrie and C. Murre (2006). "Gene expression patterns define novel roles for E47 in cell cycle progression, cytokine-mediated signaling, and T lineage development." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(26): 9976-9981.

Seong, R. H., J. W. Chamberlain and J. R. Parnes (1992). "Signal for T-cell differentiation to a CD4 cell lineage is delivered by CD4 transmembrane region and/or cytoplasmic tail." Nature **356**(6371): 718-720.

Serafini, N., C. A. Vosshenrich and J. P. Di Santo (2015). "Transcriptional regulation of innate lymphoid cell fate." Nat Rev Immunol **15**(7): 415-428.

Serroukh, Y., C. Gu-Trantien, B. Hooshier Kashani, M. Defrance, T. P. Vu Manh, A. Azouz, A. Detavernier, A. Hoyois, J. Das, M. Bizet, E. Pollet, T. Tabbuso, E. Calonne, K. van Gisbergen, M. Dalod, F. Fuks, S. Goriely and A. Marchant (2018). "The transcription factors Runx3 and ThPOK cross-regulate acquisition of cytotoxic function by human Th1 lymphocytes." Elife **7**.

Sheng, W., F. Yang, Y. Zhou, H. Yang, P. Y. Low, D. M. Kemeny, P. Tan, A. Moh, M. H. Kaplan, Y. Zhang and X. Y. Fu (2014). "STAT5 programs a distinct subset of GM-CSF-producing T helper cells that is essential for autoimmune neuroinflammation." Cell Res **24**(12): 1387-1402.

Shinkai, Y., G. Rathbun, K. P. Lam, E. M. Oltz, V. Stewart, M. Mendelsohn, J. Charron, M. Datta, F. Young, A. M. Stall and et al. (1992). "RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement." Cell **68**(5): 855-867.

Siu, G., A. L. Wurster, D. D. Duncan, T. M. Soliman and S. M. Hedrick (1994). "A transcriptional silencer controls the developmental expression of the CD4 gene." EMBO J **13**(15): 3570-3579.

Soroosh, P., S. Ine, K. Sugamura and N. Ishii (2006). "OX40-OX40 ligand interaction through T cell-T cell contact contributes to CD4 T cell longevity." J Immunol **176**(10): 5975-5987.

Stahl, M., P. F. Dijkers, G. J. Kops, S. M. Lens, P. J. Coffey, B. M. Burgering and R. H. Medema (2002). "The forkhead transcription factor FoxO regulates transcription of p27Kip1 and Bim in response to IL-2." J Immunol **168**(10): 5024-5031.

Staudt, V., E. Bothur, M. Klein, K. Lingnau, S. Reuter, N. Grebe, B. Gerlitzki, M. Hoffmann, A. Ulges, C. Taube, N. Dehzad, M. Becker, M. Stassen, A. Steinborn, M. Lohoff, H. Schild, E. Schmitt and T. Bopp (2010). "Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells." Immunity **33**(2): 192-202.

Stienne, C., M. F. Michieletto, M. Benamar, N. Carrie, I. Bernard, X. H. Nguyen, Y. Lippi, F. Duguet, R. S. Liblau, S. M. Hedrick, A. Saoudi and A. S. Dejean (2016). "Foxo3 Transcription Factor Drives Pathogenic T Helper 1 Differentiation by Inducing the Expression of Eomes." Immunity **45**(4): 774-787.

Stone, E. L., M. Pepper, C. D. Katayama, Y. M. Kerdiles, C. Y. Lai, E. Emslie, Y. C. Lin, E. Yang, A. W. Goldrath, M. O. Li, D. A. Cantrell and S. M. Hedrick (2015). "ICOS coreceptor signaling inactivates the transcription factor FOXO1 to promote Tfh cell differentiation." Immunity **42**(2): 239-251.

Stromnes, I. M., L. M. Cerretti, D. Liggitt, R. A. Harris and J. M. Goverman (2008). "Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells." Nat Med **14**(3): 337-342.

