

# Thèse de Doctorat

Lucile DRUJONT

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
grade de Docteur de l'Université de Nantes  
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : *Biologie-Santé*

Discipline : *Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie*

Spécialité : *Biologie des organismes*

Unité de recherche : *ITUN UMR\_S1064*

Soutenue le : *20/05/2016*

Thèse N° : *10*

## Étude de nouveaux acteurs de l'immunité de type 17 à travers l'exploration du rôle des canaux ioniques TMEM176A et B dans les cellules ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>

### JURY

Rapporteurs : **Eliane PIAGGIO**, DR2 Inserm, U932 Institut Curie, UPMC Paris  
**Susan CHAN**, DR1 Inserm, IGBMC d'Illkirch, Université de Strasbourg

Examineurs : **Yves DELNESTE**, DR2 Inserm, CRCNA, Université d'Angers  
**Rachel GOLUB**, professeur Université Paris Diderot, Paris 7, U668 Institut Pasteur

Directeur de Thèse : **Maria Cristina CUTURI**, DR2 Inserm, U1064, Université de Nantes

Co-directeur de Thèse : **Cédric LOUVET**, U1064, Université de Nantes

*« La plus belle chose que nous puissions éprouver, c'est le côté mystérieux de la vie.  
C'est le sentiment profond qui se trouve au berceau de l'art et de la science véritable. »*

*Albert Einstein – Comment je vois le monde – 1934*

# REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord le Dr Eliane Piaggio et le Dr Susan Chan d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse. Un grand merci pour votre patience sans laquelle je n'aurais pas réussi à finaliser mon mémoire.

Je tiens à remercier mes deux directeurs de thèse, le Dr Maria-Cristina Cuturi et le Dr Cédric Louvet, pour avoir cru en moi tout au long de ma thèse et m'avoir encouragée quand j'en avais besoin. Merci Cristina d'avoir pris l'initiative de me proposer un stage de Master 2 dans ton équipe et de m'avoir soutenue par la suite en thèse. Un merci particulier à Cédric, sans lequel ni ce projet, ni moi-même n'en serions là. Merci pour tout le temps que tu as passé à me former, pour les longues heures de réunions/discussions, pour ta patience, pour ta faculté d'écoute hors norme et ta bienveillance constante. Je te souhaite le meilleur pour l'avenir et j'espère que le projet parviendra à prendre l'ampleur qu'il mérite. Et évidemment merci à toi et à Géraldine pour les bons plans Californiens, c'était parfait.

Je remercie Aurélie Lemoine qui a rejoint notre équipe en 2014 et qui a très vite réussi à se rendre indispensable. Merci Aurélie pour ton professionnalisme et ton enthousiasme constant. Je pense que tu es bien la seule personne que je connaisse qui apprécie avec autant de bonne humeur un prélèvement d'intestin de bon matin. Avant tout merci pour ta gentillesse, ta générosité, et pour le travail immense que tu as effectué à l'animalerie au cours de ces deux dernières années. J'espère que tu seras heureuse en Alsace avec ton amoureux et dans ton nouveau laboratoire avec tes petites drosophiles : moins mignonnes que nos souris mais sûrement moins allergènes aussi...

Merci à Mélanie Lancien et à Géraldine Bienvenu-Louvet qui ont rejoint notre petit groupe plus tardivement mais qui nous ont énormément apporté. Merci Géraldine pour l'aide immense que tu m'as apporté pour les expériences de phénotypage des souris DKO. Merci aussi pour les petits gâteaux et les carrés de chocolat que je t'ai volé.

Je remercie tous les membres de l'équipe 1 en particulier Laurence Delbos pour sa gentillesse et son aide précieuse avec les cytomètres aussi bien le Canto que l'Aria. J'ai parfois eu l'impression que je libérais de mauvaises ondes mais tu as toujours été là en cas de soucis. Merci aussi à Gaëlle Bériou ça a été un plaisir d'épiler et de passer de la crème à des souris en ta compagnie.

Merci aux membres du bureau originel : Thomas, Julien et Coraline (qui n'était pas officiellement dans notre bureau mais qui y a tout de même passé beaucoup de temps). C'était vraiment sympa, on a passé de bons moments dans et en dehors du labo, je garderai plein de beaux souvenirs de vous.

Merci à ma toute ma famille pour votre soutien, votre gentillesse et pour l'amour que vous m'avez porté depuis aussi loin que je m'en souviens. Je remercie particulièrement ma mère et mon père, vous avez toujours eu aveuglément confiance en moi et vous m'avez toujours soutenue de manière indéfectible et pour cela je ne vous remercierai jamais assez. Merci maman pour les petits plats et les petites attentions qui m'accompagnent depuis toujours. Merci papa pour ton aide technique et pour ta présence quand j'en ai eu le plus besoin. Je remercie aussi mes petits frères, Yann et Erwann qui ne sont plus si petits maintenant et qui savent bien me le rappeler... Merci aussi à ma mamie Armande pour ses talents de cuisinière et pour m'avoir gentiment demandé depuis plus de quatre ans et à chaque fois que tu me voyais : « Et tes souris comment ça va ? ».

Enfin merci à Coline, Clément et Héloïse pour tous les week-end à Batz-sur-mer et tous les moments que l'on a passé ensemble. Un immense merci à toi Héloïse tu es toujours là pour moi et tu trouves toujours les mots. Merci biche de m'avoir soutenue depuis que l'on s'est rencontré à Brest et d'être toujours si pertinente et drôle.

Et évidemment, je remercie aussi toutes les personnes que j'aurai pu oublier et je vous demande par avance de bien vouloir m'en excuser.



# SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	8
A. Les cellules ROR $\gamma$ t <sup>+</sup> et l'immunité de type 17 .....	8
1. L'immunité adaptative T CD4 <sup>+</sup> de type « Helper ».....	8
1.1. L'initiation de la réponse lymphocytaire T.....	8
1.2. Généralités sur la réponse lymphocytaire T $\alpha\beta$ .....	11
1.3. Le paradigme de la dichotomie T <sub>H</sub> 1 et T <sub>H</sub> 2 .....	12
2. Les lymphocytes T <sub>H</sub> 17 ou l'origine de l'immunité de type 17.....	16
2.1. L'interleukine-17 .....	16
2.2. Le facteur de transcription ROR $\gamma$ t.....	18
2.3. Les mécanismes de différenciation des T <sub>H</sub> 17.....	22
2.4. Le réseau transcriptionnel régulant le développement des T <sub>H</sub> 17.....	27
2.5. La défense de l'hôte par les T <sub>H</sub> 17.....	29
2.6. Le rôle clé de la flore intestinale .....	32
3. Les autres acteurs cellulaires de l'immunité de type 17.....	33
3.1. Les Tc17 : des lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> producteurs d'IL-17.....	34
3.2. Les cellules MAIT et iNKT .....	35
3.3. Les cellules T $\gamma\delta$ 17.....	36
3.4. Identification des « <u>i</u> nnate <u>l</u> ymphoid <u>c</u> ells » (ILCs).....	38
3.5. Les « <u>i</u> nnate <u>l</u> ymphoid <u>c</u> ells » de type 3 (ILC3s).....	39
4. Les pathologies associées à l'immunité de type 17 .....	42
4.1. Le modèle EAE « <u>e</u> xperimental <u>a</u> utoimmune <u>e</u> ncephalomyelitis » de neuro- inflammation auto-immunitaire .....	43
4.2. Le modèle imiquimod d'inflammation cutanée analogue au psoriasis .....	46
4.3. Les <u>m</u> aladies <u>i</u> nflammatoires <u>c</u> hroniques de l' <u>i</u> ntestin (MICI).....	48
B. Rôle de <i>Tmem176b</i> ( <i>Torid</i> ) dans le système immunitaire .....	53
1. Identification de <i>Tmem176b</i> dans un modèle d'allogreffe.....	53
2. <i>Tmem176b</i> est exprimé préférentiellement par les cellules myéloïdes immatures	54
3. La génération d'une souris KO pour <i>Tmem176b</i> .....	55
4. <i>Tmem176b</i> est requis pour l'activité immunorégulatrice de cellules dendritiques tolérogènes.....	56

5. TMEM176B participe au phénomène de présentation croisée dans les cellules dendritiques tolérogènes.....	56
6. TMEM176B est un canal cationique intracellulaire impliqué dans la régulation du pH phagosomal .....	58
7. Hypothèse d'une redondance fonctionnelle entre <i>Tmem176b</i> et son homologue <i>Tmem176a</i> .....	59
C. Hypothèse d'un rôle de <i>Tmem176a</i> et <i>b</i> dans les cellules ROR $\gamma$ <sup>+</sup> .....	62
RESULTATS .....	66
A. Article publié dans <i>Scientific Reports</i> , « ROR $\gamma$ <sup>+</sup> cells selectively express redundant cation channels linked to the Golgi apparatus » (Drujon et al. 2016) .....	66
B. Génération et étude d'une souris double déficiente pour <i>Tmem176a</i> et <i>b</i> (DKO).....	93
1. Génération des souris DKO .....	93
2. Stratégie de croisement des souris DKO.....	95
3. Résultats préliminaires de l'étude du système immunitaire des souris DKO en conditions normales .....	98
4. Étude des souris DKO dans deux modèles immuno-pathologiques dépendants des cellules ROR $\gamma$ <sup>+</sup> .....	102
4.1. Modèle EAE de sclérose en plaques .....	103
4.2. Modèles de pathologies inflammatoires de l'intestin .....	103
Modèle de colite chronique induite par un transfert de cellules T CD4 <sup>+</sup> CD45RB <sup>hi</sup> ..	103
Modèle de colite aiguë induite par le Dextran Sulfate de Sodium (DSS) .....	105
DISCUSSION .....	110
ANNEXES .....	118
A. Annexe I : Article publié dans <i>PLOS ONE</i> , « Evaluation of the therapeutic potential of Bone Marrow-Derived Myeloid Suppressor Cell (MDSC) adoptive transfer in mouse models of autoimmunity and allograft rejection » (Drujon et al. 2014) .....	118
B. Annexe II : Article accepté (sous la forme de « proof » avant publication) dans <i>Journal of Genetics and Genomics</i> , « Generation of a double KO mouse by simultaneous targeting of neighboring genes using CRISPR/ Cas9 : a simple guide from design to genotyping » (Lemoine et al. 2016) .....	129

BIBLIOGRAPHIE .....	152
---------------------	-----

.....

## Table des illustrations

Figure 1 Reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes T.....	10
Figure 2 Structures des deux cytokines hétérodimériques IL-12 et IL-23 et de leurs récepteurs.....	16
Figure 3 Représentation du locus <i>Rorc</i> porté par le chromosome 3 chez la souris.....	19
Figure 4 Développement, inter-régulation et spécificité cytokinique des lignées lymphocytaires T <sub>H</sub> 1, T <sub>H</sub> 2 et T <sub>H</sub> 17.....	27
Figure 5 Développement et spécificité cytokinique des trois groupes de cellules lymphoïdes innées ILC1s, ILC2s et ILC3s.....	40
Figure 6 Les deux sous-populations T <sub>H</sub> 17 pathogéniques ou non dans l'EAE.....	46
Figure 7 Surexpression de <i>Tmem176b</i> dans les allogreffes cardiaques non rejetées chez les rats receveurs traités par TSD en comparaison des contrôles en rejet aigu.....	53
Figure 8 TMEM176B est un canal ionique intracellulaire impliqué dans la régulation du pH phagosomal dans les cellules dendritiques (DC).....	59
Figure 9 Les homologues <i>Tmem176a</i> et <i>Tmem176b</i> sont en position inversée sur le même locus et sont portés par le chromosome 6 chez la souris.....	60
Figure 10 Les protéines TMEM176A et TMEM176B sont des protéines intracellulaires de structure homologue possédant quatre domaines transmembranaires.....	60
Figure 11 Représentation des onze gènes directement régulés par le facteur de transcription ROR $\gamma$ t.....	63
Figure 12 Les trois groupes d'ILCs ont une signature génique commune.....	63
Figure 13 Fond génétique mélangé – Stratégie de croisement à court terme.....	96
Figure 14 Fond génétique mélangé – Stratégie à long terme.....	96

Figure 15 Probabilité de fond génétique B6 au fil du nombre de croisements en retour (« backcross »).	97
Figure 16 Stratégie d'analyse des marquages FACS obtenus sur les cellules de la lamina propria intestinale avec une focalisation sur les cellules lymphoïdes T CD3 <sup>+</sup> et ILCs.	99
Figure 17 Analyse de l'expression de facteurs de transcription par marquages FACS dans les LT CD4 <sup>+</sup> de la lamina propria intestinale.	100
Figure 18 Représentation comparative entre Het et DKO des pourcentages de LT dans la lamina propria intestinale. Analyse des pourcentages de cellules T CD3 <sup>+</sup> dans la population CD45 <sup>+</sup> totale et de lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> et CD8 <sup>+</sup> dans la population CD3 <sup>+</sup> totale (les souris « littermates » Het et WT sont appariées).	100
Figure 19 Représentation comparative entre Het et DKO des pourcentages de cellules RORγt <sup>+</sup> , Foxp3 <sup>+</sup> et GATA-3 <sup>+</sup> parmi les LT CD4 <sup>+</sup> de la lamina propria intestinale.	101
Figure 20 Représentation comparative entre Het et DKO des marquages FACS et des pourcentages de cellules IL-17A <sup>+</sup> et RORγt <sup>+</sup> parmi les LT CD4 <sup>+</sup> de la lamina propria intestinale.	101
Figure 21 Stratégie d'analyse des marquages FACS obtenus sur les cellules de la lamina propria intestinale avec une focalisation sur les ILCs	102
Figure 22 Modèle EAE de sclérose en plaques chez les souris DKO (BC2).	103
Figure 23 Modèle de colite chronique induite par un transfert de LT CD4 <sup>+</sup> CD45RB <sup>hi</sup> DKO (BC1) chez des souris RAGKO. (A) Pourcentage de survie post-transfert de souris RAGKO mâles et femelles ayant reçues par injection intraveineuse 0,5x10 <sup>6</sup> LT CD4 <sup>+</sup> CD45RB <sup>hi</sup> Het ou DKO (B) Représentation de la perte de poids observée chez les mâles RAGKO (inclus dans le graphique A) après le transfert des LT CD4 <sup>+</sup> naïfs.	104
Figure 24 Modèle DSS de colite aiguë chez les souris DKO (BC1).	106
Figure 25 Modèle DSS de colite aiguë chez les femelles DKO (BC1).	107
Figure 26 Modèle DSS de colite aiguë chez les mâles DKO (BC2).	108
Figure 27 Expression sélective mais diverse de <i>Tmem176a</i> et <i>b</i> .	114

Figure 28 Principaux acteurs moléculaires associés à la biologie (différenciation, stabilité, migration, fonction) des cellules Th17.....	116
---	-----

# ABRÉVIATIONS

AICD	Activated Induced Cell Death
CEI	Cellule Epithéliale Intestinale
CFA	Complete Freund Adjuvant
CHILP	Common Helper Innate Lymphoid Precursor
CIA	Collagen-Induced Arthritis
CMC	infection Cutané-Muqueuse Chronique
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigènes
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte
DBD	central DNA-Binding Domain
DC	Dendritic Cell
DSS	Dextran Sulfate de Sodium
EHEC	EnteroHaemorrhagic Escherichia Coli
EOMES	Eomesodermin
EPEC	EnteroPathogenic Escherichia Coli
Foxp3	Forkhead box protein 3
GATA-3	Gata binding protein 3
GM-CSF	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
GWAS	Genome-Wide Association Study
HCA112	human Hepatocellular Carcinoma-associated Antigen 112
HIES	Syndrome d'Hyper-IgE
IFN	Interféron
ILC	Innate Lymphoid Cell
iNKT	induced Natural Killer T cell
iNOS	Inducible Nitric Oxid Synthase
IPEX	Immune dysregulation Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked syndrome
EAE	Experimental Autoimmune Encephalomyelitis
Lin <sup>-</sup>	Lineage-negative
LTi	Lymphoid Tissue-inducer cell

LT	LymphoToxine
MAIT	Mucosal-Associated Invariant T cells
MALT	Mucosal Associated Lymphoid Tissue
MICI	Maladies Inflammatoires Chroniques de l'intestin
MOG <sub>35-55</sub>	Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein <sub>35-55</sub>
MR1	MHC-Related protein 1
MS4A	Membrane-Spanning 4-domains subfamily A
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (forme réduite)
NADPH NOX2	NADPH Oxydase
NCR	Natural Cytotoxicity Receptor
NHR	Nuclear Hormone Receptor
NK	Natural Killer cell
ORF	Open Reading Frame
PAMs	Peptides Anti-Microbiens
PLZF	Promyelocytic Leukemia Zinc Finger protein
PP	Plaques de Peyer
pT <sub>REG</sub>	T <sub>REG</sub> périphérique
PTX	Pertussis ToXin
ROR $\gamma$ t	Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor- $\gamma$ (forme thymique)
ROS	Reactive Oxygen Species
RZR	Retinoid Z Receptor family
SEP	Sclérose En Plaques
SFB	Segmented Filamentous Bacteria
SNC	Système Nerveux Central
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
T-bet	T-box transcription factor
TALENs	Transcription Activator-Like Effector Nucleases
Tc	lymphocyte T cytotoxique
TCR	T-Cell Receptor
TEC	Thymic Epithelial Cell
TGF $\beta$	Transforming Growth Factor- $\beta$
T <sub>H</sub>	T Helper
TLR	Toll Like Receptor

---

TMEM176A/B	TransMEMbrane protein 176A/B
Torid	TOLerance-Related and InDuced transcript
T <sub>REG</sub>	lymphocyte T régulateur
TSD	Transfusion de Sang spécifique du Donneur
tT <sub>REG</sub>	T <sub>REG</sub> thymique

---



# AVANT-PROPOS

À la fin de l'année 2011, j'ai rejoint l'équipe 1 du centre de recherche Inserm 1064 de Nantes, au sein de l'ITUN (Institut Transplantation Urologie Néphrologie) pour effectuer mon stage de Master 2 sous la direction conjointe de Maria Cristina Cuturi et Cédric Louvet. Mon projet initial, qui s'est prolongé lors de mon début de thèse, portait sur l'étude du potentiel tolérogène de cellules myéloïdes suppressives (MDSCs) générées in vitro selon un protocole décrit par le groupe de Vincenzo Bronte en 2010 (Marigo et al., 2010). L'objectif de mon projet consistait ainsi à évaluer le potentiel immunosuppresseur in vivo de ces MDSCs dans deux modèles pathologiques : un modèle de rejet de greffe de peau et un modèle de diabète auto-immun (de type 1) chez la souris. L'U1064 fait partie des grands centres français de recherche en immunologie spécialisés en transplantation, le premier modèle de greffe était donc historiquement bien établi au laboratoire. Sous la direction de Cédric Louvet, j'ai développé le modèle d'auto-immunité basé sur le co-transfert de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et d'anticorps spécifiques d'un néo-antigène (OVA) spécifiquement exprimé dans les cellules beta du pancréas endocrine de souris transgéniques (RIPmOVA). Lors de mes débuts, ce projet m'a beaucoup appris sur la gestion des lignées de souris génétiquement modifiées, la mise au point de modèles murins pathologiques et l'utilisation de ces modèles pour répondre à des questions fonctionnelles précises. J'ai concrétisé ce travail par la publication d'un article en juin 2014 dans PLOS ONE dans lequel je suis premier nom (Drujont et al., 2014). Le potentiel suppresseur de ces MDSCs s'est révélé prometteur dans le modèle de greffe de peau mais, finalement, sans bénéfice majeur en comparaison avec par exemple une approche par transfert de T<sub>REG</sub>. Il serait important d'optimiser le pouvoir immuno-régulateur de ces cellules générées in vitro, et potentiellement en combinaison avec des transferts de T<sub>REG</sub> allospécifiques.