Stumhofer, J. S., J. S. Silver, A. Laurence, P. M. Porrett, T. H. Harris, L. A. Turka, M. Ernst, C. J. Saris, J. J. O'Shea and C. A. Hunter (2007). "Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10." Nat Immunol **8**(12): 1363-1371.

Sullivan, J. A., E. H. Kim, E. H. Plisch, S. L. Peng and M. Suresh (2012). "FOXO3 regulates CD8 T cell memory by T cell-intrinsic mechanisms." PLoS Pathog **8**(2): e1002533.

Sullivan, J. A., E. H. Kim, E. H. Plisch and M. Suresh (2012). "FOXO3 regulates the CD8 T cell response to a chronic viral infection." J Virol **86**(17): 9025-9034.

Suto, A., A. L. Wurster, S. L. Reiner and M. J. Grusby (2006). "IL-21 inhibits IFN-gamma production in developing Th1 cells through the repression of Eomesodermin expression." J Immunol **177**(6): 3721-3727.

Szabo, S. J., S. T. Kim, G. L. Costa, X. Zhang, C. G. Fathman and L. H. Glimcher (2000). "A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment." Cell **100**(6): 655-669.

Takaba, H., Y. Morishita, Y. Tomofuji, L. Danks, T. Nitta, N. Komatsu, T. Kodama and H. Takayanagi (2015). "Fezf2 Orchestrates a Thymic Program of Self-Antigen Expression for Immune Tolerance." Cell **163**(4): 975-987.

Takemoto, N., A. M. Intlekofer, J. T. Northrup, E. J. Wherry and S. L. Reiner (2006). "Cutting Edge: IL-12 inversely regulates T-bet and eomesodermin expression during pathogen-induced CD8+ T cell differentiation." J Immunol **177**(11): 7515-7519.

Takeuchi, A. and T. Saito (2017). "CD4 CTL, a Cytotoxic Subset of CD4(+) T Cells, Their Differentiation and Function." Front Immunol **8**: 194.

Tamiya, T., K. Ichiyama, H. Kotani, T. Fukaya, T. Sekiya, T. Shichita, K. Honma, K. Yui, T. Matsuyama, T. Nakao, S. Fukuyama, H. Inoue, M. Nomura and A. Yoshimura (2013). "Smad2/3 and IRF4 play a cooperative role in IL-9-producing T cell induction." J Immunol **191**(5): 2360-2371.

- Tan, T. G., D. Mathis and C. Benoist (2016). "Singular role for T-BET+CXCR3+ regulatory T cells in protection from autoimmune diabetes." Proc Natl Acad Sci U S A **113**(49): 14103-14108.
- Taniuchi, I., M. Osato, T. Egawa, M. J. Sunshine, S. C. Bae, T. Komori, Y. Ito and D. R. Littman (2002). "Differential requirements for Runx proteins in CD4 repression and epigenetic silencing during T lymphocyte development." Cell **111**(5): 621-633.
- Tarakhovsky, A. (2010). "Tools and landscapes of epigenetics." Nat Immunol **11**(7): 565-568.
- Taverna, S. D., H. Li, A. J. Ruthenburg, C. D. Allis and D. J. Patel (2007). "How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers." Nat Struct Mol Biol **14**(11): 1025-1040.
- Tejera, M. M., E. H. Kim, J. A. Sullivan, E. H. Plisch and M. Suresh (2013). "FoxO1 controls effector-to-memory transition and maintenance of functional CD8 T cell memory." J Immunol **191**(1): 187-199.
- Thieu, V. T., Q. Yu, H. C. Chang, N. Yeh, E. T. Nguyen, S. Sehra and M. H. Kaplan (2008). "Signal transducer and activator of transcription 4 is required for the transcription factor T-bet to promote T helper 1 cell-fate determination." Immunity **29**(5): 679-690.
- Tissenbaum, H. A. and L. Guarente (2001). "Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*." Nature **410**(6825): 227-230.
- Tofukuji, S., M. Kuwahara, J. Suzuki, O. Ohara, T. Nakayama and M. Yamashita (2012). "Identification of a new pathway for Th1 cell development induced by cooperative stimulation with IL-4 and TGF-beta." J Immunol **188**(10): 4846-4857.
- Townsend, M. J., A. S. Weinmann, J. L. Matsuda, R. Salomon, P. J. Farnham, C. A. Biron, L. Gapin and L. H. Glimcher (2004). "T-bet regulates the terminal maturation and homeostasis of NK and Valpha14i NKT cells." Immunity **20**(4): 477-494.
- Treiner, E. and R. S. Liblau (2015). "Mucosal-Associated Invariant T Cells in Multiple Sclerosis: The Jury is Still Out." Front Immunol **6**: 503.
- Trifari, S., C. D. Kaplan, E. H. Tran, N. K. Crellin and H. Spits (2009). "Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells." Nat Immunol **10**(8): 864-871.
- Turner, D. L., K. L. Bickham, J. J. Thome, C. Y. Kim, F. D'Ovidio, E. J. Wherry and D. L. Farber (2014). "Lung niches for the generation and maintenance of tissue-resident memory T cells." Mucosal Immunol **7**(3): 501-510.
- Ugur, M., O. Schulz, M. B. Menon, A. Krueger and O. Pabst (2014). "Resident CD4+ T cells accumulate in lymphoid organs after prolonged antigen exposure." Nat Commun **5**: 4821.