A l'issue de ce travail de Master 2/début de thèse, j'ai fait le choix, en concertation avec mes directeurs de thèse, de ne pas poursuivre le projet MDSCs au delà des résultats obtenus. J'ai ainsi décidé de rediriger mon travail de thèse sur un travail plus porté sur l'immunologie fondamentale à travers l'étude de gènes de fonction encore largement inconnue dans le système immunitaire : les homologues *Tmem176a* et *Tmem176b*. Ce dernier avait été initialement identifié, d'abord sous le nom de *Torid* (Tolerance-related and induced transcript), par Cédric Louvet comme préférentiellement surexprimé dans les cellules myéloïdes présentes au sein d'allogreffes en survie dans un modèle de transplantation

cardiaque chez le rat (Louvet et al., 2005). En 2014 lorsque je me suis intéressée à l'étude des homologues *Tmem176a* et *b*, le rôle de ces gènes était perçu essentiellement à travers le prisme des cellules myéloïdes et en particulier dans les cellules dendritiques tolérogènes qui représentaient l'un des sujets phare porté par le groupe de Maria Cristina Cuturi (Condamine et al., 2010 ; Louvet et al., 2005 ; Segovia et al., 2014) . Cependant, c'est la découverte surprenante de la forte et sélective expression de ces deux gènes dans les cellules Th17 qui m'a décidée à m'investir complètement dans ce tout nouveau champ d'étude qui consiste à mettre en lumière de nouveaux mécanismes impliqués dans la fonction des cellules de l'immunité de type 17 incluant les cellules Th17 mais aussi d'autres populations hématopoïétiques également contrôlées par le facteur de transcription ROR $\gamma$ t.

Pour la rédaction de ce mémoire de thèse, j'ai donc fait le choix de ne pas développer mon travail de début de thèse sur les MDSCs qui se trouve détaillé dans mon premier article publié (Drujont et al., 2014) (placé en annexe I), mais de me concentrer uniquement sur mon projet d'étude des gènes *Tmem176a* et *b* dans les cellules ROR $\gamma$ t.

L'introduction de cette thèse s'articulera autour de deux grandes parties : la description de la famille ROR $\gamma$ t et de l'immunité de type 17 puis la présentation des connaissances actuelles sur les homologues *Tmem176a* et *b*. Les résultats relatifs à l'étude du rôle de *Tmem176a* et *b* dans la famille ROR $\gamma$ t que j'ai obtenus seront tout d'abord décrits sous la forme d'un article publié en mars 2016 dans *Scientific Reports* (Drujont et al., 2016) ; puis en seconde partie je présenterai des résultats plus récents sur l'étude de nouvelles souris doubles déficientes *Tmem176ab*<sup>-/-</sup> que nous avons générées durant ma thèse.

# INTRODUCTION

## A. Les cellules ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> et l'immunité de type 17

### 1. L'immunité adaptative T CD4<sup>+</sup> de type « Helper »

#### 1.1. L'initiation de la réponse lymphocytaire T

L'un des fondements du système immunitaire est d'assurer la défense de l'individu contre les agents infectieux. En cas de rupture des barrières naturelles de l'organisme telles que la peau et les muqueuses la première ligne de défense immunologique est assurée par l'immunité innée. Il s'agit d'un système ancestral retrouvé à minima à l'état de traces chez toutes les espèces animales et végétales. Chez l'homme et les vertébrés, la lignée myéloïde représente une part majeure des cellules du système immunitaire inné. Les effecteurs cellulaires de cette immunité comme les macrophages et les neutrophiles luttent rapidement contre les infections par des mécanismes de phagocytose et de production d'enzymes fortement lytiques. La réponse innée est complétée par le système immunitaire adaptatif qui assure la reconnaissance spécifique des antigènes et l'établissement d'une réponse cellulaire mémoire. L'initiation de l'immunité adaptative est précoce mais le développement de cette réponse se poursuit plusieurs jours après la primo-infection. Les réponses humorales et cellulaires du système immunitaire adaptatif résultent d'une activation spécifique des cellules de la lignée lymphoïde par des antigènes puis de leur différenciation effectrice.

Le progéniteur lymphoïde dérive des cellules souches hématopoïétiques et donne naissance dans la moelle osseuse à divers types lymphocytaires : les lymphocytes B, T, les cellules NK « natural killer », les cellules T $\gamma$  $\delta$  et les cellules lymphoïdes innées ou « innate lymphoid cells » (ILCs). Les lymphocytes B et T appartiennent à l'immunité adaptative contrairement aux cellules NK et aux ILCs qui sont des membres de l'immunité innée. Dans ce premier chapitre, les mécanismes qui seront décrits sont majoritairement ceux intervenant lors du développement de la réponse lymphocytaire T CD4<sup>+</sup>.

Les cellules T immatures migrent dans le thymus puis se développent en deux sous-populations CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> grâce à des processus de sélection clonale. A l'issue de cette sélection, les lymphocytes T naïfs sont libérés dans la circulation sanguine. C'est lors de l'étape de circulation continue que certains lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> naïfs rentreront en contact avec des antigènes qui leurs sont spécifiques. L'activation des cellules T s'effectue

dans les organes lymphoïdes secondaires constitués par les ganglions lymphatiques, la rate et les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses ou MALT pour « Mucosal Associated Lymphoid Tissue ». Cette activation est initiée par la rencontre des lymphocytes T naïfs avec les cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Les CPA telles que les cellules dendritiques (DC « dendritic cells ») ou les macrophages appartiennent au système immunitaire inné. Cette interaction cellule T/CPA est indispensable à l'activation lymphocytaire puisque les cellules T ne peuvent reconnaître l'antigène que lorsqu'il est couplé à des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Les antigènes associés aux molécules de CMH-I et II sont identifiés respectivement par les cellules T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup>.

Les DC sont les cellules spécialisées dans la présentation des antigènes aux lymphocytes T naïfs, elles sont dites « professionnelles ». La présentation de peptides antigéniques par les DC résulte de leur rencontre avec un motif antigénique, par exemple une protéine de la paroi bactérienne lors d'une infection. Dans ce contexte, la reconnaissance a lieu au sein du tissu infecté et initie la phagocytose de l'antigène par la DC. L'antigène phagocyté est dégradé en une multitude de peptides qui sont ensuite présentés associés aux molécules du CMH à la surface de la DC. Les DC matures migrent ensuite vers les organes lymphoïdes secondaires pour assurer l'amorçage de la réponse immune adaptative en présentant les antigènes aux lymphocytes.

La liaison transitoire d'un lymphocyte T à une CPA via des glycoprotéines d'adhésion lui fournit le temps nécessaire au criblage des nombreuses molécules du CMH présentes à la surface des CPA. Les lymphocytes T reconnaissent les complexes CMH/peptide grâce à un récepteur membranaire le TCR pour « T-cell receptor ». L'interaction d'un TCR avec un complexe CMH/peptide qui lui est spécifique provoque un arrêt du lymphocyte et un renforcement de son affinité de liaison à la CPA. Cette interaction d'un TCR avec un complexe CMH/peptide spécifique déclenche une cascade de signaux moléculaires regroupés sous le terme de « signal 1 », ce processus amorce la prolifération lymphocytaire T.

Pour initier l'expansion clonale d'une cellule T le signal 1 doit être associé à un signal de costimulation (ou signal 2). La costimulation est déclenchée lorsque certains récepteurs situés à la surface des lymphocytes reconnaissent des immunoglobulines de surface particulières portées par les CPA. L'un des récepteurs de costimulation le mieux décrit est le

CD28. Il est exprimé par les lymphocytes T naïfs ou stimulés et se lie aux molécules B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86) à la surface des CPA (**Figure 1**). Le signal issu de cette liaison déclenche au sein du lymphocyte une augmentation de la production cytokinique et notamment celle d'interleukine 2 (IL-2). Il active aussi la synthèse de la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-2 (CD25) qui se lie aux sous-unités  $\gamma\beta$  préexistantes du CD25 et cette synthèse potentialise l'affinité du récepteur CD25 pour son ligand. Puisque l'IL-2 est un facteur de survie essentiel aux cellules T ces signaux sont des prérequis indispensables à la différenciation lymphocytaire (Alegre et al., 2001). C'est pourquoi la liaison du TCR à un complexe CMH/peptide en l'absence de signaux de costimulation aboutit à l'anergie ou l'anergie de la cellule T (**Figure 1**).

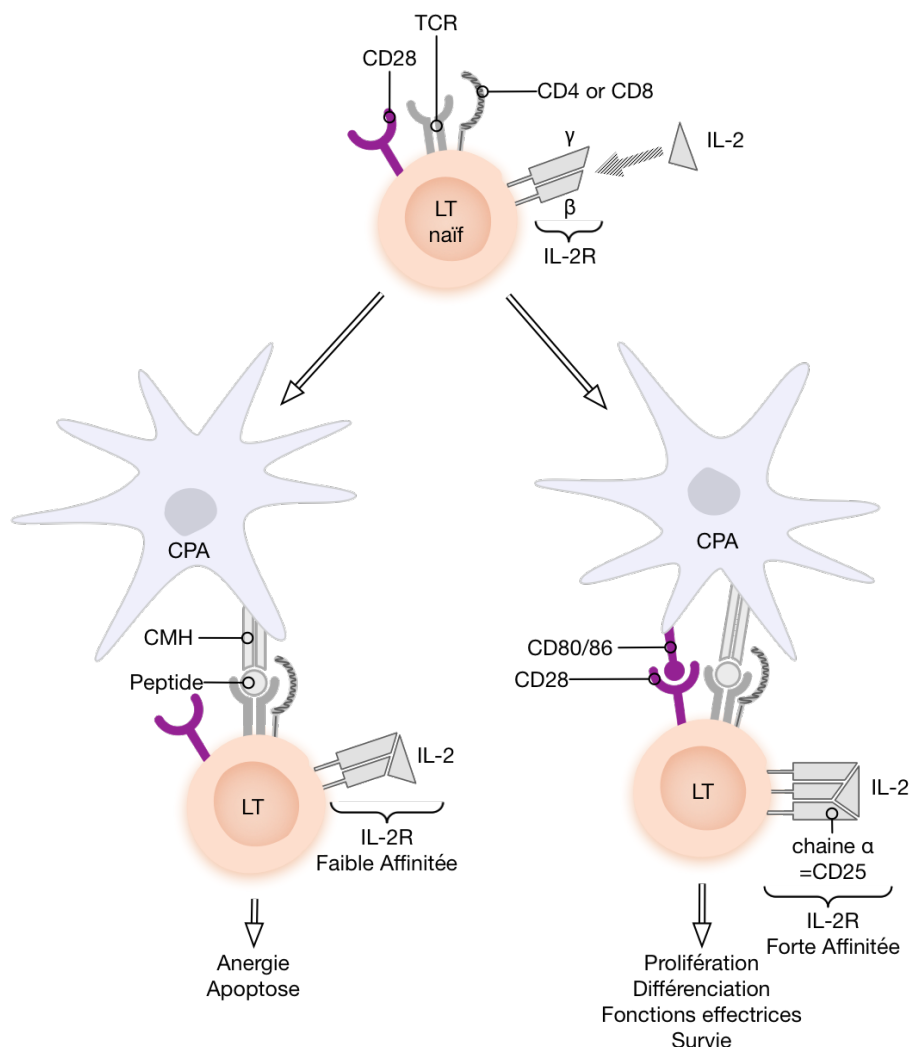


Figure 1 Reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes T.

Le TCR des lymphocytes T reconnaît spécifiquement un complexe CMH/peptide. La liaison TCR-CMH/peptide envoie un signal d'activation au lymphocyte T. Parallèlement, l'envoi par la CPA d'un signal de costimulation au lymphocyte T est essentiel à l'activation lymphocytaire optimale. L'absence d'un signal de costimulation entraîne l'anergie ou l'anergie du lymphocyte T (Figure réalisée selon Alegre et al. *Nature Review*. 2001).

## 1.2. Généralités sur la réponse lymphocytaire T $\alpha\beta$

Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> activés prolifèrent et se différencient en effecteurs cytotoxiques ou CTL « cytotoxic T lymphocytes » qui sécrètent de l'IFN $\gamma$ , de la perforine et des granzymes. Ces molécules effectrices permettent l'élimination des cellules infectées par des pathogènes intracellulaires tels que les virus ou les bactéries. Suite à leur différenciation les CTL migrent vers le foyer infectieux et additionnent leur action à celle des effecteurs innés. La majorité des CTL ne survit pas à la lyse des cellules ciblées, seule une faible proportion d'entre eux subsiste pour constituer une population de CTL mémoires (Gray et al., 2014).

Le processus est plus complexe pour les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Les cellules T CD4<sup>+</sup> stimulées s'engagent vers différentes voies de différenciation en fonction du contexte inflammatoire auquel elles sont exposées. L'agent pathogène responsable de l'infection conditionne la production cytokinique des CPA et donc la nature du milieu environnant lors de l'activation T (Korn et al., 2009). Il existe ainsi différentes sous-populations effectrices de T CD4<sup>+</sup> capables de contrôler une multitude de pathogènes en fonction de leur phénotype. Les cellules T CD4<sup>+</sup> effectrices sont désignées par le terme T<sub>H</sub> pour « T helper ». Le choix de cette dénomination résulte de la capacité des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> effecteurs à fournir des signaux auxiliaires facilitant la production d'anticorps par les lymphocytes B (Zuniga et al., 2013). Lorsque les cellules T CD4<sup>+</sup> ont acquis un phénotype effecteur particulier leurs facultés d'adhésion sont modifiées, elles quittent les organes lymphoïdes secondaires et rejoignent le foyer infectieux. Les cellules T CD4<sup>+</sup> y jouent un rôle central en épaulant de nombreux acteurs de la protection immune : elles stimulent l'activité microbicide des macrophages, elles recrutent les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles et elles orchestrent divers pans de la réponse immune adaptative grâce à la production de cytokines et de chimiokines (Zhu and Paul, 2008). À l'instar des CTL seule une petite proportion des lymphocytes « T<sub>H</sub> » survivent à la phase effectrice et évoluent en cellules T CD4<sup>+</sup> mémoires.

Il est important de noter que la complexité des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ne se limite pas à l'existence de divers sous-groupes effecteurs « T<sub>H</sub> ». La première observation d'une activité immunorégulatrice des lymphocytes T a été faite dans les années 70 par deux publications novatrices : l'une de Richard Gershon et Kazumari Kondo et l'autre de Peter McCullagh (Gershon and Kondo, 1970) ; (McCullagh, 1970). Du fait du manque d'outils expérimentaux adaptés et de l'absence d'identification de marqueur caractéristique l'étude de ces cellules



dites régulatrices est ensuite tombée en disgrâce pendant de nombreuses années avant, notamment, les travaux de Simon Sakaguchi et de Alexander Rudensky identifiant respectivement la chaîne CD25 du récepteur à l'IL-2 (Sakaguchi et al., 1995) et le facteur de transcription FOXP3 (Fontenot et al., 2003) comme marqueurs fonctionnels des Tregs. La présence des lymphocytes régulateurs est indispensable au maintien de la tolérance au soi. Chez l'homme, la mutation du gène *FOXP3* entraîne un défaut de formation des lymphocytes T<sub>REG</sub> CD4<sup>+</sup> qui se traduit par le développement d'un syndrome auto-immun léthal dénommé IPEX « immune dysregulation polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome » (Bennett et al., 2001).

Il existe encore d'autres types de lymphocytes régulateurs comme les T<sub>REG</sub> CD8<sup>+</sup>. Dans les années 90, deux groupes ont mis en évidence que les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> pouvaient jouer un rôle dans la régulation d'un modèle d'auto-immunité chez la souris avec le développement d'une maladie chronique chez les animaux déficients en cellules T CD8<sup>+</sup> (Jiang et al., 1992) ; (Koh et al., 1992). Comme pour les T<sub>REG</sub> CD4<sup>+</sup> à une certaine époque, l'un des freins majeur qui s'oppose à l'étude des T<sub>REG</sub> CD8<sup>+</sup> est l'absence de marqueur clairement identifié ou de facteur de transcription spécifique. Cet état de fait n'empêche pas l'identification de populations de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> montrant une activité régulatrice dans divers contextes comme les CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> en auto-immunité (Najafian et al., 2003) ou les CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>low</sup> en transplantation (Guillonnet et al., 2007) ; (Bezie et al., 2015).

### **1.3. Le paradigme de la dichotomie T<sub>H</sub>1 et T<sub>H</sub>2**

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> auxiliaires (ou T « helper ») ont été décrits comme une population cellulaire homogène jusqu'à la fin des années 70. Cette étude réalisée sur des lymphocytes T spléniques de souris a permis d'identifier deux sous-groupes de cellules T CD4<sup>+</sup> en fonction de leurs capacités d'adhérence sur une colonne de laine de nylon : les cellules non-adhérentes ont été nommées T<sub>H</sub>1 et les adhérentes T<sub>H</sub>2 (Tada et al., 1978). Le groupe à l'origine de cette étude a établi que les deux populations lymphocytaires T<sub>H</sub>1 et T<sub>H</sub>2 fournissent une aide à la production d'anticorps par les lymphocytes B mais agissent via des mécanismes différents.

Une dizaine d'années plus tard les travaux menés par Tim Mosmann et Bob Coffman sur des clones de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> autoréactifs et spécifiques d'antigènes variés ont permis d'associer l'existence des sous-populations T<sub>H</sub>1 et T<sub>H</sub>2 décrites par le groupe de Takeshi

Tokuhisa à deux profils cytokiniques différents. Les  $T_H1$  sécrètent majoritairement de l'IFN $\gamma$ , de la lymphotoxine  $\alpha$  (LT $\alpha$ ) et sont de très bonnes productrices d'IL-2 tandis que les  $T_H2$  produisent de l'IL-4, de l'IL-5, de l'IL-9, de l'IL-10 de l'IL-13 et de l'amphireguline (**Figure 4 – p.27**). L'IFN $\gamma$  produit par les  $T_H1$  stimule l'activité microbicide des macrophages via l'induction de la synthèse de dérivés réactifs de l'oxygène (ou ROS pour « reactive oxygen species ») tels que la NADPH oxydase et l'iNOS (Nathan et al., 1983) ; (Suzuki et al., 1988). L'IFN $\gamma$  agit également sur les CPA en augmentant l'expression des molécules du CMH-I et du CMH-II essentielles à la présentation des antigènes ; c'est d'ailleurs l'un des premiers effets biologiques qui a été associé à la famille des interférons (Boehm et al., 1997). En ce qui concerne les cytokines  $T_H2$ , l'IL-4 possède la particularité de stimuler elle-même la différenciation  $T_H2$  (Le Gros et al., 1990) ; (Swain et al., 1990), l'IL-5 joue un rôle critique dans le recrutement des éosinophiles (Coffman et al., 1989), l'IL-9 et l'IL-13 interviennent dans la production de mucus par les cellules épithéliales et l'élimination des helminthes (Longphre et al., 1999) ; (Urban et al., 1998).

La sécrétion de cytokines est la principale fonction des cellules  $T_H1$  et  $T_H2$ . Comme nous venons de le voir c'est par ce biais qu'elles orchestrent la réponse immune adaptative en activant ou recrutant diverses cibles. Le développement de ces deux lignées est considéré comme mutuellement exclusif (**Figure 4 – p.27**) puisque les cytokines  $T_H1$  et  $T_H2$  inhibent respectivement la prolifération des clones  $T_H2$  et  $T_H1$  (Mosmann et al., 1986). Il a par exemple été démontré que l'IL-10 produite par les  $T_H2$  inhibe la prolifération des lymphocytes  $T_H1$  (Fiorentino et al., 1989).

Lors de l'engagement du TCR, l'orientation vers les voies de différenciation  $T_H1$  et  $T_H2$  requiert l'expression de facteurs de transcription clés grâce à l'activation des protéines de la voie JAK-STAT ; il s'agit de STAT-1 et STAT-4 pour les  $T_H1$  et de STAT-6 pour les  $T_H2$ . Les facteurs de transcription T-bet et GATA-3 caractérisent respectivement les  $T_H1$  et les  $T_H2$  (**Figure 4 – p.27**) (Szabo et al., 2000) ; (Zheng and Flavell, 1997). Ces facteurs de transcription sont qualifiés de régulateurs « maîtres » puisqu'ils sont nécessaires et suffisants pour induire l'essentiel de la signature cytokinique de la lignée de cellules T CD4<sup>+</sup> effectrices qui leurs est associée. À la suite de ces diverses découvertes et pendant de nombreuses années, la compréhension des mécanismes effecteurs de la réponse T a été régie par le paradigme d'une dichotomie entre les lymphocytes CD4<sup>+</sup>  $T_H1$  et  $T_H2$ .