Usui, T., R. Nishikomori, A. Kitani and W. Strober (2003). "GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12Rbeta2 chain or T-bet." Immunity **18**(3): 415-428.

Utzschneider, D. T., A. Delpoux, D. Wieland, X. Huang, C. Y. Lai, M. Hofmann, R. Thimme and S. M. Hedrick (2018). "Active Maintenance of T Cell Memory in Acute and Chronic Viral Infection Depends on Continuous Expression of FOXO1." Cell Rep **22**(13): 3454-3467.

van der Vos, K. E. and P. J. Coffey (2008). "FOXO-binding partners: it takes two to tango." Oncogene **27**(16): 2289-2299.

van Panhuys, N., F. Klauschen and R. N. Germain (2014). "T-cell-receptor-dependent signal intensity dominantly controls CD4(+) T cell polarization In Vivo." Immunity **41**(1): 63-74.

Vasanthakumar, A. and A. Kallies (2013). "IL-27 paves different roads to Tr1." Eur J Immunol **43**(4): 882-885.

Vianello, F., P. Kraft, Y. T. Mok, W. K. Hart, N. White and M. C. Poznansky (2005). "A CXCR4-dependent chemorepellent signal contributes to the emigration of mature single-positive CD4 cells from the fetal thymus." J Immunol **175**(8): 5115-5125.

Viel, S., A. Marcais, F. S. Guimaraes, R. Loftus, J. Rabilloud, M. Grau, S. Degouve, S. Djebali, A. Sanlaville, E. Charrier, J. Bienvenu, J. C. Marie, C. Caux, J. Marvel, L. Town, N. D. Huntington, L. Bartholin, D. Finlay, M. J. Smyth and T. Walzer (2016). "TGF-beta inhibits the activation and functions of NK cells by repressing the mTOR pathway." Sci Signal **9**(415): ra19.

Villarino, A. V., E. Gallo and A. K. Abbas (2010). "STAT1-activating cytokines limit Th17 responses through both T-bet-dependent and -independent mechanisms." J Immunol **185**(11): 6461-6471.

Wang, A., D. Pan, Y. H. Lee, G. J. Martinez, X. H. Feng and C. Dong (2013). "Cutting edge: Smad2 and Smad4 regulate TGF-beta-mediated Il9 gene expression via EZH2 displacement." J Immunol **191**(10): 4908-4912.

Wang, H., H. Flach, M. Onizawa, L. Wei, M. T. McManus and A. Weiss (2014). "Negative regulation of Hif1a expression and TH17 differentiation by the hypoxia-regulated microRNA miR-210." Nat Immunol **15**(4): 393-401.

Wang, L. and R. Bosselut (2009). "CD4-CD8 lineage differentiation: Thpok-ing into the nucleus." J Immunol **183**(5): 2903-2910.