D'après ce postulat et de façon schématique, une infection par un pathogène intracellulaire tel qu'un virus ou une bactérie engendre la sécrétion d'IL-12 par les CPA ce qui provoque une orientation lymphocytaire de type  $T_H1$  tandis qu'une infection par un pathogène extracellulaire comme un helminthe (ver parasitaire) stimule la production d'IL-4 par les CPA aboutissant à une différenciation  $T_H2$  (Mosmann and Coffman, 1989) ; (Paul and Seder, 1994). La première démonstration directe de l'importance de la balance  $T_H1/ T_H2$  pour la régulation de l'issue d'une maladie provient d'études in vivo du modèle murin d'infection à *Leishmania major* (Heinzel et al., 1989). Les auteurs de cette étude ont démontré que la prédisposition génétique de certaines souches de souris à développer une sensibilité ou une résistance au parasite *L. major* corrélait respectivement avec la dominance d'une réponse immune de type  $T_H2$  ou  $T_H1$ .

Le postulat d'une dichotomie  $T_H1/T_H2$  a permis d'expliquer de nombreux phénomènes de l'immunité adaptative et la dérégulation des réponses «  $T_H$  » a été associée à diverses pathologies. Historiquement, les désordres auto-immuns et inflammatoires ont été liés aux cellules  $T_H1$  et les maladies atopiques du type allergies et asthme aux cellules  $T_H2$ . L'importance de l'immunité  $T_H1$  a été particulièrement étudiée chez la souris dans des modèles d'auto-immunités spécifiques d'organes comme l'EAE « experimental autoimmune encephalomyelitis » et la CIA « collagen-induced arthritis », associés respectivement à la sclérose en plaques et aux arthrites rhumatoïdes humaines. Pendant une vingtaine d'années, divers constats expérimentaux ont conduit à l'idée que les  $T_H1$  producteurs d'IFN $\gamma$  et ayant une spécificité pour des antigènes du soi étaient pathogéniques et requis pour l'induction de ces maladies auto-immunes (Korn et al., 2009). Deux exemples caractéristiques à l'appui de cette hypothèse sont le fait que des clones  $T_H1$  autoréactifs dérivés in vitro peuvent transférer l'EAE chez des souris naïves (Nicholson et al., 1997) et que les souris KO pour T-bet sont résistantes à l'EAE. De plus l'inhibition de l'IL-12 par un anticorps polyclonal dirigé contre l'IL-12 est une thérapie efficace dans le cadre de l'EAE et de la CIA (Leonard et al., 1995) ; (Malfait et al., 1998).

Cependant ce concept d'auto-immunité induite uniquement par les  $T_H1$  a été complètement remis en question au début des années 2000. En effet, il s'est avéré chez la souris que les déficiences en molécules impliquées dans la fonction  $T_H1$  comme l'IFN $\gamma$ , le récepteur de l'IFN $\gamma$  ou la sous-unité p35 de l'IL-12 (IL-12p35) n'étaient pas protectrices contre l'EAE mais

au contraire exacerbent la sévérité de la maladie (Tran et al., 2000) ; (Gran et al., 2002). Ces résultats ont soulevé la question d'une nouvelle population de cellules « T<sub>H</sub> » différente des T<sub>H1</sub> ou T<sub>H2</sub> et participant à l'induction de l'EAE et d'autres pathologies auto-immunes.

En 2000, l'identification d'une nouvelle chaîne cytokinique p19 a apporté une première réponse à cette problématique (**Figure 2**). En effet, la chaîne p19 est capable de former avec la sous-unité p40 de l'IL-12 une autre cytokine hétérodimérique nommée IL-23 (Oppmann et al., 2000). En conséquence, toutes les stratégies précédentes qui visaient la sous-unité p40 de l'IL-12 affectaient de manière équivalente l'IL-12 et l'IL-23 (**Figure 2**). La génération d'une souris déficiente pour la chaîne p19 de l'IL-23 (IL-23p19 KO) a permis de prouver que la cytokine déterminante pour induire l'EAE était l'IL-23 et non pas l'IL-12 (Cua et al., 2003). Deux ans plus tard, il a été démontré que l'IL-23 était cruciale pour l'expansion d'une population de cellules T CD4<sup>+</sup> productrices d'IL-17 capables d'induire l'EAE chez des souris naïves suite à leur transfert adoptif (Langrish et al., 2005).

Le « simple » duo T<sub>H1</sub>/T<sub>H2</sub> a donc été définitivement rompu suite à la mise en évidence grâce aux modèles de pathologies inflammatoires évoqués ci-dessus d'une nouvelle population de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> effecteurs stabilisés par l'IL-23 et produisant de l'IL-17 (Harrington et al., 2005) ; (Park et al., 2005). Ces effecteurs « T<sub>H</sub> » présentent un profil cytokinique et fonctionnel alternatif à celui des T<sub>H1</sub> et T<sub>H2</sub> et appartiennent à un lignage lymphocytaire caractérisé par l'expression spécifique du facteur de transcription ROR $\gamma$ t (Ivanov et al., 2006). Depuis une dizaine d'années, les cellules T CD4<sup>+</sup> engagées dans cette voie de différenciation effectrice sont désignées par le terme de lymphocytes T<sub>H17</sub> (**Figure 4 – p.27**).

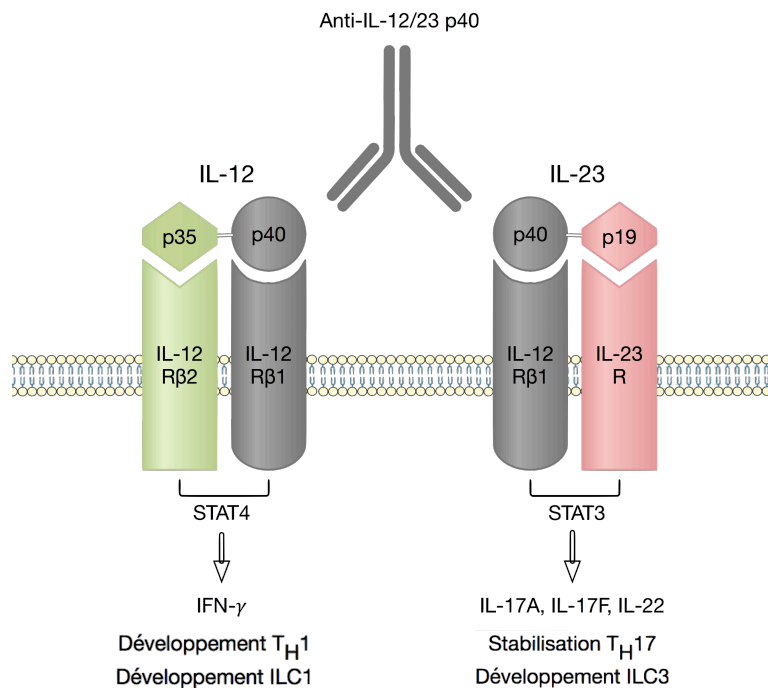


Figure 2 Structures des deux cytokines hétérodimériques IL-12 et IL-23 et de leurs récepteurs. L'IL-12 et l'IL-23 partagent une sous-unité p40 commune mais interviennent dans deux types de différenciations effectrices distinctes qui sont respectivement les voies  $T_H1$  et  $T_H17$  (Figure réalisée selon Teng et al. *Nature Medicine*. 2015).

## 2. Les lymphocytes $T_H17$ ou l'origine de l'immunité de type 17

### 2.1. L'interleukine-17

L'identification de l'interleukine-17 (IL-17) et l'étude de sa famille cytokinique sont des éléments clés pour comprendre la découverte et la biologie de la lignée  $T_H17$ . Le terme d'IL-17 est communément associé à l'IL-17A, l'un des membres de la famille cytokinique IL-17. L'IL-17A est la première cytokine de cette famille à avoir été clonée et a initialement été nommée CTLA-8 pour « *cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-8* » (Rouvier et al., 1993). Les auteurs de cette étude ont identifié 57% de similarité entre CTLA-8 et la protéine ORF13 de l'*Herpesvirus saimiri* (ou HSV13) qui est un virus lymphotropique pour les cellules T. Ce groupe a émis l'hypothèse que CTLA-8 appartiendrait à un ensemble de gènes anciennement capturés par des virus et ayant des fonctions en relation avec le système immunitaire, la mort ou la survie cellulaire (Rouvier et al., 1993). Dans la continuité de ces travaux, le groupe de Melanie Spriggs a démontré que les protéines CTLA-8 et HSV13 recombinantes étaient capables de stimuler la voie NF- $\kappa$ B et la sécrétion d'IL-6 par des fibroblastes. Ces résultats s'accordent avec une activité cytokinique. Ils ont aussi isolé et cloné un nouveau récepteur

qui peut lier à la fois CTLA-8 et HSV13. En conclusion de cette étude, les auteurs ont proposé de renommer respectivement CTLA-8 et son récepteur : IL-17 et IL-17R (Yao et al., 1995). C'est cette dernière appellation qui a ensuite été adoptée par la communauté scientifique.

Les premières cellules qui ont été décrites comme productrices d'IL-17A chez l'homme sont les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires activés (Yao et al., 1995). Comme nous l'avons vu précédemment l'IL-23 est décisive pour l'induction de l'EAE car elle est essentielle à la fonctionnalité des cellules T CD4<sup>+</sup> productrices d'IL-17 (Cua et al., 2003) ; (Langrish et al., 2005). En conséquence, l'hypothèse adoptée à cette époque était que l'IL-23 est la cytokine capable de différencier des lymphocytes CD4<sup>+</sup> naïfs en effecteurs « T<sub>H</sub> » producteurs d'IL-17. Des expériences de stimulations in vitro de cellules T CD4<sup>+</sup> naïves ont appuyé ce postulat en démontrant que la production lymphocytaire d'IL-17A était induite par l'IL-23 lorsque cette cytokine est associée à des anticorps inhibiteurs de l'IFN $\gamma$  et de l'IL-4 (Park et al., 2005). Ils ont aussi déterminé que la production d'IL-17A est indépendante des voies STAT-4 et STAT-6, essentielles aux T<sub>H</sub>1 et T<sub>H</sub>2. Ces résultats ont permis à ce groupe d'établir que les cellules T CD4<sup>+</sup> effectrices produisant de l'IL-17A appartenaient à une nouvelle lignée « T<sub>H</sub> » distincte des T<sub>H</sub>1 et des T<sub>H</sub>2.

D'autres protéines homologues à l'IL-17A ont été identifiées et ont conduit à la formation de la famille IL-17 comprenant désormais six membres allant de A à F. Les interleukines 17B, 17C et 17D ont des expressions tissulaires variées et ne semblent pas intervenir dans l'immunité (Li et al., 2000) ; (Starnes et al., 2002). L'IL-17E (ou IL-25) est le membre le plus divergent de l'IL-17A (Kolls and Linden, 2004), elle est surtout exprimée par les cellules T<sub>H</sub>2 ainsi que par les cellules épithéliales de l'intestin. L'IL-25 est promotrice de la production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 qui sont associées au profil cytokinique des T<sub>H</sub>2 (Fort et al., 2001).

Finalement, c'est l'IL-17F qui possède la plus grande proximité avec l'IL-17A tant du point de vue de sa structure (Hymowitz et al., 2001) et de sa séquence (55% d'identité entre les deux protéines) que de son expression. En effet, comme pour l'IL-17A, l'expression de l'IL-17F a initialement été décrite dans les cellules T CD4<sup>+</sup> activées (Starnes et al., 2001). Par la suite, le groupe de Casey Weaver a démontré que la production d'IL-17A et F par les cellules T CD4<sup>+</sup> est favorisée par l'IL-23 et inhibée par l'IFN $\gamma$  et l'IL-4. De plus, la production de ces deux cytokines ne requière ni l'expression de STAT-1, STAT-4 et T-bet, ni celle de STAT-6 (Harrington et al., 2005). Ces résultats sont analogues à ceux obtenus lors de l'étude ciblant

uniquement l'IL-17A et décrits précédemment (Park et al., 2005). Pour les distinguer des lignées T<sub>H</sub>1 et T<sub>H</sub>2, le groupe de Casey Weaver est le premier à avoir proposé de nommer « T<sub>H</sub>17 » les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> effecteurs producteurs notamment d'IL-17A et d'IL-17F. Cependant, il a fallu attendre que ROR $\gamma$ t soit identifié par le groupe de Dan Littman comme étant le facteur de transcription nécessaire et suffisant à la différenciation de ces lymphocytes pour valider leur appartenance à une lignée lymphocytaire à part entière (Ivanov et al., 2006).

Malgré leur importance, il est nécessaire de nuancer les résultats décrits précédemment (Park et al., 2005) ; (Harrington et al., 2005) pour les relier aux découvertes plus récentes sur le rôle de l'IL-23 dans la biologie des T<sub>H</sub>17. Par exemple, pour déclencher la sécrétion lymphocytaire d'IL-17A et F, ces deux groupes ont combiné dans chacune de leurs expériences de stimulation *in vitro* la présence d'IL-23 à l'inhibition de signaux indispensables aux voies de différenciation T<sub>H</sub>1 et/ou T<sub>H</sub>2. En effet, dans les conditions expérimentales de ces deux études, l'IL-23 seule est incapable d'induire chez les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> une production efficace d'IL-17A et d'IL-17F.

## **2.2. Le facteur de transcription ROR $\gamma$ t**

Le facteur de transcription ROR $\gamma$ t pour « retinoic acid receptor related orphan receptor  $\gamma$  » appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires d'hormones (ou NHR « nuclear hormone receptor ») constituée d'une soixantaine de membres et qui inclut notamment les récepteurs aux stéroïdes, aux rétinoïdes, aux hormones thyroïdiennes et à la vitamine D. Ces récepteurs contrôlent une multitude de fonctions biologiques telles que le développement, la reproduction, la physiologie des organes et l'homéostasie via la régulation de la croissance, de la différenciation et de l'apoptose cellulaire (Mangelsdorf and Evans, 1995) ; (Laudet and Adelmant, 1995). La majorité de ces récepteurs partagent une structure commune constituée de quatre principaux domaines : un domaine amino-terminal codant pour une activité transactivatrice, un DBD « central DNA-binding domain », un LBD « carboxyl-terminal ligand-binding domain » et un domaine charnière situé entre le DBD et le LBD qui est faiblement conservé et porte généralement des signaux de localisation nucléaire. Le DBD est le domaine le mieux conservé et participe aux interactions protéine-ADN ou protéine-protéine. Le LBD qui est modérément conservé permet la liaison des ligands et est impliqué dans la dimérisation des récepteurs et l'activation ou la répression

transcriptionnelle des multiples cibles des NHR. Certains des récepteurs de cette superfamille ont des ligands naturels connus pour d'autres aucun ligand n'a été identifié, ils sont donc dits orphelins (Laudet, 1997).

De manière plus précise ROR $\gamma$ t appartient à la sous-famille ROR/RZR qui est constituée de trois sous-groupes : ROR $\alpha$  ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 et  $\alpha$ 3), RZR $\beta$  et les deux isoformes ROR $\gamma$  et ROR $\gamma$ t (Giguere et al., 1994) ; (Carlberg et al., 1994). L'isoforme ROR $\gamma$  a initialement été identifiée comme fortement exprimée dans les muscles squelettiques (Hirose et al., 1994). Quatre ans plus tard, l'isoforme ROR $\gamma$ t a été mise en évidence dans certains thymocytes par le groupe de Michael Bevan (He et al., 1998). Les isoformes protéiques ROR $\gamma$  et ROR $\gamma$ t résultent de l'épissage d'un exon alternatif (exon 1 $\gamma$ t) en position 5' entre les exons 2 $\gamma$  et 3 $\gamma$  du locus *Rorc* qui est lui même situé sur le chromosome 3 chez la souris (**Figure 3**).

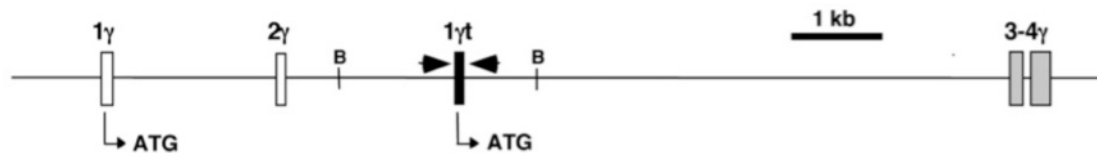


Figure 3 Représentation du locus *Rorc* porté par le chromosome 3 chez la souris.

Seuls les quatre premiers exons du locus *Rorc* sont représentés. Un épissage alternatif des premiers exons produit deux isoformes possibles, ROR $\gamma$  (exons 1 $\gamma$  et 2 $\gamma$ ) et ROR $\gamma$ t (exon 1 $\gamma$ t). Les exons 3 $\gamma$  et 4 $\gamma$  codent pour le DBD « DNA-Binding Domain » de ROR $\gamma$ /ROR $\gamma$ t (Figure extraite de Eberl et al. *Nature Immunology*. 2004).

Lors de leur identification, ROR $\gamma$  et ROR $\gamma$ t ont été classés dans la catégorie des NHR orphelins mais récemment des ligands naturels de ces deux isoformes ont été identifiés. Il est important de noter que les LBD de ROR $\gamma$  et ROR $\gamma$ t sont très similaires puisque la différence de séquence induite par l'épissage alternatif se trouve en région amino-terminale. Pour cette raison, il est complexe d'identifier ou de synthétiser des ligands dont la spécificité est restreinte à l'une des deux isoformes protéiques. Parmi les ligands naturels on distingue des agonistes comme le desmostérol, un précurseur du cholestérol et certains oxystérols qui sont des dérivés oxygénés, ou des sous-produits de la synthèse du cholestérol, par exemple le 7 $\beta$ , 27-dihydroxycholesterol (Hu et al., 2015) ; (Soroosh et al., 2014). Ces ligands peuvent aussi être des agonistes inverses tels que d'autres oxystérols, l'acide ursolique ou la digoxine (Jin et al., 2010) (Wang et al., 2010) ; (Xu et al., 2011) ; (Huh et al., 2011).

L'expression de ROR $\gamma$  s'étend à divers tissus : le cerveau, le cœur, le thymus, les muscles, les reins et le foie avec une prédominance dans ces trois derniers organes. Au contraire, ROR $\gamma$ t a



initialement été détecté spécifiquement dans le thymus avec une très forte expression dans les thymocytes immatures doubles positifs (DP)  $CD4^+CD8^+$  et une absence totale de détection dans les thymocytes simples positifs  $CD4^+$  ou  $CD8^+$ . Cette expression thymique est à l'origine de l'ajout de la lettre « t » pour distinguer l'isoforme  $ROR\gamma_t$  de  $ROR\gamma$  (He et al., 1998). Les auteurs de cette étude ont pu déterminer que  $ROR\gamma_t$  appartient aux facteurs protégeant des hybridomes de cellules T d'une apoptose induite par la stimulation du TCR (ou AICD « activated induced cell death) via l'inhibition du ligand de Fas (FasL) et de l'IL-2. Le groupe de Michael Bevan a donc établi le profil d'expression de  $ROR\gamma_t$  et proposé une hypothèse fonctionnelle pour cette isoforme. Cependant les expériences in vitro basées sur l'étude d'hybridomes T n'apportent pas de réponse claire quand à la fonction jouée par  $ROR\gamma_t$  dans les thymocytes immatures DP (He et al., 1998). En 2000, la génération par le groupe de Dan Littman d'une souris  $Rorc^{-/-}$  qui est déficiente pour les deux isoformes  $ROR\gamma$  et  $ROR\gamma_t$  a permis de confirmer l'importance de ces protéines pour la survie des thymocytes DP  $CD4^+CD8^+$  (Sun et al., 2000) ; (Guo et al., 2002). Cependant ces résultats sont insuffisants pour conclure si cette fonction est assurée par  $ROR\gamma_t$  puisque dans ces animaux transgéniques les deux isoformes sont affectées.

Cinq ans après l'identification de  $ROR\gamma_t$  et de sa spécificité thymique chez les souris adultes, le groupe de Dan Littman a établi que l'expression de ce facteur de transcription était primordiale en périphérie dans les cellules LTi « lymphoid tissue-inducer » (Eberl et al., 2004). Chez la souris pendant la vie fœtale,  $ROR\gamma_t$  est exclusivement exprimé par les cellules LTi  $CD3^-CD4^+CD45^+IL-7R\alpha^+$  qui sont indispensables au développement des tissus lymphoïdes secondaires du fœtus. Cette observation résulte de la génération d'une souris « knockin » dans laquelle l'expression de  $ROR\gamma_t$  a été substituée à celle de la protéine GFP en ciblant spécifiquement l'exon  $1\gamma_t$  du locus *Rorc* : les souris  $Rorc(\gamma_t)^{-/-}$  sont donc  $Rorc(\gamma_t)^{GFP/GFP}$ . Les cellules LTi expriment la lymphotoxine- $\alpha_1\beta_2$  ( $LT\alpha_1\beta_2$ ) tandis que les cellules mésenchymateuses des ganglions portent le récepteur  $LT\beta R$  reconnaissant la  $LT\alpha_1\beta_2$ . L'interaction entre ces deux molécules induit l'activation de la croissance du mésenchyme qui fournit la plateforme nécessaire au développement des tissus lymphoïdes matures. Les travaux effectués par le groupe de Dan Littman ont montré que les souris  $Rorc(\gamma_t)^{-/-}$  ont un défaut de génération des cellules LTi en conséquence de quoi les organes lymphoïdes tels que les ganglions lymphatiques et les plaques de Peyer (PP) ne se développent pas (Eberl

et al., 2004). Malgré la déficience en ROR $\gamma$ t ces souris sont viables et fertiles. Cependant, les auteurs de l'étude ont noté une augmentation de l'incidence des thymomes entraînant une mortalité précoce des animaux (80 à 90% des souris homozygotes décèdent entre l'âge de 12 et 14 semaines).

En 2003, deux conclusions étaient donc admises au sujet de ROR $\gamma$ t. D'une part ce facteur de transcription joue un rôle fondamental dans la fonctionnalité des cellules LTi et, par ce biais, dans le développement des tissus lymphoïdes secondaires lors de la vie fœtale. D'autre part, ROR $\gamma$ t est exprimé dans les thymocytes immatures DP et favorise leur survie. À ce stade, l'absence de détection d'expression de ROR $\gamma$ t dans la rate et la moelle osseuse suggérait que ce facteur de transcription n'était pas impliqué dans la biologie des lymphocytes T matures.

Cette hypothèse a été contredite trois ans plus tard par le groupe de Dan Littman lui-même qui a établi la première description du rôle caractéristique de ROR $\gamma$ t dans le lignage lymphocytaire T<sub>H</sub>17. L'étude menée par cette équipe a démontré que les T<sub>H</sub>17 sont absents chez les souris déficientes pour ROR $\gamma$ t. De plus, l'expression forcée de ce facteur de transcription dans des cellules T CD4<sup>+</sup> murines et humaines induit l'expression de transcrits présents dans les lymphocytes T<sub>H</sub>17 : ces transcrits codent pour des cytokines clés comme l'IL-17A, l'IL-17F, CCR6 et le récepteur de l'IL-23 (Ivanov et al., 2006) ; (Manel et al., 2008). ROR $\gamma$ t est donc le facteur de transcription primordial qui orchestre la différenciation de cette lignée de cellules T CD4<sup>+</sup> effectrices (Ivanov et al., 2006). L'expression de ROR $\gamma$ t est nécessaire et suffisante pour induire une différenciation de type T<sub>H</sub>17. Le facteur de transcription ROR $\gamma$ t définit donc la lignée lymphocytaire T<sub>H</sub>17 au même titre que T-bet et GATA-3 caractérisent les lignées T<sub>H</sub>1 et T<sub>H</sub>2.

La production d'IL-17 et l'expression du facteur de transcription ROR $\gamma$ t sont les deux premières caractéristiques intrinsèques qui ont été associées à la biologie des lymphocytes T<sub>H</sub>17 ; elles sont cruciales mais d'autres facteurs de transcription et d'autres cytokines sont nécessaires pour définir l'intégralité du programme de différenciation des T<sub>H</sub>17 et pour identifier l'ensemble des fonctions assurées par ces lymphocytes T CD4<sup>+</sup> effecteurs.

### 2.3. Les mécanismes de différenciation des T<sub>H</sub>17

La compréhension complète des mécanismes à l'origine d'un lignage cellulaire nécessite d'une part d'identifier les diverses molécules inductrices de la lignée d'intérêt (cytokines, chimiokines) et d'autre part de déterminer une vue globale de son réseau de facteurs transcriptionnels régulateurs.

En 2006 en parallèle de l'identification de ROR $\gamma$ t comme facteur de transcription clé des T<sub>H</sub>17, trois études indépendantes ont déterminé simultanément que la combinaison du TGF $\beta$  à l'IL-6 constituait le cocktail cytokinique minimal requis pour différencier in vitro des cellules T CD4<sup>+</sup> naïves en cellules effectrices productrices d'IL-17 (**Figure 4 – p.27**) (Veldhoen et al., 2006) ; (Bettelli et al., 2006) ; (Mangan et al., 2006). De façon intéressante, c'est en voulant trouver des facteurs inhibant la conversion par le TGF $\beta$  des cellules T CD4<sup>+</sup> naïves en T<sub>REG</sub> Foxp3<sup>+</sup> que le groupe de Vijay Kuchroo a identifié l'importance de l'association de ces deux cytokines pour la différenciation T<sub>H</sub>17 (Bettelli et al., 2006). La présence des deux cytokines TGF $\beta$  et IL-6 est cruciale puisque le TGF $\beta$  seul (à forte concentration) induit une polarisation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs en T<sub>REG</sub> qui expriment Foxp3 et produisent de l'IL-10 et du TGF $\beta$  (Zhou et al., 2008).

L'IL-6 est donc un facteur primordial dans l'induction de la réponse T<sub>H</sub>17. Il avait précédemment été démontré que les souris *Il6*<sup>-/-</sup> sont résistantes à l'induction de l'EAE (Samoilova et al., 1998) ; (Okuda et al., 1998) ; (Mendel et al., 1998) ; (Eugster et al., 1998) et de la CIA (Boe et al., 1999). Dans la continuité de ces travaux, le groupe de Vijay Kuchroo a mis en évidence un défaut de génération des T<sub>H</sub>17 en faveur d'une réponse lymphocytaire T régulatrice (T<sub>REG</sub> Foxp3<sup>+</sup>) chez les souris *Il6*<sup>-/-</sup>. Les auteurs de cette étude ont aussi démontré que la déplétion en T<sub>REG</sub> est capable de restaurer la susceptibilité au développement de l'EAE chez les souris *Il6*<sup>-/-</sup> (Korn et al., 2007a). Ce constat suggère que l'IL-6 peut être suppléée au moins partiellement par d'autres cytokines pour induire la différenciation T<sub>H</sub>17.

L'IL-21 qui appartient à la famille de l'IL-2 est l'une des autres cytokines favorisant la différenciation in vitro des T<sub>H</sub>17 lorsqu'elle est combinée au TGF $\beta$ . Les cellules T<sub>H</sub>17 sont une source majeure d'IL-21, elle peut donc agir sur la différenciation T<sub>H</sub>17 via une boucle autocrine d'amplification (Korn et al., 2007b) ; (Nurieva et al., 2007) ; (Zhou et al., 2007). Cependant, le rôle in vivo de l'IL-21 sur les T<sub>H</sub>17 est sujet à controverse. En effet, l'absence d'IL-21 n'impacte pas la différenciation des T<sub>H</sub>17 dans la lamina propria de l'intestin grêle

chez la souris (Ivanov et al., 2008). Cette controverse s'étend aussi au rôle de l'IL-21 dans des modèles pathologiques murins comme l'EAE puisque deux études ont montré un impact de la déficience en IL-21 et IL-21R sur le développement de la maladie (Nurieva et al., 2007) ; (Lee et al., 2015b) ; à l'inverse deux autres groupes ont démontré que l'absence du signal IL-21 n'affecte pas l'induction de l'EAE (Coquet et al., 2008) ; (Sonderegger et al., 2008).

L'IL-1 $\beta$  sécrétée par les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques est une autre cytokine capable de stimuler la différenciation T<sub>H</sub>17. Une étude récente a d'ailleurs démontré que l'IL-21 est capable d'activer la production d'IL-1 $\beta$  par les DC conventionnelles (Wan et al., 2015). Comme l'IL-6, l'IL-1 $\beta$  inhibe dans les lymphocytes T l'expression de Foxp3 induite par le TGF $\beta$  et favorise la production d'IL-17A en augmentant l'expression et l'activation de facteurs de transcription spécifiques des T<sub>H</sub>17 (Ikeda et al., 2014) ; (Basu et al., 2015).

D'après les travaux précédemment cités, le TGF $\beta$  et l'IL-6 sont les deux cytokines clés qui déclenchent la phase initiale de la différenciation des lymphocytes T<sub>H</sub>17 (**Figure 4 – p.27**). La pertinence de ce cocktail cytokinique est globalement admise pour ce qui est de la différenciation in vitro de cellules T naïves CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>high</sup>CD44<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>(Foxp3<sup>-</sup>) murines en effecteurs T<sub>H</sub>17. En revanche, le rôle du TGF $\beta$  dans la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> humains en T<sub>H</sub>17 a été sujet à polémique. Cette controverse sur le rôle du TGF $\beta$  a débuté en 2007 avec les travaux de deux groupes qui ont démontré que cette cytokine n'était pas indispensable pour induire une différenciation T<sub>H</sub>17 (Acosta-Rodriguez et al., 2007) ; (Wilson et al., 2007). Cependant, les conditions de culture utilisées dans ces études n'étaient pas suffisamment strictes. En effet, la méthode de purification des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> du sang périphérique principalement basée sur les marqueurs CD45RA<sup>+</sup> ou CD45RO<sup>-</sup> n'est pas optimale. De plus, l'ajout de sérum dans le milieu de culture et la présence résiduelle de plaquettes sanguines (qui sont de grandes productrices de TGF $\beta$ ) sont des sources non contrôlées d'apport en TGF $\beta$ . Des études ultérieures ont répondu à cette polémique en prouvant que le TGF $\beta$  est essentiel pour différencier des cellules T naïves en T<sub>H</sub>17 (Manel et al., 2008) ; (Volpe et al., 2008) ; (Yang et al., 2008).

La perplexité des équipes de recherche qui se sont intéressées à l'étude des voies de signalisation dépendantes du TGF $\beta$  dans les lymphocytes T résulte du constat qu'il est indispensable à la fois pour la différenciation des T<sub>REG</sub> et pour celle des T<sub>H</sub>17. Ce

questionnement peut être énoncé ainsi : comment le TGF $\beta$  peut-il contrôler deux populations de cellules T ayant des fonctions opposées ? Le premier élément de réponse repose, comme nous l'avons vu précédemment, sur la synergie des signaux cytokiniques reçu par le lymphocyte T CD4<sup>+</sup> naïf. Le TGF $\beta$  seul induit Foxp3 et donc une différenciation en T<sub>REG</sub> tandis que l'association avec de l'IL-6 induit une polarisation T<sub>H</sub>17 (Chen et al., 2003) ; (Zhou et al., 2007). Le second point est que le TGF $\beta$  agit de manière dose-dépendante : une forte concentration est en faveur des T<sub>REG</sub> et une faible concentration favorise les T<sub>H</sub>17 (Zhou et al., 2008). Finalement, le dernier élément de réponse est que TGF $\beta$  induit deux grandes voies de signalisation passant par les facteurs de transcription Smad2 ou Smad3 en fonction du contexte inflammatoire. En résumé, une forte stimulation antigénique en présence de TGF $\beta$  et d'IL-6 conduit à une phosphorylation élevée de Smad2 qui s'associe alors à STAT-3 et induit la différenciation T<sub>H</sub>17 (**Figure 4 – p.27**). Dans le cas inverse, c'est Smad3 qui prime, inhibe STAT-3 et donc s'oppose à la différenciation T<sub>H</sub>17 (Yoon et al., 2015).

Le TGF $\beta$  est produit par de multiples lignées allant des leucocytes aux cellules stromales. L'identification de la source cellulaire responsable spécifiquement de la différenciation T<sub>H</sub>17 est donc complexe ; toutefois il semblerait qu'il s'agisse principalement des lymphocytes T effecteurs et des T<sub>REG</sub> (Veldhoen et al., 2006) ; (Li et al., 2007). Le TGF $\beta$  est produit sous forme latente et son activation nécessite une dégradation protéolytique ou un changement de conformation des protéines LAP « latency-associated protein » qui sont associées au TGF $\beta$  immature et répriment sa liaison à ses récepteurs (TGF $\beta$ RI et TGF $\beta$ RII). L'activation du TGF $\beta$  fait notamment intervenir l'adhésion des protéines LAP à des intégrines  $\alpha_v\beta_6$  ou  $\alpha_v\beta_8$  portées respectivement par les cellules épithéliales ou les DC. Il a été démontré que la délétion conditionnelle de l'intégrine  $\alpha_v\beta_8$  dans les DC induit chez les souris un syndrome lymphoprolifératif et inflammatoire équivalent à celui observé chez les animaux KO pour le TGF $\beta$  (Travis et al., 2007). Le TGF $\beta$  nécessaire à la différenciation T<sub>H</sub>17 agit donc en paracrine sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs mais son activation est effectuée par des cellules telles que les DC ou les cellules épithéliales présentes dans le microenvironnement. Comme nous l'avons vu précédemment, le signal provoqué par le TGF $\beta$  passe par la voie des molécules Smad et est notamment requis pour l'induction de ROR $\gamma$ t, de l'IL-17 et du récepteur de l'IL-23 (IL-23R) qui n'est pas exprimé par les cellules T naïves (Mangan et al., 2006). L'induction de l'*Il23r* chez les T<sub>H</sub>17 lors de la différenciation est aussi dépendante de l'IL-6, de STAT-3 et

de ROR $\gamma$ t (Zhou et al., 2007) ; (Nurieva et al., 2007) ; (Yang et al., 2007). L'expression de l'IL-23R par les T<sub>H</sub>17 leur permet de reconnaître la sous-unité p19 de l'IL-23. La voie de signalisation générée par la liaison de l'IL-23 à son récepteur stimule l'expansion des T<sub>H</sub>17 et stabilise leur phénotype effecteur (**Figure 4 – p.27**).

L'IL-23 qui appartient à la famille de l'IL-12 est une cytokine pro-inflammatoire produite par des cellules du système immunitaire inné telles que les DC et les macrophages ; sa production est favorisée par certains microenvironnements comme celui de l'intestin. Les signaux qui induisent la production de cette cytokine sont critiques pour déterminer si la réponse T induite sera dominée ou non par les cellules T<sub>H</sub>17 (Veldhoen et al., 2006). Pour sa part, l'IL-23R est exprimé par les populations de cellules T activées et mémoires. Le signal induit par la liaison de l'IL-23 à son récepteur n'est donc pas impliqué dans la phase initiale de la différenciation T<sub>H</sub>17 mais est essentiel pour que celle-ci soit complète et durable. Après l'étape d'initiation de la réponse T<sub>H</sub>17 la disponibilité en IL-23 devient donc le facteur limitant qui détermine si l'activité T<sub>H</sub>17 effectrice sera maintenue pendant la réponse immune. En effet, le signal dépendant de l'IL-23R est primordial pour induire une maturation des T<sub>H</sub>17 en cellules inflammatoires (Ghoreschi et al., 2010) ; (Hirota et al., 2011) ; (Langrish et al., 2005) ; (McGeachy et al., 2007). En l'absence d'IL-23R, les T<sub>H</sub>17 sont incapables d'induire de fortes réponses inflammatoires ou auto-immunes. Par exemple, le groupe de Daniel Cua a démontré que la déficience en IL-23R chez la souris induit un blocage des T<sub>H</sub>17 à une étape d'activation précoce ce qui empêche l'induction de l'EAE (McGeachy et al., 2009). Chez l'homme, il a été clairement mis en évidence par des études d'associations pangénomiques (GWAS « genome-wide association studies ») que les polymorphismes du gène de l'*IL23R* sont associés à la progression de nombreux désordres immuns (Duerr et al., 2006). Des études plus récentes ont montré que pour générer la maturation inflammatoire des lymphocytes T<sub>H</sub>17, l'IL-23 agit sur de multiples voies de signalisation telles que le maintien de l'expression de gènes clés (*Rorc* et *Il17*), l'induction de gènes effecteurs (*Il22*, *Csf2* et *Ifng*), la répression de facteurs inhibiteurs (*Ahr* et *c-maf*) et surtout l'activation de son propre signal via l'augmentation de l'expression de l'*Il23r* (Codarri et al., 2011) ; (El-Behi et al., 2011) ; (Ghoreschi et al., 2010) ; (Hirota et al., 2011) ; (Lee et al., 2012b). Suite à la reconnaissance par son récepteur, l'IL-23 tout comme l'IL-6 et l'IL-21 induisent un signal qui met en jeu le facteur de transcription STAT-3. Le recrutement de STAT-3 n'étant pas

spécifique de l'IL-23, des facteurs additionnels sont donc requis pour promouvoir spécialement la fonction inflammatoire des T<sub>H</sub>17. Le groupe de Daniel Cua a apporté une réponse à cette interrogation en identifiant le facteur de transcription Blimp-1 qui s'avère être une cible directe de l'IL-23. En collaboration avec STAT-3, p300 et ROR $\gamma$ t, Blimp-1 active l'expression de gènes pro-inflammatoires (*Il23r*, *Csf2*, *Il17*, *Ifng*) et réprime simultanément les gènes qui déstabilisent (*Il2*) le programme inflammatoire des T<sub>H</sub>17 (Jain et al., 2016).

L'IL-6 est produite par de nombreuses cellules hématopoïétiques telles que les DC, les monocytes, les macrophages, les lymphocytes B et certaines sous-populations de cellules T activées. Elle est aussi sécrétée par les cellules tumorales, les fibroblastes, les cellules endothéliales et les kératinocytes. En premier lieu, le TGF $\beta$  est indispensable pour maintenir la réactivité des cellules T à l'IL-6. Le signal TGF $\beta$  active l'expression de l'IL-6R $\alpha$  tandis que la stimulation du TCR et le signal IL-6 s'opposent à cette expression. Dans un second temps, l'IL-6 permet le co-engagement de l'IL-6R $\alpha$  et de l'IL-6R $\beta$  (ou gp130) ce qui active la molécule STAT-3 par phosphorylation. Notons que le signal médié par l'IL-23 agit aussi via l'activation du facteur de transcription STAT-3 (Cho et al., 2006). La voie STAT-3 aboutit à l'induction de facteurs de transcription indispensables à la polarisation T<sub>H</sub>17 tels que ROR $\gamma$ t (Yang et al., 2007); (Yang et al., 2008). De plus, STAT-3 active l'expression de l'*Il17* en se liant conjointement avec ROR $\gamma$ t à son promoteur (Hirahara et al., 2010). Le facteur de transcription STAT-3 est indispensable puisque sa délétion abroge la différenciation T<sub>H</sub>17 (Yang et al., 2007) mais il n'est pas suffisant ; il agit au sein d'un réseau transcriptionnel complexe contrôlant la biologie des T<sub>H</sub>17.