Wang, L., K. F. Wildt, J. Zhu, X. Zhang, L. Feigenbaum, L. Tessarollo, W. E. Paul, B. J. Fowlkes and R. Bosselut (2008). "Distinct functions for the transcription factors GATA-3 and ThPOK during intrathymic differentiation of CD4(+) T cells." Nat Immunol **9**(10): 1122-1130.

Wang, R., Y. Kang, C. V. Lohr, K. A. Fischer, C. S. Bradford, G. Johnson, W. M. Dashwood, D. E. Williams, E. Ho and R. H. Dashwood (2016). "Reciprocal regulation of BMF and BIRC5 (Survivin) linked to Eomes overexpression in colorectal cancer." Cancer Lett **381**(2): 341-348.

Wang, W., J. Cote, Y. Xue, S. Zhou, P. A. Khavari, S. R. Biggar, C. Muchardt, G. V. Kalpana, S. P. Goff, M. Yaniv, J. L. Workman and G. R. Crabtree (1996). "Purification and biochemical heterogeneity of the mammalian SWI-SNF complex." EMBO J **15**(19): 5370-5382.

Wang, W., Y. Xue, S. Zhou, A. Kuo, B. R. Cairns and G. R. Crabtree (1996). "Diversity and specialization of mammalian SWI/SNF complexes." Genes Dev **10**(17): 2117-2130.

Wang, Y., M. A. Su and Y. Y. Wan (2011). "An essential role of the transcription factor GATA-3 for the function of regulatory T cells." Immunity **35**(3): 337-348.

Weber, K. S., Q. J. Li, S. P. Persaud, J. D. Campbell, M. M. Davis and P. M. Allen (2012). "Distinct CD4+ helper T cells involved in primary and secondary responses to infection." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(24): 9511-9516.

Wei, G., B. J. Abraham, R. Yagi, R. Jothi, K. Cui, S. Sharma, L. Narlikar, D. L. Northrup, Q. Tang, W. E. Paul, J. Zhu and K. Zhao (2011). "Genome-wide analyses of transcription factor GATA3-mediated gene regulation in distinct T cell types." Immunity **35**(2): 299-311.

Wei, G., L. Wei, J. Zhu, C. Zang, J. Hu-Li, Z. Yao, K. Cui, Y. Kanno, T. Y. Roh, W. T. Watford, D. E. Schones, W. Peng, H. W. Sun, W. E. Paul, J. J. O'Shea and K. Zhao (2009). "Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4+ T cells." Immunity **30**(1): 155-167.

Wei, L., G. Vahedi, H. W. Sun, W. T. Watford, H. Takatori, H. L. Ramos, H. Takahashi, J. Liang, G. Gutierrez-Cruz, C. Zang, W. Peng, J. J. O'Shea and Y. Kanno (2010). "Discrete roles of STAT4 and STAT6 transcription factors in tuning epigenetic modifications and transcription during T helper cell differentiation." Immunity **32**(6): 840-851.

Weinreich, M. A., O. A. Odumade, S. C. Jameson and K. A. Hogquist (2010). "T cells expressing the transcription factor PLZF regulate the development of memory-like CD8+ T cells." Nat Immunol **11**(8): 709-716.

Weinstock-Guttman, B., M. Ramanathan and R. Zivadinov (2008). "Interferon-beta treatment for relapsing multiple sclerosis." Expert Opin Biol Ther **8**(9): 1435-1447.

White, J. T., E. W. Cross, M. A. Burchill, T. Danhorn, M. D. McCarter, H. R. Rosen, B. O'Connor and R. M. Kedl (2016). "Virtual memory T cells develop and mediate bystander protective immunity in an IL-15-dependent manner." Nat Commun **7**: 11291.

White, J. T., E. W. Cross and R. M. Kedl (2017). "Antigen-inexperienced memory CD8(+) T cells: where they come from and why we need them." Nat Rev Immunol **17**(6): 391-400.

Willer, C. J., D. A. Dymont, N. J. Risch, A. D. Sadovnick, G. C. Ebers and G. Canadian Collaborative Study (2003). "Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(22): 12877-12882.