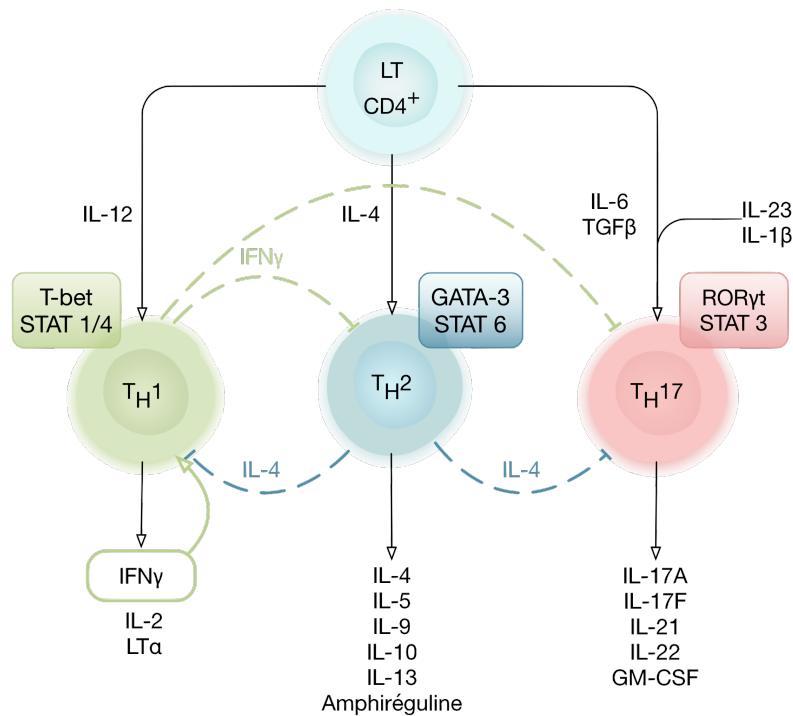


Figure 4 Développement, inter-régulation et spécificité cytokinique des lignées lymphocytaires  $T_H1$ ,  $T_H2$  et  $T_H17$ .

#### 2.4. Le réseau transcriptionnel régulant le développement des $T_H17$

À l'instar de STAT-3, d'autres facteurs de transcription comme IRF4, BATF et  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$  sont requis pour induire l'expression de ROR $\gamma$ t et/ou de cytokines comme l'IL-17 tant in vivo que in vitro lors d'une polarisation  $T_H17$  en présence d'IL-6 et de TGF $\beta$  ( $\pm$  d'IL-1 $\beta$  et d'IL-23). Les premières études sur IRF4 « interferon-regulatory factor 4 » ont démontré son importance dans le développement  $T_H2$  (Hu et al., 2002) ; (Lohoff et al., 2002) ; (Rengarajan et al., 2002). De façon intéressante, le groupe Michael Lohoff a ensuite identifié que ce facteur de transcription est aussi un facteur critique pour la génération des  $T_H17$ . En effet, les souris *Irf4*<sup>-/-</sup> sont résistantes à l'induction l'EAE et ces animaux présentent un défaut de développement des  $T_H17$  (Brustle et al., 2007). Le facteur de transcription BATF « B cell-activating transcription factor » contrôle aussi la différenciation  $T_H17$ , les souris *Batf*<sup>-/-</sup> ont un défaut de génération des  $T_H17$  tandis que les voies  $T_H1$  et  $T_H2$  ne sont pas affectées et ces souris KO sont résistantes au développement de l'EAE. Dans cette étude, le groupe de Kenneth Murphy a aussi mis en évidence que BATF est capable de se lier à des éléments inter-géniques conservés notamment sur le locus *Il17a-Il17f* : le promoteur de l'*Il17* est sensible à la liaison de BATF (Schraml et al., 2009). Un troisième facteur de transcription,  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ , qui est un membre de la famille  $\text{I}\kappa\text{B}$  et est encodé par le gène *Nfkbiz* chez la souris, est



capable de réguler le développement T<sub>H</sub>17. À l'instar des souris *Irf4*<sup>-/-</sup> et *Baft*<sup>-/-</sup>, les animaux *Nfkbiz*<sup>-/-</sup> ont un défaut de génération des T<sub>H</sub>17 et une résistance à l'EAE. De plus, la co-expression forcée de IκBζ et RORγt ou RORα même en l'absence d'IL-6 et de TGFβ est capable de différencier des cellules T CD4<sup>+</sup> naïves en T<sub>H</sub>17. Comme BATF, ce facteur de transcription peut se lier à la région régulatrice de l'*Il17a* et ce en coopération avec RORγt ou RORα (Okamoto et al., 2010). Ces résultats sont en accord avec le fait que RORα peut contribuer à l'expression de l'IL-17 en l'absence de RORγt (Yang et al., 2008). Il existe donc des redondances fonctionnelles entre RORα et RORγt. De multiples autres facteurs de transcription tels que *Ahr*, *Runx1* et *c-Maf* sont impliqués en tant que régulateurs positifs ou négatifs dans la différenciation T<sub>H</sub>17 (Veldhoen et al., 2008) ; (Zhang et al., 2008) ; (Bauquet et al., 2009). Comme nous l'avons vu précédemment, l'activation du programme inflammatoire et donc la pathogénicité des T<sub>H</sub>17 dépend aussi du facteur de transcription Blimp-1 (Jain et al., 2016).

Les études précédemment citées ont apporté une contribution majeure à la compréhension de la différenciation T<sub>H</sub>17 mais elles ne permettent pas de construire une vue globale du réseau de régulation de cette lignée lymphocytaire. En effet il s'agit à chaque fois d'observer comment un ou quelques facteurs de transcription régulent quelques cibles « vedettes » comme l'*IL-17A*. En 2012, le groupe de Dan Littman s'est positionné sur une autre approche qui consiste à déterminer comment au sein du réseau de régulation transcriptionnel des T<sub>H</sub>17, les multiples facteurs de transcription se régulent entre eux et agissent sur leurs différentes cibles (Ciofani et al., 2012). Cette étude réalisée sur des cellules murines combine une méta-analyse de l'occupation du génome par ces facteurs de transcription, du RNA-seq sur des lymphocytes T de souris KO pour ces facteurs de transcription et une analyse transcriptomique des cellules immunes. L'une des conclusions de ce travail est que BATF et IFR4 se lient précocement lors de la différenciation T<sub>H</sub>17, ils modulent ensuite l'accessibilité de la chromatine ce qui permet le recrutement de RORγt. Suite à ce recrutement, **un ensemble restreint de gènes sont contrôlés directement par RORγt** ; ces onze gènes interviendraient donc dans la différenciation ou la spécificité fonctionnelle des T<sub>H</sub>17. Parmi ces cibles, six étaient déjà connues : l'*Il17a*, l'*Il17f*, l'*Il23r*, *Ccl20*, l'*Il1r1* et *Ltb4r1*. De façon intéressante, le groupe de Dan Littman a pu identifier **cinq nouvelles cibles directes de RORγt** comprenant la *Furin*, *Fam124b*, *2310007l2rik* et les deux gènes homologues qui sont

au cœur de mon sujet de thèse : ***Tmem176a* et *Tmem176b*** (Ciofani et al., 2012). Il est important de noter que cette identification s'inscrit dans une étude de régulation transcriptionnelle extrêmement large des T<sub>H</sub>17. Le groupe de Dan Littman a mis en évidence ces rares gènes mais n'a pas développé d'étude approfondie au regard notamment des cibles nouvellement identifiés. Ainsi, ces gènes ciblés directement par ROR $\gamma$ t sont-ils spécifiquement surexprimés dans les T<sub>H</sub>17 par rapport aux T<sub>H</sub>1 et T<sub>H</sub>2 ? La déficience en l'un de ces gènes a-t-elle un impact sur le développement de pathologies dépendantes de ROR $\gamma$ t ? Ces cinq nouveaux gènes cibles apparaissent donc comme des **candidats potentiels pertinents pour le développement d'approches thérapeutiques originales** dans le cadre des maladies auto-immunes et inflammatoires.

## 2.5. La défense de l'hôte par les T<sub>H</sub>17

Les lymphocytes T<sub>H</sub>17 sont souvent cités pour leurs rôles dans les maladies auto-immunes et inflammatoires tant chez l'homme que dans des modèles murins pathologiques. De façon évidente, la fonction primordiale de la lignée cellulaire T<sub>H</sub>17 n'est certainement pas d'induire des désordres immuns mais de participer, en tant que branche du système immunitaire adaptatif, à la défense contre certains pathogènes au même titre que les T<sub>H</sub>1 et les T<sub>H</sub>2. Les lymphocytes T<sub>H</sub>17 sont spécialisés dans la protection des muqueuses et assurent la protection de l'hôte contre des pathogènes extracellulaires tels que des bactéries (ex. *Citrobacter rodentium*) et des champignons (ex. *Candida albicans*) (Khader et al., 2009) ; (Korn et al., 2009). Il s'agit dans tous les cas de pathogènes dont l'élimination requiert une inflammation massive qui n'est pas gérée correctement par l'immunité T<sub>H</sub>1 ou T<sub>H</sub>2. Ainsi, les signaux induits par l'IL-17 stimulent l'immunité antifongique en favorisant la libération de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires comme CXCL1 et CXCL5 qui conduisent au recrutement des neutrophiles. Dans ce contexte, l'expansion des neutrophiles et leur migration sur le site inflammatoire permettent d'assurer la dégradation des pathogènes en collaboration avec d'autres effecteurs innés comme les macrophages (Conti et al., 2015). De plus, l'IL-22 qui peut être produite par les T<sub>H</sub>17 en réponse à l'IL-23 (Kreymborg et al., 2007) ; (Zheng et al., 2007) agit en synergie avec l'IL-17 pour favoriser la production par les cellules épithéliales des muqueuses de peptides antimicrobiens protecteurs tels que les défensines (Liang et al., 2006).

De façon intéressante, en condition stable (non-pathologique) on trouve la plus forte proportion de cellules  $T_H17$  dans l'intestin et plus particulièrement dans la lamina propria des villosités du petit intestin (Lochner et al., 2008) ; (Ivanov et al., 2006) ; (Ivanov et al., 2008) ; (Ivanov et al., 2009). Par ailleurs, le groupe de Richard Flavell a déterminé qu'un traitement anticorps spécifique du CD3 chez la souris induit une augmentation du nombre et du pourcentage de cellules T dans le petit intestin ; cette hausse prédomine dans la portion duodénale de l'intestin. Suite à ce traitement, 50 à 80% des lymphocytes T  $CD4^+TCR\beta^+$  du duodénum expriment de l'IL-17A ; dans les sections suivantes de l'intestin le pourcentage de  $T_H17$  diminue progressivement pour atteindre un plus faible niveau dans le colon (Esplugues et al., 2011). Notons que le traitement anticorps spécifique du CD3 avait été décrit précédemment comme un modèle de tolérisation in vivo (Chatenoud and Bluestone, 2007) induisant une tempête cytokinique systémique et une inflammation localisée majoritairement dans le petit intestin (Merger et al., 2002). D'autre part, le groupe de Richard Flavell a déterminé qu'une stimulation antigénique différente (peptide MOG<sub>35-55</sub>) est capable d'induire un accroissement similaire des  $T_H17$  dans le petit intestin (Esplugues et al., 2011). Les auteurs de cette étude en concluent que l'accumulation de  $T_H17$  dans l'intestin grêle est un mécanisme général consécutif à une forte stimulation TCR systémique. Des études antérieures avaient mis en évidence que le traitement anticorps anti-CD3 induit une AICD des lymphocytes T (Carpenter et al., 2000) ; les cellules apoptotiques phagocytées conduisant ensuite à une surexpression systémique du TGF $\beta$ 1 et de l'IL-6 sécrétés par les CPA (Perruche et al., 2008). Cet environnement inflammatoire est un terrain propice à la génération de lymphocytes  $T_H17$  qui expriment CCR6, un récepteur de chimiokine essentiel à leur migration (Annunziato et al., 2007). En conséquence, l'IL-17A et l'IL-17F produites par les  $T_H17$  déclenchent la sécrétion de CCL20 (ligand de CCR6) par les cellules épithéliales intestinales et par les  $T_H17$  CCR6<sup>+</sup>. Ce phénomène est à l'origine de l'accumulation spécifique des  $T_H17$  dans l'intestin grêle en réponse au traitement anticorps anti-CD3 (Esplugues et al., 2011). L'ensemble de ces résultats suggère que l'immunité pro-inflammatoire induite par les lymphocytes  $T_H17$  est une composante nécessaire du système immunitaire pour maintenir l'homéostasie de l'hôte avec son microbiote intestinal. Les propriétés pro-inflammatoires des cellules  $T_H17$  ne deviennent pathologiques que dans certains contextes particuliers (ex. infections, immunosuppressions) et/ou lorsque l'hôte présente une susceptibilité génétique favorable à l'induction d'une auto-immunité (Eberl and Sawa, 2010).

En 2000, une première étude *in vitro* a démontré que l'ajout d'un lysat bactérien issu de *Borrelia burgdorferi* (la bactérie responsable de la maladie de Lyme) induisait une production massive d'IL-17 dans des cultures de cellules T en différenciation (Infante-Duarte et al., 2000). Diverses autres bactéries ont ensuite été associées au déclenchement d'une forte réponse  $T_H17$ . Un exemple caractéristique est celui de la bactérie à Gram négatif *Citrobacter rodentium* (un pathogène infectant les muqueuses) qui est utilisée chez la souris pour induire des pathologies gastro-intestinales équivalentes à celles causées chez l'homme par les EPEC « enteropathogenic *Escherichia coli* » et les EHEC « enterohaemorrhagic *Escherichia coli* » (Collins et al., 2014). Dans ce modèle d'infection à *C. rodentium*, la génération de lymphocytes  $T_H17$  au sein de la lamina propria dépend de l'IL-23 et à un rôle de protection de la muqueuse intestinale (Ishigame et al., 2009). De plus, l'IL-22 contribue à la défense précoce de la muqueuse contre *C. rodentium* en induisant la production de protéines antimicrobiennes de la famille Reg par les cellules épithéliales du colon (Zheng et al., 2008). Finalement, une étude récente publiée par le groupe de Matthias Lochner a démontré que les  $T_{REG}$  facilitent l'induction de la réponse  $T_H17$  protectrice contre *C. rodentium* en consommant l'IL-2 présente dans le microenvironnement intestinal ; cette cytokine étant délétère pour la différenciation et la fonctionnalité des cellules  $T_H17$  (Wang et al., 2014).

Au delà de la défense de l'hôte contre les infections bactériennes, les  $T_H17$  assurent aussi une activité antifongique primordiale. Prenons l'exemple de *Candida albicans* : ce champignon unicellulaire (ou levure) appartient normalement à la flore commensale de la cavité buccale et du tractus intestinal et uro-génital. Cependant, chez un individu immunodéprimé (infection par le VIH, traitements immunosuppresseurs, maladies génétiques) *C. albicans* induit des infections cutanéomuqueuses chroniques (CMC) parfois sévères. Il a été observé que plus de 90% des patients VIH<sup>+</sup> sont affectés par une candidose oropharyngée causée par des *Candida* (Dongari-Bagtzoglou and Fidel, 2005). Dans le modèle murin de candidose oropharyngée les lymphocytes  $T_H17$  et le signal dépendant de l'IL-17RA sont nécessaires à la protection de l'hôte contrairement aux lymphocytes  $T_H1$  et à l'IFN $\gamma$  qui n'ont pas d'impact (Farah et al., 2006) ; (Conti et al., 2009). Un autre argument en faveur de l'effet positif causé par la réponse  $T_H17$  est fourni par les observations cliniques effectuées chez les patients atteints du syndrome d'hyper-IgE (HIES) autosomique dominant (ou

syndrome de Job) qui résulte d'une mutation du gène *STAT3*. Comme nous l'avons vu auparavant, le facteur de transcription STAT-3 est primordial lors de la différenciation T<sub>H</sub>17. Il s'avère que ces individus sont extrêmement sensibles aux infections bactériennes (*Staphylococcus aureus*) et aux infections fongiques cutané-muqueuses causées par diverses espèces de *Candida* (Eyerich et al., 2008). De plus, il a été prouvé que les patients atteints du syndrome de Job ne présentent pas de réponse cellulaire T<sub>H</sub>17 spécifique de *S. aureus* et *C. albicans* (Milner et al., 2008). Enfin, une étude randomisée des résultats de deux essais cliniques de phase III comparant l'effet d'anticorps anti-IL-17A ou anti-TNF chez des patients atteints de psoriasis a montré pour l'ixekizumab (l'anti-IL-17A) une augmentation des cas d'infections de type cutané-muqueuses causées par des *Candida* (12 patients sur 727 pour l'anti-IL-17A, 5 sur 702 pour l'anti-TNF et 2 sur 341 pour le placebo). Notons que c'est également cet anticorps neutralisant l'IL-17A qui présente la meilleure efficacité dans le traitement du psoriasis (Griffiths et al., 2015). Ces résultats cliniques illustrent l'équilibre fragile sur lequel repose l'activité lymphocytaire T CD4<sup>+</sup> effectrice qui oscille constamment entre la défense de l'hôte contre les pathogènes et l'induction de pathologies immunes.

De façon contradictoire, il a été démontré dans un modèle d'infection intestinale à *Candida albicans* que l'IL-23 et l'IL-17 exacerbent la pathologie intestinale causée par ce champignon (Zelante et al., 2007). Ces résultats soulignent la possibilité d'un effet néfaste des lymphocytes T<sub>H</sub>17 lors d'une infection fongique et suggèrent que la réponse T<sub>H</sub>17 causée par un même pathogène (*C. albicans*) peut avoir des conséquences ambivalentes en fonction du tissu muqueux infecté et donc du contexte inflammatoire.

## **2.6. Le rôle clé de la flore intestinale**

L'homéostasie intestinale résulte du maintien d'un équilibre immunologique unique entre les bactéries commensales constituant la flore intestinale et le système immunitaire de l'hôte. La muqueuse intestinale est constituée de trois couches : un épithélium directement en contact avec la flore, une couche conjonctive sous-jacente nommée lamina propria contenant les cellules immunitaires de l'hôte et un tissu musculaire profond ou muscularis mucosae. Les cellules épithéliales intestinales (CEI) constituent la barrière physique et chimique qui s'interpose entre le microbiote et l'hôte ; ces cellules sont reliées par des jonctions serrées et sécrètent du mucus ainsi que des peptides antimicrobiens (PAMs). En parallèle de cette fonction protectrice, les CEI jouent aussi le rôle d'intermédiaires en

facilitant l'intégration des signaux émis par la flore pour les transmettre aux cellules immunitaires via la sécrétion de molécules immunes effectrices (Goto and Ivanov, 2013).

En conséquence, les altérations de la communauté de symbiotes intestinaux affectent le système immunitaire de l'hôte et peuvent être à l'origine de dérégulations qui évolueront éventuellement vers des pathologies immunes (Ohnmacht et al., 2011). Les bactéries filamenteuses segmentées (SFB « *segmented filamentous bacteria* » ou *Candidatus arthromitus*) sont un exemple caractéristique de l'influence de la flore bactérienne sur l'homéostasie du système immunitaire. En effet, il a été démontré que les SFB jouent un rôle majeur dans l'induction de la maturation des tissus lymphoïdes, de la réponse IgA et des réponses lymphocytaires T CD4<sup>+</sup> auxiliaires (Talham et al., 1999) ; (Gaboriau-Routhiau et al., 2009). Le groupe de Dan Littman a notamment mis en évidence que les flores intestinales de souris C57BL/6 (B6) provenant de deux élevages distincts présentent des différences qui affectent la différenciation T CD4<sup>+</sup> effectrice ; les souris B6 de chez Taconic ont une flore riche en SFB et une accumulation de T<sub>H</sub>17 intestinaux tandis que celles élevées chez Jackson n'ont pas de SFB et ont un défaut en cellules T<sub>H</sub>17 intestinales (Ivanov et al., 2008). Lorsqu'elles sont présentes, les SFB sont attachées à la surface luminale intestinale des CEI. En conditions stables, l'une des caractéristiques des SFB est donc d'initier la différenciation des cellules T CD4<sup>+</sup> présentes dans la lamina propria du petit intestin en effecteurs T<sub>H</sub>17 (Ivanov et al., 2009). Dans la continuité de ces travaux, le groupe mené par Ivaylo Ivanov a récemment démontré que les macrophages intestinaux présents dans la lamina propria sont les principales CPA's responsables de la génération d'une réponse T<sub>H</sub>17 spécifique des SFB (Panea et al., 2015).