Wohlfert, E. A., J. R. Grainger, N. Bouladoux, J. E. Konkel, G. Oldenhove, C. H. Ribeiro, J. A. Hall, R. Yagi, S. Naik, R. Bhairavabhotla, W. E. Paul, R. Bosselut, G. Wei, K. Zhao, M. Oukka, J. Zhu and Y. Belkaid (2011). "GATA3 controls Foxp3(+) regulatory T cell fate during inflammation in mice." J Clin Invest **121**(11): 4503-4515.

Wojciechowski, J., A. Lai, M. Kondo and Y. Zhuang (2007). "E2A and HEB are required to block thymocyte proliferation prior to pre-TCR expression." J Immunol **178**(9): 5717-5726.

Woolf, E., C. Xiao, O. Fainaru, J. Lotem, D. Rosen, V. Negreanu, Y. Bernstein, D. Goldenberg, O. Brenner, G. Berke, D. Levanon and Y. Groner (2003). "Runx3 and Runx1 are required for CD8 T cell development during thymopoiesis." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(13): 7731-7736.

Wu, C., N. Yosef, T. Thalhamer, C. Zhu, S. Xiao, Y. Kishi, A. Regev and V. K. Kuchroo (2013). "Induction of pathogenic TH17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1." Nature **496**(7446): 513-517.

Xiao, N., D. Eto, C. Elly, G. Peng, S. Crotty and Y. C. Liu (2014). "The E3 ubiquitin ligase Itch is required for the differentiation of follicular helper T cells." Nat Immunol **15**(7): 657-666.

Xie, M. M., T. Amet, H. Liu, Q. Yu and A. L. Dent (2017). "AMP kinase promotes Bcl6 expression in both mouse and human T cells." Mol Immunol **81**: 67-75.

Xie, M. M., B. H. Koh, K. Hollister, H. Wu, J. Sun, M. H. Kaplan and A. L. Dent (2017). "Bcl6 promotes follicular helper T-cell differentiation and PD-1 expression in a Blimp1-independent manner in mice." Eur J Immunol **47**(7): 1136-1141.

Xie, Q., Y. Hao, L. Tao, S. Peng, C. Rao, H. Chen, H. You, M. Q. Dong and Z. Yuan (2012). "Lysine methylation of FOXO3 regulates oxidative stress-induced neuronal cell death." EMBO Rep **13**(4): 371-377.

Yagi, R., I. S. Junntila, G. Wei, J. F. Urban, Jr., K. Zhao, W. E. Paul and J. Zhu (2010). "The transcription factor GATA3 actively represses RUNX3 protein-regulated production of interferon-gamma." Immunity **32**(4): 507-517.

Yagi, R., J. Zhu and W. E. Paul (2011). "An updated view on transcription factor GATA3-mediated regulation of Th1 and Th2 cell differentiation." Int Immunol **23**(7): 415-420.

Yamagata, K., H. Daitoku, Y. Takahashi, K. Namiki, K. Hisatake, K. Kako, H. Mukai, Y. Kasuya and A. Fukamizu (2008). "Arginine methylation of FOXO transcription factors inhibits their phosphorylation by Akt." Mol Cell **32**(2): 221-231.

Yang, L., Y. Yu, M. Kalwani, T. W. Tseng and D. Baltimore (2011). "Homeostatic cytokines orchestrate the segregation of CD4 and CD8 memory T-cell reservoirs in mice." Blood **118**(11): 3039-3050.

Yang, Y., J. Xu, Y. Niu, J. S. Bromberg and Y. Ding (2008). "T-bet and eomesodermin play critical roles in directing T cell differentiation to Th1 versus Th17." J Immunol **181**(12): 8700-8710.

You, H., M. Pellegrini, K. Tsuchihara, K. Yamamoto, G. Hacker, M. Erlacher, A. Villunger and T. W. Mak (2006). "FOXO3a-dependent regulation of Puma in response to cytokine/growth factor withdrawal." J Exp Med **203**(7): 1657-1663.