### **3. Les autres acteurs cellulaires de l'immunité de type 17**

Comme nous venons de le voir dans des chapitres précédents, il existe trois principaux sous-types de réponses T CD4<sup>+</sup> adaptatives : les T<sub>H</sub>1, les T<sub>H</sub>2 et les T<sub>H</sub>17. Je me suis attachée à décrire en détail la réponse T<sub>H</sub>17 puisqu'elle dépend de la lignée lymphocytaire T CD4<sup>+</sup> caractérisée par l'expression de ROR $\gamma$ t. Le rationnel étant que les gènes homologues *Tmem176a* et *b* au cœur de mon sujet de thèse font partie des rares cibles directes de ROR $\gamma$ t (Ciofani et al., 2012). Cependant, il existe aussi un pendant immunitaire inné régi par les mêmes facteurs de transcription (T-bet, GATA-3 et ROR $\gamma$ t) que les effecteurs adaptatifs T<sub>H</sub> ; il s'agit des cellules lymphoïdes innées (ILCs « *innate lymphoid cells* ») qui sont réparties en

trois sous-groupes entre les ILC1s, les ILC2s et les ILC3s. La réponse ILC3s dépendante de ROR $\gamma$ t sera décrite en détail dans le troisième paragraphe de ce chapitre.

Le principe clé émergeant des découvertes récentes est que les systèmes immunitaires adaptatif et inné convergent en trois grandes classes d'immunités à médiation cellulaire que l'on peut classer en type 1, type 2 et type 17 (ou type 3). Ces trois catégories d'immunités cellulaires permettent d'assurer l'effet protecteur maximal et le mieux adapté à chaque variété de pathogène rencontrée par l'hôte. La diversité des réponses immunitaires résultantes engendre inévitablement un large panel de désordres immuns possibles.

### **3.1. Les Tc17 : des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> producteurs d'IL-17**

Suite à une stimulation antigénique induite par des pathogènes intracellulaires, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> naïfs se différencient en effecteurs cytotoxiques (CTL ou cellules « Tc ») capables de libérer de la perforine et du granzyme B. Ces CTL sécrètent également des cytokines pro-inflammatoires, principalement de l'IFN $\gamma$  et du TNF $\alpha$  et leur développement dépend des facteurs de transcription T-bet et EOMES (Pearce et al., 2003) ; (Intlekofer et al., 2005). Ces lymphocytes T CD8<sup>+</sup> effecteurs sont aussi nommés Tc1 car ils possèdent un profil cytokinique similaire à celui des T<sub>H</sub>1 et sont, comme ces derniers, induits par T-bet (Annunziato et al., 2015).

De même que pour les cellules T CD4<sup>+</sup>, il existe une dichotomie des CTL entre deux sous-populations Tc1 et Tc2 (Mosmann et al., 1995). Et pareillement aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, cette dichotomie entre Tc1 et Tc2 a été rompue par la mise en évidence d'une troisième sous-population de CTL : les Tc17 qui produisent des cytokines de type 17 (IL-17, IL-21) et expriment des marqueurs caractéristiques du programme T<sub>H</sub>17 tels que ROR $\gamma$ t et l'IL-23R (Kondo et al., 2009). L'existence des CD8<sup>+</sup> Tc17 a été décrite pour la première fois chez des souris présentant une déficience combinée pour les deux gènes *Eomes* et *Tbx21* (Intlekofer et al., 2008). L'engagement des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> vers la voie effectrice Tc17 dépend de STAT-3 et ROR $\gamma$ t et peut s'effectuer en présence de TGF $\beta$ , d'IL-6 et ou d'IL-21. Les Tc17 ont une activité cytotoxique médiocre, expriment faiblement les facteurs de transcription caractéristiques des Tc1 (EOMES, T-bet) et produisent peu ou pas de granzyme B et d'IFN $\gamma$  ; notons que ces cellules ont aussi été détectées dans le modèle murin d'EAE (Intlekofer et al., 2008). Les CTL « classiques » ou Tc1 et les Tc17 surviennent en général de manière mutuellement exclusive tant in vitro que in vivo (Huber et al., 2009).

Les Tc17 sont détectables pendant les infections virales, les pathologies auto-immunes (ex. sclérose en plaque, MICI ou maladies inflammatoires chroniques de l'intestin) et dans les tumeurs (Huber et al., 2009) ; (Hamada et al., 2009) ; (Yen et al., 2009). Une hypothèse possible est que le TGF $\beta$  présent à forte dose dans les microenvironnements tumoraux favoriserait la formation de Tc17 ce qui pourrait être un mécanisme d'échappement tumoral (Mittrucker et al., 2014). Lors de ces pathologies les Tc17 agissent comme de puissants auxiliaires de l'activité lymphocytaire T CD4<sup>+</sup> (Huber et al., 2013). Par exemple, au cours d'une inflammation auto-immune du système nerveux central (SNC) les Tc17 accélèrent la pathogénicité en favorisant l'accumulation dans le SNC de cellules T CD4<sup>+</sup> productrices d'IFN $\gamma$  et d'IL-17A ; ces T<sub>H</sub>17 sont hautement pathogéniques. D'autre part, le groupe de Michael Lohoff a aussi identifié une augmentation significative du pourcentage de Tc17 dans les fluides cérébro-spinaux des patients atteints de sclérose en plaque à un stade précoce (Huber et al., 2013). Les Tc17 pourraient donc jouer un rôle dans l'initiation de cette maladie auto-immune.

### **3.2. Les cellules MAIT et iNKT**

Les cellules MAIT « mucosal-associated invariant T cells » (ou cellules T invariantes associées aux muqueuses) appartiennent comme les iNKT, les ILCs et les cellules T $\gamma\delta$ 17 à la famille des cellules lymphoïdes de type inné. Lors de leur première description en 1999, les cellules MAIT ont été classées dans la catégorie des lymphocytes dits « innate-like ». Contrairement aux lymphocytes T $\alpha\beta$  du système immunitaire adaptatif, les MAIT expriment un TCR semi-invariant qui leur permet de reconnaître des antigènes microbiens non-peptidiques présentés par les molécules du système CMH non classique MR1 « MHC-related protein 1 » (Tilloy et al., 1999). Les cellules MAIT contribuent à la résistance aux infections contre les pathogènes intracellulaires principalement via la production de cytokines T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2 ou T<sub>H</sub>17 à visée pro-inflammatoire (Le Bourhis et al., 2013) ; (Salio et al., 2014). Le phénotype des MAIT est qualifié d'effecteur-mémoire intrinsèque car elles sont capables de sécréter rapidement et en grande quantité des cytokines telles que l'IL-17, le TNF $\alpha$ , l'IFN $\gamma$  ou l'IL-4 (Dusseaux et al., 2011) ; (Rahimpour et al., 2015). Chez l'homme, les MAIT sont abondantes dans le sang, les tissus muqueux, le foie et les articulations ; elles représentent 5% des cellules T totales du sang périphérique (Le Bourhis et al., 2010) ; (Rahimpour et al., 2015) et 20 à 40% des cellules du foie (Billerbeck et al., 2010) ; (Dusseaux et al., 2011). Chez la souris, le



développement des cellules MAIT est sous le contrôle spécifique du facteur de transcription PLZF « promyelocytic leukemia zinc finger protein » (Gerart et al., 2013) et l'expression de ROR $\gamma$ t est essentielle à leur fonctionnalité (Rahimpour et al., 2015). Les auteurs de cette dernière étude ont également démontré que le niveau d'expression de ROR $\gamma$ t peut-être associé à deux grands phénotypes sécrétoires : la majorité des MAIT sont ROR $\gamma$ t<sup>high</sup> et sécrètent principalement de l'IL-17 tandis qu'une minorité de MAIT sont ROR $\gamma$ t<sup>low</sup> T-bet<sup>+</sup> et produisent essentiellement de l'IFN $\gamma$  (Rahimpour et al., 2015). Chez l'homme comme chez la souris, les cellules MAIT sont aussi caractérisées par l'expression indispensable de PLZF et ROR $\gamma$ t (Billerbeck et al., 2010) ; (Dusseaux et al., 2011).

Les cellules iNKT « invariant Natural Killer T cells » partagent un grand nombre de ressemblances avec les cellules MAIT. En effet, les iNKT comme les MAIT permettent de lutter contre les pathogènes intracellulaires notamment via la sécrétion rapide et efficace de cytokines pro-inflammatoires T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2 ou T<sub>H</sub>17 (Le Bourhis et al., 2013) ; (Salio et al., 2014)). De plus, les iNKT sont majoritairement sous la dépendance du même facteur de transcription que les cellules MAIT : PLZF (Gerart et al., 2013). De la même manière que les MAIT, les iNKT reconnaissent des antigènes microbiens non-peptidiques présentés par les molécules d'un système CMH non classique. Cependant à la différence des MAIT, le TCR invariant des iNKT identifie des antigènes lipidiques qui sont liés au CMH non classique CD1d au lieu de MR1. Finalement, les iNKT peuvent être subdivisées en sous-populations comme les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> et les ILCs : les iNKT1, les iNKT2 et les iNKT17 qui sont respectivement sous la dépendance de T-bet, GATA-3 et ROR $\gamma$ t. Les lymphocytes iNKT17 sont évidemment ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>, ils expriment un niveau intermédiaire de PLZF et sécrètent entre autres de l'IL-17 (Gapin, 2016).

### **3.3. Les cellules T $\gamma$ $\delta$ 17**

Les lymphocytes T $\gamma$  $\delta$  constituent la seconde population de cellules T produites par le thymus ; la lignée majoritaire étant celle des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> portant un TCR $\alpha\beta$ . Contrairement aux lymphocytes T $\alpha\beta$ , les cellules T $\gamma$  $\delta$  ne sont pas restreintes à une réponse immunitaire de type adaptatif. En effet, ces lymphocytes T $\gamma$  $\delta$  répondent aux signaux générés lors d'un stress cellulaire ou d'une infection via leur TCR $\gamma\delta$  mais également par le biais d'autres molécules réceptrices (non-TCR). Les cellules T $\gamma$  $\delta$  ont donc fusionné des facultés

immunitaires innées et adaptatives ; elles sont capables de répondre spécifiquement à un antigène mais aussi de façon innée et rapide aux signaux du microenvironnement tels que des cytokines inflammatoires (Bonneville et al., 2010).

Ainsi, bien que l'ensemble des  $T\gamma\delta$  a à priori un potentiel égal à être stimulé par le TCR ou des molécules non-TCR, on distingue cependant deux grandes populations de lymphocytes  $T\gamma\delta$  : les  $T\gamma\delta$  conventionnels qui conservent une forte réactivité TCR et les  $T\gamma\delta$  dits « innate-like » pour lesquels les stimuli innés sont plus importants que les signaux médiés par le  $TCR\gamma\delta$ . Les lymphocytes  $T\gamma\delta$  « innate-like » peuvent eux-mêmes être scindés en deux groupes selon leurs propriétés cytokiniques : les  $T\gamma\delta$  producteurs d'IFN $\gamma$  ( $T\gamma\delta$ -IFN $\gamma$ ) et les  $T\gamma\delta$  producteurs d'IL-17 ( $T\gamma\delta$ 17). Indépendamment de leur production de cytokines les lymphocytes  $T\gamma\delta$  « innate-like » peuvent aussi être distingués selon l'expression du CD27 : les  $T\gamma\delta$ -IFN $\gamma$  sont CD27<sup>+</sup> tandis que les  $T\gamma\delta$ 17 sont CD27<sup>-</sup> (Ribot et al., 2009). Désormais, il apparaît de plus en plus clairement que les  $T\gamma\delta$  « innate-like » jouent un rôle crucial dans le développement des réponses immunes tant protectrices que pathogéniques (maladies inflammatoires et auto-immunes).

Au cours de mon travail de thèse, je me suis principalement focalisée sur l'étude des  $T\gamma\delta$ 17 puisqu'ils dépendent comme les lymphocytes  $T_H$ 17 du facteur de transcription ROR $\gamma$ t. Suite à une stimulation de type inné combinant l'IL-1 $\beta$  et l'IL-23, ces  $T\gamma\delta$ 17 sont capables de produire de l'IL-17A, de l'IL-17F ainsi que de l'IL-21, de l'IL-22, de l'IFN $\gamma$  et du GM-CSF (Sutton et al., 2009) ; (Barros-Martins et al., 2016). D'autre part, l'implication des lymphocytes  $T\gamma\delta$ 17 et leurs effets aussi bien protecteurs que délétères ont été établis dans de nombreux modèles murins pathologiques tels que l'EAE, le psoriasis et les maladies inflammatoires de l'intestin. En résumé, les  $T\gamma\delta$ 17 ont été démontrés comme favorisant la progression de la maladie dans les modèles d'EAE et de lésions psoriasiformes (Imiquimod - Aldara™) tandis qu'ils sont la source majeure d'IL-17 protectrice intestinale dans le modèle DSS (dextran sulfate de sodium) d'inflammation colique aiguë (Sutton et al., 2009) ; (Cai et al., 2011) ; (Pantelyushin et al., 2012) ; (Lee et al., 2015a).

### 3.4. Identification des « innate lymphoid cells » (ILCs)

Les « innates lymphoid cells » (ILCs) ont été premièrement identifiées sur la base de leur capacité à induire des réponses immunitaires innées essentielles face à différentes classes de pathogènes. Ces cellules ne portent pas de TCR, elles ne peuvent donc pas produire une réponse spécifique d'un antigène particulier. Les ILCs fournissent des réponses rapides face aux cytokines et aux divers signaux microbiens auxquels elles sont exposées. Elles n'expriment pas les principaux marqueurs de surface connus associés aux lignées cellulaires immunes T, B, myéloïdes et granulocytaires et sont donc identifiées par cette absence d'expression des marqueurs caractérisant les autres lignées immunes, d'où la classification  $\text{Lin}^-$  pour « lineage-negative ». Cependant, les ILCs ont une morphologie de type lymphoïde et expriment de façon variable la chaîne  $\gamma$  commune ( $\gamma\text{c}$  ou CD132), l'IL-7R $\alpha$  (CD127).

Par ailleurs, les ILCs produisent un grand nombre de cytokines pro-inflammatoires et immuno-régulatrices associées aux lymphocytes effecteurs T CD4<sup>+</sup> (Sonnenberg et al., 2012). En 2013, un consortium d'experts a proposé une nouvelle nomenclature basée sur la faculté des ILCs à sécréter des cytokines de type T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2 ou T<sub>H</sub>17 (Spits et al., 2013). Les auteurs de cette classification ont décidé de regrouper sous le terme de cellules lymphoïdes innées (ILC) les ILCs ainsi que les cellules NK et les cellules LTI. En effet, les cellules NK et LTI, identifiées respectivement en 1975 (Kiessling et al., 1975b) ; (Kiessling et al., 1975a) ; (Pross and Jondal, 1975) et en 1997 (Mebius et al., 1997), sont les membres prototypiques de la famille ILCs. En résumé, la nomenclature de 2013 divise les cellules lymphoïdes innées (ILCs) en trois grandes sous-populations en miroir des polarisations T dominantes:

- ILCs du groupe 1 (cytokines T<sub>H</sub>1, T-bet<sup>+</sup>) = cellules NK et ILC1s
- ILCs du groupe 2 (cytokines T<sub>H</sub>2, GATA-3<sup>+</sup>) = ILC2s
- ILCs du groupe 3 (cytokines T<sub>H</sub>17, ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>) = ILC3s incluant les LTI

Notons que par défaut, les ILCs des trois groupes sont nommées ILC1s, ILC2s et ILC3s. Ces ILCs modulent localement, et relativement rapidement en comparaison avec les réponses T<sub>H</sub>, les réponses de type inné des cellules épithéliales, des macrophages et des granulocytes et jouent un rôle crucial dans la régulation de l'immunité adaptative. Lors d'une infection, les réponses rapides et efficaces induites par les ILCs permettent d'orchestrer l'inflammation aiguë et donc de promouvoir l'immunité anti-infectieuse. De la même manière que les

effecteurs  $T_H$ , chaque type d'ILCs prend en charge des catégories spécifiques d'agents pathogènes, donc voici quelques exemples chez la souris :

- ILC1s : pathogènes intracellulaires = bactéries et protozoaires (ex. *Toxoplasma gondii*),
- ILC2s : parasites multicellulaires typiquement extracellulaires = helminthes (ex. *Nippostrongylus brasiliensis* et *Trichuris muris*),
- ILC3s : bactéries et champignons extracellulaires (ex. *Citrobacter rodentium* et *Candida albicans*).

### 3.5. Les « innate lymphoid cells » de type 3 (ILC3s)

Dans le cadre de mon travail de thèse, je me suis intéressée plus particulièrement à l'étude des ILC3s. Plusieurs équipes ont reporté presque simultanément l'existence d'une population de cellules lymphoïdes intestinales qui expriment le récepteur d'activation des cellules NK (NKp46) mais qui portent peu de ressemblances fonctionnelles avec ces cellules (Sato-Takayama et al., 2008) ; (Luci et al., 2009) ; (Sanos et al., 2009). À l'instar des  $T_H17$ , les ILC3s dépendent du facteur de transcription ROR $\gamma$ t pour leur développement et leur fonctionnalité. Ces ILC3s ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> NKp46<sup>+</sup> produisent notamment de l'IL-22 et non pas des effecteurs cytotoxiques (perforine et granzyme) comme les cellules NK. De plus, des approches de « fate-mapping » ont démontré que ces ILC3s ont un développement distinct de celui des cellules NK conventionnelles (Sato-Takayama et al., 2008) ; (Vonarbourg et al., 2010). Les deux groupes de recherche précédents ont aussi mis en évidence que les ILC3s résident principalement dans les tissus muqueux et plus spécifiquement dans la lamina propria intestinale. À ce niveau, les ILC3s jouent un rôle crucial dans la régulation de l'équilibre délicat qui existe entre le microbiote symbiotique et le système immunitaire intestinal de l'hôte (Walker et al., 2013).

Des études récentes ont permis de clarifier le système de différenciation aboutissant à la formation des ILCs et plus particulièrement des ILC3s (Sonnenberg and Artis, 2015) (**Figure 5**). Les cellules à l'origine de leur développement sont les progéniteurs lymphoïdes communs (CLP) (Constantinides et al., 2014) ; (Klose and Diefenbach, 2014) qui résident dans la moelle osseuse et donnent naissance à trois types de précurseurs : les précurseurs des cellules NK (NKp), les précurseurs des ILCs (CHILP « common helper innate lymphoid precursors ») et les

précurseurs des lignées lymphocytaires B et T. Par la suite, les CHILP évoluent eux-mêmes dans deux directions : celle des progéniteurs de cellules LTi (Cherrier, 2014) et celle des progéniteurs d'ILCs (ILCp). L'étape d'orientation des CHILP en ILCp nécessite notamment l'expression des facteurs de transcription GATA-3 (Yagi et al., 2014) ; (Serafini et al., 2014) et PLZF (Constantinides et al., 2014). Se sont ces ILCp qui se différencient ensuite en ILC1s, ILC2s ou ILC3s sous l'action des stimuli présents dans le microenvironnement qui induisent l'expression spécifique de facteurs de transcription clés.

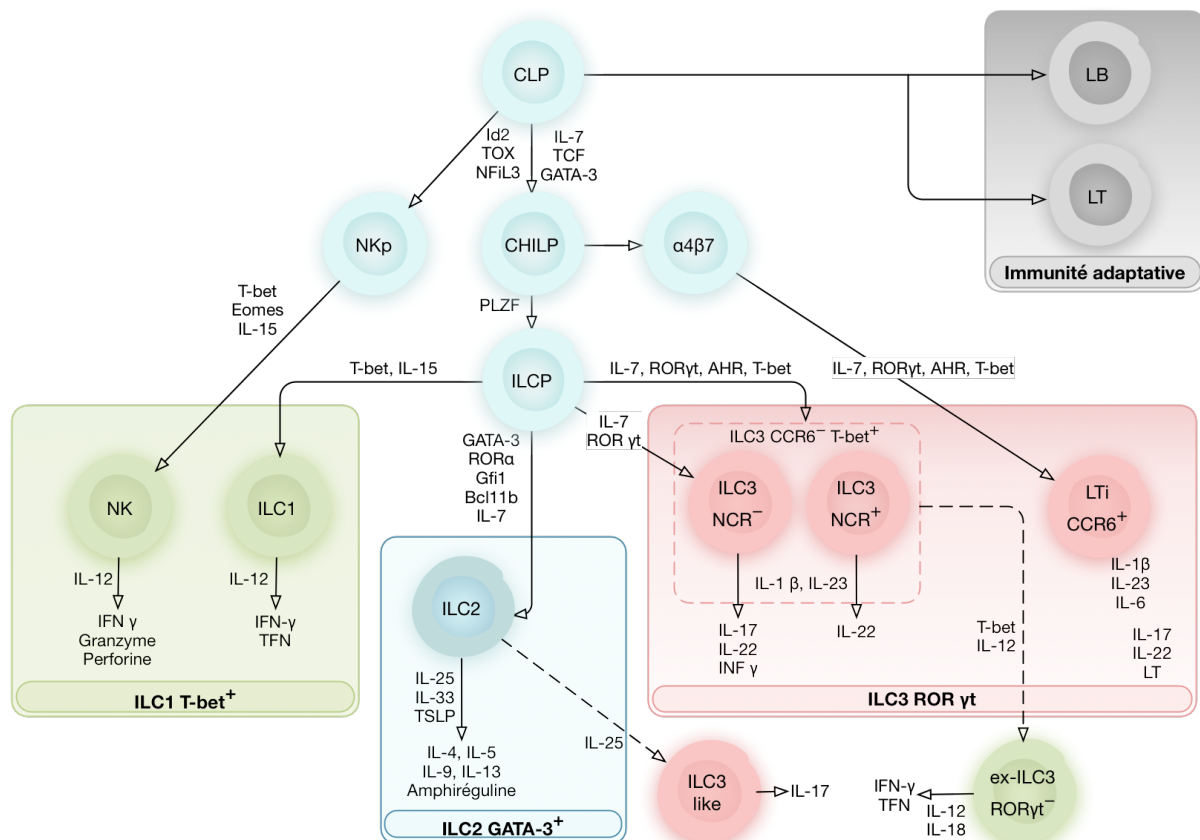


Figure 5 Développement et spécificité cytokinique des trois groupes de cellules lymphoïdes innées ILC1s, ILC2s et ILC3s.

(Figure réalisée selon Sonnenberg & Artis. *Nature Medicine*. 2015).

À ce stade, le développement des ILC3s dépend alors principalement de RORγt et AhR (Aryl hydrocarbon receptor) et se fait en présence d'IL-7 et des signaux induits par le microbiote. Contrairement aux cellules LTi, les ILC3s RORγt<sup>+</sup> dont la différenciation nécessite l'induction précoce de PLZF sont déficientes en CCR6. Ces ILC3s RORγt<sup>+</sup> CCR6<sup>-</sup> expriment à des niveaux variables les NCRs (natural cytotoxicity receptors) tels que NKp44 et NKp46 (Vonarbourg et al., 2010) ; (Kiss et al., 2011) ; (Lee et al., 2012a) ; (Qiu et al., 2012). Ainsi, parmi les ILC3s

ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> CCR6<sup>-</sup> on distingue deux grandes sous-populations : les ILC3s NCR<sup>-</sup> et les ILC3s NCR<sup>+</sup>. Cette hétérogénéité au sein des ILC3s ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> CCR6<sup>-</sup> est sous la dépendance de T-bet qui contrôle notamment l'expression de Nkp46 (Klose et al., 2013). En présence d'IL-1 $\beta$  et d'IL-23, ces deux populations d'ILC3s sécrètent des cytokines diverses telles que l'IL-17, l'IL-22 et l'IFN $\gamma$  (Sato-Takayama et al., 2008) ; (Cella et al., 2009) ; (Sanos et al., 2009).

En conditions non-pathologiques dans l'intestin et les tissus lymphoïdes associés, tant chez l'homme et les primates non humains que chez la souris, les ILC3s NCR<sup>+</sup> sont la source dominante d'IL-22. Notons que la colonisation de l'intestin par la flore commensale exerce une influence considérable sur cette production cytokinique (Sonnenberg and Artis, 2012). L'IL-22 libérée par les ILC3s agit presque exclusivement sur des cellules non-hématopoïétiques telles que les cellules épithéliales intestinales (CEI) et stimule leur production de peptides antimicrobiens (RegIII $\gamma$  et RegIII $\beta$ ) et de mucus (Muc1, 3, 10 et 13) (Sonnenberg et al., 2011). De plus, il a été démontré chez la souris que l'IL-22 favorise la colonisation de l'intestin par des bactéries commensales diverses et bénéfiques qui protègent l'hôte contre les infections et les inflammations intestinales. En effet, l'IL-22 induit la glycosylation et la fucosylation via *Fut2* des CEI ; ce phénomène fournit une source de sucre au microbiote bénéfique ce qui limite la croissance des bactéries pathogènes et opportunistes (Pham et al., 2014) ; (Goto et al., 2014) ; (Pickard et al., 2014). En conclusion, la production d'IL-22 par les ILC3s qui requiert entre autres le maintien de l'expression d'Id2 ainsi que la régulation des voies de l'IL-23R et de l'Ahr est indispensable au contrôle de la composition du microbiote intestinal ; notamment via l'induction efficace de peptides antimicrobiens qui résulte en général de l'action synergique de l'IL-22 et l'IL-17 (Guo et al., 2015) ; (Sonnenberg et al., 2011).

La production d'IL-22 n'est pas le seul mécanisme par lequel les ILC3s exercent une action sur leur environnement. Comme nous venons de le voir, les ILC3s sont capables de réguler la flore intestinale mais à l'inverse les bactéries commensales de l'intestin sont aussi en mesure d'influencer l'activité de ces cellules innées. Le groupe de Miriam Merad a récemment démontré que la capture des signaux microbiens par les macrophages qui résident dans la muqueuse intestinale stimule leur production d'IL-1 $\beta$ . L'IL-1 $\beta$  libéré par ces cellules phagocytaires se fixe sur l'IL-1R porté par les ILC3s qui sécrètent en conséquence de grandes quantités de GM-CSF. Le GM-CSF produit module en retour l'homéostasie des cellules

myéloïdes et induit la génération de réponses cellulaires T<sub>REG</sub> CD4<sup>+</sup> vis-à-vis des antigènes alimentaires dans l'intestin (Mortha et al., 2014). Ce phénomène est à l'origine du maintien de la tolérance orale aux antigènes alimentaires.

Par ailleurs, il a été démontré que les ILC3s ROR $\gamma$ <sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup> qui correspondent aux cellules LTi de l'ancienne nomenclature expriment le CMH-II et sont capables de présenter des antigènes. La présentation antigénique assurée par les ILC3s ROR $\gamma$ <sup>+</sup> CMH-II<sup>+</sup> n'induit pas de prolifération des cellules T CD4<sup>+</sup> mais au contraire inhibe les réponses lymphocytaires dirigées contre les bactéries commensales. Chez la souris, la déplétion spécifique de cette population d'ILC3s favorise le déclenchement d'une inflammation intestinale. Les ILC3s CMH-II<sup>+</sup> limitent les réponses T CD4<sup>+</sup> pathogéniques par des interactions directes avec ces lymphocytes spécifiques des bactéries commensales (Hepworth et al., 2013). Dans la continuité de ce travail, l'équipe de Gregory Sonnenberg a pu établir que les ILC3s CMH-II<sup>+</sup> induisent la mort des cellules T CD4<sup>+</sup> activées par les bactéries commensales de l'intestin. A l'image de la « sélection thymique », les auteurs de l'étude proposent de nommer ce mécanisme d'élimination des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> pathogéniques la « sélection intestinale ». Dans ce modèle, les ILC3s jouent un rôle similaire à celui des cellules thymiques épithéliales (TEC) qui suppriment les lymphocytes T auto-réactifs. De plus, ces résultats chez la souris peuvent être corrélés à des observations effectuées dans des pathologies humaines puisqu'il s'avère que le nombre d'ILC3s CMH-II<sup>+</sup> coliques est diminué chez des patients atteints de MICI (Hepworth et al., 2015).

#### **4. Les pathologies associées à l'immunité de type 17**

L'implication des lymphocytes T<sub>H</sub>17 et plus largement de l'ensemble de cellules immunes innées ou adaptatives dépendantes de ROR $\gamma$  a été mise en évidence dans de multiples pathologies inflammatoires et auto-immunes humaines incluant notamment la sclérose en plaques, l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis et les maladies inflammatoires de l'intestin comme la maladie de Crohn. Afin d'élucider les mécanismes par lesquels ces divers acteurs cellulaires exercent leur pathogénicité il est primordial de disposer de bons modèles d'études de ces pathologies. Au cours de ma thèse, j'ai utilisé plusieurs modèles murins pathologiques qui ont été des outils précieux pour explorer le rôle joué par les homologues *Tmem176a* et *Tmem176b* dans le développement de certaines maladies immunitaires dépendantes de ROR $\gamma$ .

#### 4.1. Le modèle EAE « experimental autoimmune encephalomyelitis » de neuro-inflammation auto-immunitaire

L'EAE est le modèle murin de la sclérose en plaque (SEP) humaine le plus communément utilisé. Dans l'EAE comme dans la SEP, on observe des lésions tissulaires caractéristiques telles que des altérations de la barrière hémato-encéphalique, des infiltrats de cellules inflammatoires dans le système nerveux central (SNC), des démyélinisations et des pertes axonales. La neuro-inflammation induite dans le modèle EAE est initialement causée par l'induction de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> auto-réactifs spécifiques de composants de la myéline. Pour cela, dans le modèle le plus couramment utilisé dans le fond génétique C57BL/6, les souris reçoivent une immunisation sous-cutanée associant le peptide MOG<sub>35-55</sub> dérivé d'une glycoprotéine de la gaine de myéline des oligodendrocytes (ou « myelin oligodendrocyte glycoprotein ») émulsifié avec un adjuvant, le CFA « complete Freund adjuvant » qui contient des composants mycobactériens inactivés (Stromnes and Goverman, 2006). La présentation de l'antigène aux cellules T CD4<sup>+</sup> naïves dans ce contexte inflammatoire les oriente vers une différenciation en effecteurs T<sub>H</sub> pathogéniques. Cependant pour déclencher la pathologie chez des souris C57BL/6 il est indispensable de leur administrer également un co-adjuvant qui potentialise la réponse immune contre le peptide MOG<sub>35-55</sub>. Ce co-adjuvant est la PTX (ou « Pertussis toxin ») : une exotoxine dérivée de la bactérie *Bordetella pertussis* (Levine and Sowinski, 1973) ; (Bettelli et al., 2003). Il se pourrait que la PTX joue le rôle de substitut des facteurs environnementaux qui déclenchent probablement la SEP chez certains individus génétiquement prédisposés (Lin et al., 2016). L'importance des facteurs environnementaux est aussi illustrée par le fait que les réponses cellulaires T<sub>H</sub> effectrices et régulatrices observées dans l'EAE et la SEP sont fortement influencées par les micro-organismes pathogènes et commensaux (Berer and Krishnamoorthy, 2014).

Jusqu'à la découverte de l'IL-23 (Oppmann et al., 2000), les équipes de recherche supposaient que la progression de la pathologie EAE était causée par les T<sub>H</sub>1 et de ce fait médiée par l'IL-12. Comme nous l'avons déjà vu, cette confusion résulte de l'existence d'une sous-unité commune entre l'IL-12 et l'IL-23 : la sous-unité p40. Ainsi, en pensant inhiber l'IL-12 via le ciblage de la sous-unité p40 les chercheurs se méprenaient et observaient en réalité les conséquences de l'inhibition de l'IL-23. Deux groupes ont révélé cette confusion en identifiant l'IL-23 comme étant la cytokine responsable de la maladie EAE (Becher et al., 2002) ; (Cua et al., 2003). Il a ensuite été décrit que l'IL-23 permet la différenciation



terminale des lymphocytes T<sub>H</sub>17 qui constituent la principale population encéphalitogénique impliquée dans l'EAE (Aggarwal et al., 2003) ; (Park et al., 2005) ; (Ivanov et al., 2006). Ces T<sub>H</sub>17 sont notamment réputés pour leur production d'IL-17A, d'IL-17F, d'IL-21 et d'IL-22 (Littman and Rudensky, 2010). Au début des années 2000, une nouvelle contradiction s'est imposée aux équipes de recherche : aucune des cytokines précédemment citée n'est obligatoire pour le développement de l'EAE mais la neuro-inflammation est provoquée par ROR $\gamma$ t et l'IL-23 qui sont caractéristiques des T<sub>H</sub>17. C'est l'analyse de la signature moléculaire des cellules T encéphalitogéniques qui a permis d'identifier le GM-CSF comme étant la cytokine clé impliquée dans l'EAE et sécrétée par les T<sub>H</sub>17 en réponse à l'IL-23 (Langrish et al., 2005) ; (Kreymborg et al., 2007). Lorsque l'on neutralise (ciblage anticorps) ou élimine (souris KO) le GM-CSF, les souris deviennent très fortement résistantes à l'induction de l'EAE (McQualter et al., 2001) ; (Ponomarev et al., 2007). De plus, il a été démontré que la production de GM-CSF par les T<sub>H</sub>17 pathogéniques qui pénètrent le SNC est requise pendant la phase effectrice de l'EAE ; le GM-CSF cible les cellules myéloïdes qui à leur tour font la promotion d'une inflammation soutenue dans le SNC (Codarri et al., 2011).

Depuis quelques années, un nouveau concept s'impose et ce notamment grâce à l'étude du modèle EAE : il existe un spectre de phénotypes chez les T<sub>H</sub>17 et ces phénotypes divers sont associés à des potentiels inflammatoires variés. Les sous-populations T<sub>H</sub>17 diffèrent dans certains de leurs besoins développementaux et ont des fonctions effectrices distinctes (Peters et al., 2011). Ainsi, bien que l'ensemble des T<sub>H</sub>17 soit initialement sous la dépendance de ROR $\gamma$ t, du TGF $\beta$  et de l'IL-6 et qu'ils soient tous capables de produire de l'IL-17A, on peut cependant distinguer deux grandes sous-populations (**Figure 6**) :

- Les T<sub>H</sub>17 induits uniquement par le TGF $\beta$  et l'IL-6 produisent spécifiquement de l'IL-10 mais aussi de l'IL-9, de l'IL-17F et de l'IL-22. Ces T<sub>H</sub>17 sont de faibles inducteurs d'inflammation et ont des propriétés régulatrices médiées par l'IL-10 (Ghoreschi et al., 2010) ; (Lee et al., 2012b).
- Les T<sub>H</sub>17 dépendants de l'IL-23 sécrètent spécifiquement du GM-CSF, de l'IFN $\gamma$  et du TNF- $\alpha$  et ont des fonctions pathogéniques notamment dans l'EAE (El-Behi et al., 2011) ; (Codarri et al., 2011) ; (Hirota et al., 2011) ; (Haines et al., 2013).

L'hypothèse émise pour expliquer ces divergences phénotypiques est que ces deux pans de l'immunité  $T_H17$  auraient évolué ainsi pour coordonner différents domaines de l'immunité protectrice (**Figure 6**) (Gaffen et al., 2014) :

- Les  $T_H17$  producteurs d'IL-10 grâce à leurs propriétés régulatrices et à leurs faibles capacités inflammatoires maintiennent l'intégrité des barrières tissulaires comme celle de la muqueuse intestinale (McGeachy et al., 2007) ; (Esplugues et al., 2011) ; (Hirota et al., 2013).
- Les  $T_H17$  producteurs de GM-CSF et d'IFN $\gamma$  de par leur fort potentiel inflammatoire sont impliqués dans la promotion de l'inflammation antimicrobienne au cours des infections bactériennes et fongiques persistantes (Chackerian et al., 2006) ; (Kleinschek et al., 2006).

Enfin une étude récente réalisée par le groupe de Shaun McColl a permis d'établir un profil caractéristique pour ces deux sous-populations  $T_H17$  sur la base de l'expression différentielle du récepteur de chimiokines CCR2 (Kara et al., 2015). Les fonctions migratoires des cellules  $T_H$  effectrices sont déterminées pendant leur différenciation via l'induction de récepteurs de chimiokines spécifiques. Ainsi, l'ensemble des lymphocytes  $CD4^+ T_H17$  et  $T_{REG}$  exprime le récepteur CCR6 (Yamazaki et al., 2008). L'hypothèse explicative émise est que le partage d'un même potentiel migratoire permettrait aux  $T_{REG}$  de contrôler les inflammations superflues et potentiellement dommageables que pourraient causer les  $T_H17$  (Comerford et al., 2010). Par ailleurs, d'autres récepteurs interviennent dans la migration des  $T_H17$  ; il a été démontré que le recrutement des  $T_H17$  pathogéniques dans le SNC ne dépend pas de CCR6 (Elhofy et al., 2009) ; (Villares et al., 2009) mais est sous le contrôle de CCR2 (Kara et al., 2015). Ainsi, les  $T_H17$  pathogéniques qui produisent du GM-CSF et de l'IFN $\gamma$  sont  $CCR2^+CCR6^+$  tandis que les  $T_H17$  faiblement inflammatoires producteurs d'IL-10 sont  $CCR2^-CCR6^+$  (**Figure 6**) (Kara et al., 2015).





Sous-populations $T_H17$	Développement dépendant de l'IL-23	Production cytokinique	Immunité protectrice	Propriétés inflammatoires	Pathogénicité (ex. EAE)
CCR6 ROR $\gamma$ t <sup>+</sup> T-bet <sup>-</sup>		IL-17A/F IL-22 IL-9 IL-10	Protection des barrières épithéliales	Faibles	
CCR6 CCR2 ROR $\gamma$ t <sup>+</sup> T-bet <sup>+</sup>		IL-17A GM-CSF IFN- $\gamma$ TNF- $\alpha$	Protection contre les infections bactériennes et fongiques persistantes	Fortes	

Figure 6 Les deux sous-populations  $T_H17$  pathogéniques ou non dans l'EAE.

Les  $T_H17$  CCR2<sup>-</sup>CCR6<sup>+</sup> qui sécrètent de l'IL-10 sont plutôt régulateurs de l'inflammation tandis que les  $T_H17$  CCR2<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup> produisent du GM-CSF et de l'IFN $\gamma$  et sont pathogéniques entre autres dans l'EAE (Figure réalisée selon Kara et al. *Nature Communication*. 2015).

#### 4.2. Le modèle imiquimod d'inflammation cutanée analogue au psoriasis

Le psoriasis est une maladie chronique inflammatoire de la peau qui affecte 2 à 3% de la population mondiale. Cette maladie est caractérisée par des lésions cutanées au sein desquelles on observe une prolifération excessive (acanthose) et une différenciation aberrante des kératinocytes ainsi que des infiltrats de lymphocytes T et B, de neutrophiles et de cellules dendritiques (DCs) (Wagner et al., 2010). Le psoriasis résulte d'une interaction pathogénique active entre la peau et le système immunitaire de l'individu atteint (Nestle et al., 2009). Comme pour toutes les maladies inflammatoires et auto-immunes, la susceptibilité d'un individu face au développement de cette maladie dépend d'une conjonction entre des facteurs environnementaux facilitateurs et des prédispositions génétiques. Les lésions psoriasisiformes peuvent aussi être la conséquence secondaire d'un traitement attribué à d'autres pathologies. En effet, il s'est avéré que la crème Aldara™ utilisée pour le traitement local des cancers cutanés non-mélanomes provoque chez certains patients une dermatite psoriasisiforme (Gilliet et al., 2004) ; (Fanti et al., 2006). Notons que l'Aldara™ contient 5% d'imiquimod (ou IMQ) un agoniste du TLR7/8 qui a été associé à l'induction de ces lésions secondaires.

En 2009, le groupe d'Erik Lubberts a mis à profit le constat précédent pour développer un modèle murin de dermatite psoriasiforme basé sur l'application quotidienne d'Aldara™ sur la peau du dos et les oreilles des animaux (van der Fits et al., 2009). La pathologie induite chez les souris présente de nombreux signes cliniques en commun avec le psoriasis humain : épaissement, présence d'écaillés, érythème, acanthose, différenciation cellulaire anormale, néoangiogénèse, infiltrats de neutrophiles, de cellules T, de DCs CD11c<sup>+</sup> et de pDCs. D'autres part, les auteurs de cette étude ont décrit une induction de l'expression épidermique d'IL-23, d'IL-17A et d'IL-17F et une dépendance vis à vis de ces cytokines puisque leur blocage réduit le développement de la dermatite psoriasiforme (van der Fits et al., 2009).