Yousry, T. A., E. O. Major, C. Ryschkewitsch, G. Fahle, S. Fischer, J. Hou, B. Curfman, K. Miszkil, N. Mueller-Lenke, E. Sanchez, F. Barkhof, E. W. Radue, H. R. Jager and D. B. Clifford (2006). "Evaluation of patients treated with natalizumab for progressive multifocal leukoencephalopathy." N Engl J Med **354**(9): 924-933.

Yu, Q., B. Erman, A. Bhandoola, S. O. Sharrow and A. Singer (2003). "In vitro evidence that cytokine receptor signals are required for differentiation of double positive thymocytes into functionally mature CD8+ T cells." J Exp Med **197**(4): 475-487.

Yucel, R., H. Karsunky, L. Klein-Hitpass and T. Moroy (2003). "The transcriptional repressor Gfi1 affects development of early, uncommitted c-Kit+ T cell progenitors and CD4/CD8 lineage decision in the thymus." J Exp Med **197**(7): 831-844.

Zaret, K. S. and J. S. Carroll (2011). "Pioneer transcription factors: establishing competence for gene expression." Genes Dev **25**(21): 2227-2241.

Zhang, P., J. S. Lee, K. H. Gartlan, I. S. Schuster, I. Comerford, A. Varelias, M. A. Ullah, S. Vuckovic, M. Koyama, R. D. Kuns, K. R. Locke, K. J. Beckett, S. D. Olver, L. D. Samson, M. Montes de Oca, F. de Labastida Rivera, A. D. Clouston, G. T. Belz, B. R. Blazar, K. P. MacDonald, S. R. McColl, R. Thomas, C. R. Engwerda, M. A. Degli-Esposti, A. Kallies, S. K. Tey and G. R. Hill (2017). "Eomesodermin promotes the development of type 1 regulatory T (TR1) cells." Sci Immunol **2**(10).

Zhang, Q., H. Y. Wang, M. Marzec, P. N. Raghunath, T. Nagasawa and M. A. Wasik (2005). "STAT3- and DNA methyltransferase 1-mediated epigenetic silencing of SHP-1 tyrosine phosphatase tumor suppressor gene in malignant T lymphocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(19): 6948-6953.

Zhang, X., L. Li, J. Choe, S. Krajewski, J. C. Reed, C. Thompson and Y. S. Choi (1996). "Up-regulation of Bcl-xL expression protects CD40-activated human B cells from Fas-mediated apoptosis." Cell Immunol **173**(1): 149-154.

Zhao, K., W. Wang, O. J. Rando, Y. Xue, K. Swiderek, A. Kuo and G. R. Crabtree (1998). "Rapid and phosphoinositide-dependent binding of the SWI/SNF-like BAF complex to chromatin after T lymphocyte receptor signaling." Cell **95**(5): 625-636.

Zheng, W. and R. A. Flavell (1997). "The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells." Cell **89**(4): 587-596.

Zheng, Y., S. Z. Josefowicz, A. Kas, T. T. Chu, M. A. Gavin and A. Y. Rudensky (2007). "Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells." Nature **445**(7130): 936-940.

Zhou, X., S. Yu, D. M. Zhao, J. T. Harty, V. P. Badovinac and H. H. Xue (2010). "Differentiation and persistence of memory CD8(+) T cells depend on T cell factor 1." Immunity **33**(2): 229-240.

Zhu, J., D. Jankovic, A. J. Oler, G. Wei, S. Sharma, G. Hu, L. Guo, R. Yagi, H. Yamane, G. Punkosdy, L. Feigenbaum, K. Zhao and W. E. Paul (2012). "The transcription factor T-bet is induced by multiple pathways and prevents an endogenous Th2 cell program during Th1 cell responses." Immunity **37**(4): 660-673.

Zhu, Y., S. Ju, E. Chen, S. Dai, C. Li, P. Morel, L. Liu, X. Zhang and B. Lu (2010). "T-bet and eomesodermin are required for T cell-mediated antitumor immune responses." J Immunol **185**(6): 3174-3183.