La signature cytokinique T<sub>H</sub>17 joue donc un rôle prédominant dans l'induction du psoriasis cependant ce sont les lymphocytes T $\gamma\delta$  et non pas les T<sub>H</sub>17 qui sont la source majeure d'IL-17A/F et d'IL-22 (Pantelyushin et al., 2012). Les ILCs ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> ont aussi une implication dans l'induction de cette maladie puisque les souris *Rag2*<sup>-/-</sup> ayant subi un traitement IMQ sont capables de développer une pathologie, bien que celle-ci soit moins sévère que chez les souris WT. De plus, la présence d'IL-22 demeure détectable chez les animaux *Rag2*<sup>-/-</sup> traités avec de l'IMQ (Pantelyushin et al., 2012) ; (Van Belle et al., 2012). Les lymphocytes T $\gamma\delta$  à l'origine de la pathologie sont dépendants de l'IL-23 et appartiennent aux T $\gamma\delta$ 17 « innate-like » CD27<sup>-</sup> (Ribot et al., 2009). Ces lymphocytes expriment faiblement le TCR  $\gamma\delta$  et ont donc été nommés cellules T $\gamma\delta$ -low ou cellules T GDL (Mabuchi et al., 2011). Les cellules T $\gamma\delta$ 17 sont retrouvées dans le derme murin et humain lors d'une dermatite psoriasiforme ; en effet ces cellules T $\gamma\delta$ 17 sont présentes à une fréquence élevée dans les lésions psoriasiques humaines (Cai et al., 2011). Les T $\gamma\delta$ 17 V $\gamma$ 4<sup>+</sup> sont à opposer aux lymphocytes T $\gamma\delta$  V $\gamma$ 5<sup>+</sup> résidents dans l'épiderme murin normal et qui n'expriment pas de significativement l'IL-17A et l'IL-22 (Gray et al., 2013). De façon intéressante, il a récemment été démontré que chez la souris suite à une stimulation Aldara™ les lymphocytes T $\gamma\delta$  responsables de la dermatite psoriasiforme sont capables d'établir une mémoire à long terme dans le derme. Ces cellules T V $\gamma$ 4<sup>+</sup> V $\delta$ 4<sup>+</sup> de type mémoire ont des fonctions effectrices supérieures et induisent une inflammation secondaire plus forte lors d'un second traitement (Hartwig et al., 2015). Cette mémoire quasi-innée est en cohérence avec les observations cliniques effectuées chez l'homme et

pourrait expliquer les rechutes et la chronicité constatées chez les patients atteints de psoriasis.

L'étiologie du psoriasis n'est pas complètement comprise mais on sait que la prévalence de cette maladie est supérieure dans les pays industrialisés (Parisi et al., 2013) et que le microbiote exerce en général une forte activité régulatrice sur l'induction des maladies auto-immunes (Perera et al., 2012). Une étude datée de 2015 apporte une nouvelle preuve à l'appui de cette hypothèse : les auteurs de ce travail ont démontré que le traitement antibiotique néonatal de souris provoque une dysbiose du microbiote intestinal et cutané chez ces animaux à l'âge adulte. Lorsque l'on soumet ces souris à un traitement IMQ, on constate une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules  $T\gamma\delta$  qui entraîne une exacerbation du psoriasis par rapport à des animaux n'ayant pas reçu de traitement antibiotique à un âge juvénile. Ces résultats renforcent la pertinence d'une transposition de ce type de recherche chez l'homme (Zanvit et al., 2015).

Le développement du psoriasis dépend de façon critique de l'axe IL-23/IL-17/IL-22. Les approches thérapeutiques testées en clinique sont donc basées sur le blocage de certains de ces médiateurs inflammatoires via l'administration d'anticorps tels que l'IL-12/23 anti-p40 (ou ustekinumab) et l'anti-IL-17A (ou secukinumab). De façon importante, ces deux traitements anticorps sont capables de diminuer très efficacement la gravité des lésions psoriasiques ; par ailleurs une étude randomisée publiée en 2015 suggère que l'efficacité du secukinumab serait supérieure à celle de l'ustekinumab (Langley et al., 2014) ; (Thaci et al., 2015).

#### **4.3. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)**

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (ou MICI) sont caractérisées par l'inflammation de la paroi du tube digestif en lien avec une hyperactivité du système immunitaire. Les MICI regroupent la maladie de Crohn et la recto-colite hémorragique qui sont toutes deux des maladies débilitantes pour lesquelles il n'existe pas de traitement curatif. Les patients atteints de MICI passent par une alternance de phases de poussées inflammatoires (fièvre, diarrhée, saignements, crampes et pertes de poids) et de rémissions (Abraham and Cho, 2009). Notons qu'au cours des dernières décennies, l'incidence des MICI a augmenté de façon constante (Xavier and Podolsky, 2007). Comme nous l'avons déjà évoqué, le développement de ce type de maladies inflammatoires est fortement lié à la

conjonction entre des facteurs génétiques prédisposant et des facteurs environnementaux variés et est associé à une dérégulation du microbiote intestinal (Manichanh et al., 2012).

Les causes initiales à l'origine des MICI sont encore mal comprises. Cependant, l'IL-23 a été clairement identifiée comme étant l'un des acteurs favorisant les mécanismes d'immuno-pathogénicité. Ainsi, dans la maladie de Crohn, les SNPs (single-nucleotide polymorphism) du locus de l'*IL-23R* sont associés de façon négative avec la maladie. De plus, des patients présentant une maladie de Crohn active ont montré un nombre supérieur de cellules exprimant l'IL-23 et l'IL-17A dans la lamina propria intestinale (Holta et al., 2008). Néanmoins, de plus en plus d'évidences suggèrent que l'IL-23 et l'IL-17 ont des effets opposés dans leurs contributions aux immuno-pathologies intestinales. En effet, il a été démontré que l'IL-23 qui assure notamment la différenciation terminale et l'expansion des T<sub>H</sub>17 effecteurs fortement pathogènes, orchestre la chronicité et la sévérité des pathologies dans des modèles murins d'EAE et de MICI (Park et al., 2005) ; (Yen et al., 2006) ; (McGeachy et al., 2009). Au contraire, il a été suggéré que l'IL-17A remplisse plutôt un rôle de maintien de la fonction de la barrière épithéliale intestinale (Kinugasa et al., 2000).

Les études chez l'homme ainsi que chez les modèles animaux de colites ont permis d'établir que la régulation des processus inflammatoires à l'origine des MICI est étroitement liée à l'activité des cellules ROR $\gamma$ <sup>+</sup>. Le modèle murin de colite au DSS a été exploité par de nombreuses équipes de recherche pour élucider les mécanismes cellulaires mis en jeu lors d'une inflammation colique aiguë. Dans ce modèle qui mime la pathologie humaine de recto-colite hémorragique, les animaux sont abreuvés pendant plusieurs jours consécutifs avec de l'eau additionnée de dextran sulfate de sodium (DSS). Ce composé induit de sérieuses lésions de la muqueuse intestinale essentiellement au niveau du colon et du rectum des animaux traités (Wirtz et al., 2007). Dans ce modèle de colite aiguë, la pathologie peut être schématiquement divisée en deux phases :

- Une phase initiale d'attaque de la muqueuse intestinale (le traitement dure en général 5 jours) : lors de cette étape le DSS provoque l'apparition de lésions tissulaires et l'augmentation de la perméabilité de l'épithélium intestinal (perte de poids).

- Une phase secondaire de réparation tissulaire : le processus de restauration de l'intégrité de l'épithélium intestinal et de retour à un état homéostatique est rapidement initié car il dépend principalement de l'activité d'acteurs innés tels que les ILC3s à travers l'IL-22. Malgré cela, l'amélioration clinique (reprise de poids) n'est observable que plusieurs jours après l'arrêt du traitement ( $\pm$  10 jours après le début du traitement).

En 2004, une étude a mis en évidence le rôle protecteur de l'IL-17A dans ce modèle murin puisque la neutralisation de cette cytokine provoque une aggravation des dommages tissulaires intestinaux (Ogawa et al., 2004). Les résultats cliniques vont le même sens ; un essai de phase II testant l'impact de l'administration d'un anti-IL-17A (secukinumab) a montré une inefficacité et même une aggravation de la maladie de Crohn suite à ce traitement (Hueber et al., 2012). À l'opposé, l'inhibition en clinique de l'IL-23 a produit des résultats prometteurs chez des patients atteints par la maladie de Crohn ; que ce soit avec un ciblage commun des voies IL-12/IL-23 via un anticorps anti-p40 (ustekinumab) ou spécifique de l'IL-23 avec un anti-p19 (MEDI2070) (Sandborn et al., 2012) ; (Sands et al., 2015).

En 2015, le groupe de Daniel Cua a apporté un éclairage intéressant sur les mécanismes par lesquels l'IL-17A exerce un effet protecteur sur la muqueuse intestinale dans un contexte pathologique inflammatoire de type MICI (Lee et al., 2015a). Les auteurs ont tiré profit du modèle de colite au DSS et ont mis en évidence que, lors de l'attaque épithéliale, l'IL-17A régule la localisation cellulaire de l'occludine : une protéine constitutive des jonctions serrées. Les jonctions serrées assurent la cohésion des épithéliums, leur régulation par l'IL-17A permet donc de limiter l'augmentation de la perméabilité et de maintenir l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale. Les auteurs de cette étude ont identifié les cellules  $\gamma\delta$  IL-23R<sup>+</sup> comme étant la source majoritaire d'IL-17A protectrice dans l'intestin lors de l'inflammation aiguë. D'autre part, ils ont établi que la production d'IL-17A par ces cellules  $\gamma\delta$  qui résident dans la lamina propria colique ne dépend pas de la présence d'IL-23 (Lee et al., 2015a). On peut donc en conclure que, chez la souris, l'inhibition de l'IL-23 permet de préserver la libération intestinale d'IL-17A protectrice tout en limitant l'inflammation aiguë dans le modèle de colite au DSS. Ce dernier point est fondamental pour une meilleure compréhension et une amélioration des approches thérapeutiques actuelles.

Les cellules  $\gamma\delta$  productrices d'IL-17A ne sont pas les seules à exercer une activité bénéfique lors des pathologies inflammatoires de l'intestin. En effet, les ILC3s apparaissent comme particulièrement importantes puisque plusieurs études ont relevé une diminution du nombre d'ILC3s dans les tissus intestinaux de patients atteints de MICI (Takayama et al., 2010) ; (Bernink et al., 2013). Grâce à l'étude du modèle murin de colite au DSS, il a été démontré que les ILC3s ROR $\gamma$ <sup>+</sup> interviennent dans les mécanismes de réparation tissulaire. C'est via la production d'IL-22 que les ILC3s assurent la réparation de l'épithélium et donc le maintien de la fonction de la barrière intestinale (Sawa et al., 2011). Malgré l'accumulation de publications faisant état de la fonction protectrice des ILC3s dans les MICI ainsi que dans les modèles animaux qui leurs sont associés, une contradiction demeure puisque quelques études chez des patients atteints de MICI ont noté une augmentation de la fréquence d'ILC3s pro-inflammatoires dans les tissus intestinaux de ces individus (Geremia et al., 2011) ; (Powell et al., 2015). Diverses hypothèses permettent cependant d'expliquer ces données apparemment contradictoires et font rentrer en jeu la diversité et la plasticité des ILCs ainsi que la variabilité des phénotypes cliniques des patients et des biopsies tissulaires analysées.

La plasticité des ILCs est parfaitement illustrée par une étude de 2013 dans laquelle il a été mis en évidence que les ILC3s peuvent perdre l'expression de ROR $\gamma$  et en parallèle réguler à la hausse T-bet. Ces « ex-ILC3s » se développent suite à une stimulation par de l'IL-12 ou après l'induction par le DSS de dommages tissulaires intestinaux (Bernink et al., 2013). En accord avec ces résultats obtenus chez la souris, les auteurs de l'étude ont observé chez des patients atteints de MICI une augmentation de la fréquence des ILC1s en parallèle de la diminution des ILC3s dans les tissus intestinaux (Bernink et al., 2013). Ainsi, l'ensemble des résultats évoqués précédemment est en faveur d'un rôle protecteur des ILC3s via le maintien de l'homéostasie et la limitation des inflammations intestinales tant chez la souris que chez l'homme.

Enfin, une étude très récente du groupe de Gregory Sonneberg (Withers et al., 2016) a montré qu'un ciblage limité dans le temps de ROR $\gamma$  par de petites molécules inhibitrices affectait principalement les cellules T<sub>H</sub>17 tout en épargnant les fonctions protectrices des ILC3s au niveau de la muqueuse intestinale. Cette nouvelle voie thérapeutique est donc prometteuse pour le traitement des MICI. Cependant, d'autres voies alternatives au ciblage



de ROR $\gamma$ t ou de quelques cytokines clés restent à explorer au regard de nombreux gènes spécifiques de l'immunité de type 17 dont les fonctions sont encore à ce jour complètement inconnues.

## B. Rôle de *Tmem176b* (*Torid*) dans le système immunitaire

### 1. Identification de *Tmem176b* dans un modèle d'allogreffe

La recherche de nouveaux mécanismes moléculaires immunorégulateurs impliqués dans l'induction de tolérance est un enjeu majeur de la recherche en transplantation. Cette problématique a conduit notre équipe à l'étude de l'expression différentielle de gènes dans un contexte de tolérance par rapport à un rejet. Dans le modèle de tolérance choisi, le receveur est traité par des transfusions de sang spécifique du donneur (TSD). Il a été démontré que les transfusions sanguines spécifiques du donneur, administrées préalablement d'une transplantation, peuvent induire une tolérance à des allogreffes vascularisées, notamment chez les rongeurs (Fabre and Morris, 1972) ; (Soulillou et al., 1984) ; (Josien et al., 1998). La comparaison du profil d'expression génique de greffons tolérés via des TSD à celui de greffons en rejet a conduit notre groupe à l'identification du gène *Tmem176b* (Louvet et al., 2005). Initialement nommé *Torid* pour « tolerance-related and induced transcript », ce gène est apparu fortement surexprimé dans les cellules non T infiltrant les allogreffes cardiaques tolérées chez le rat (**Figure 7**).

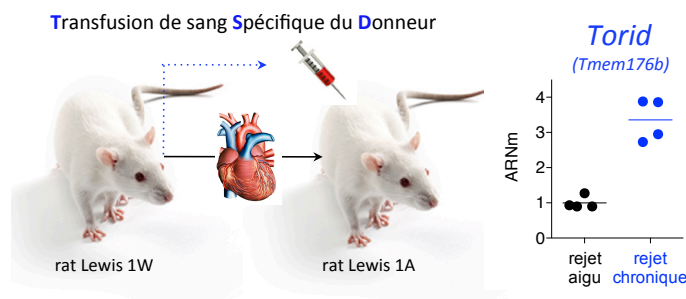


Figure 7 Surenexpression de *Tmem176b* dans les allogreffes cardiaques non rejetées chez les rats receveurs traités par TSD en comparaison des contrôles en rejet aigu.

(Figure réalisée selon Louvet et al. *American Journal of Transplantation*. 2005)

Le gène *Tmem176b/Torid*, identifié chez le rat, est relativement bien conservé au sein des espèces : on le retrouve chez l'ensemble des mammifères et chez les poissons osseux (Zuccolo et al., 2010). Les gènes *TMEM176B/LR8* et *Tmem176b/Clast1* sont les orthologues humain et murin de *Tmem176b/Torid*. La comparaison de la séquence amino-acidique prédite de la protéine humaine TMEM176B indique une forte identité de séquence, de taille et de structure avec les membres de la famille MS4A pour « membrane-spanning 4-domains subfamily A » (Louvet et al., 2005). De même que TMEM176B, les protéines MS4A ont une

taille comprise entre 150 et 300 acides aminés et elles possèdent quatre domaines transmembranaires. De plus, *TMEM176B* présente la même organisation intron/exon que les gènes *MS4A*.

La famille des gènes *MS4A* est encore mal caractérisée et la compréhension de leurs rôles biologiques demeure faible. Chez l'homme, elle regroupe 18 molécules dont le CD20 (*MS4A1*) et le FcεRIβ (*MS4A2*) (Eon Kuek et al., 2016). L'analyse phylogénique des familles *MS4A* et de *TMEM176B* a permis d'établir une similarité de 10 à 20% entre leurs séquences en acides aminés (Louvet et al., 2005) ; (Zuccolo et al., 2010). Cependant, les gènes de ces deux familles sont situés sur des chromosomes différents et ont une conservation de séquence assez faible entre toutes les espèces. Ainsi, *TMEM176B* serait issu d'un ancêtre commun aux gènes *MS4A* et aurait divergé à la suite de multiples duplications et d'une translocation chromosomique (Louvet et al., 2005) ; (Zuccolo et al., 2010). Ces données suggèrent de probables divergences de fonctions entre la famille *MS4A* et *TMEM176B* malgré une parenté certaine et une expression commune dans les cellules hématopoïétiques.

## **2. *Tmem176b* est exprimé préférentiellement par les cellules myéloïdes immatures**

Les résultats obtenus lors de l'étude initiale, menée par Louvet et al. en 2005 ont permis d'établir que *Tmem176b* est exprimé dans de très nombreux tissus en dehors du système hématopoïétique mais que son expression préférentielle se situe dans les tissus lymphoïdes chez le rat. De plus, le gène *Tmem176b* est exprimé majoritairement par les macrophages et les cellules dendritiques fraîchement isolées ainsi que par les cellules dendritiques dérivées in vitro à partir de la moelle osseuse. La forte expression native de *Tmem176b* observée dans les cellules fraîchement isolées est drastiquement diminuée suite à une stimulation cellulaire. La corrélation inverse observée entre le niveau d'expression de *Tmem176b* et le statut d'activation des cellules myéloïdes est retrouvée tant chez l'homme que chez le rat. En outre, *TMEM176B* jouerait un rôle dans la maturation des cellules dendritiques puisque la transduction de cette protéine affecte leur différenciation en diminuant l'expression des molécules de costimulation et la sécrétion de cytokines inflammatoires. Ces données obtenues in vitro, associées à la forte expression dans les cellules myéloïdes infiltrant le greffon toléré, suggéraient que *TMEM176B* favorise la présentation tolérogénique

d'antigènes par les cellules présentatrices (macrophages et cellules dendritiques). Ce phénomène participerait à la tolérance aux allo-antigènes suite au traitement par TSD lors d'une greffe.

Actuellement, les stratégies thérapeutiques visent à réduire la lourdeur des traitements immunosuppresseurs consécutifs aux transplantations d'organes ou administrés aux patients touchés par des désordres auto-immuns. L'une des voies explorées pour répondre à ce défi réside dans la combinaison de thérapies cellulaires à des doses d'immunosuppressions réduites. Notre équipe (dirigée par Maria Cristina Cuturi) participe à cet effort via l'étude du transfert de cellules dendritiques tolérogènes en transplantation. Les cellules dendritiques tolérogènes autologues (Beriou et al., 2005) ; (Segovia et al., 2011) représentent une stratégie prometteuse en raison de leur relative facilité de génération et de leur capacité à prolonger la survie d'allogreffes (Beriou et al., 2005) ; (Pêche et al., 2005) ; (Hill and Cuturi, 2010) ; (Hill et al., 2011). Dans le cadre du consortium européen « The ONE Study », elles sont désormais en phase I/II d'essai clinique chez des patients greffés rénaux (Moreau et al., 2012).

### **3. La génération d'une souris KO pour *Tmem176b***

Il a été démontré, chez l'homme et le rongeur, que les cellules dendritiques immatures et tolérogènes expriment fortement *Tmem176b* (Louvet et al., 2005) ; (Condamine et al., 2010) ; Segovia et al. 2014). Ces cellules évoquées précédemment représentent donc un choix pertinent pour l'étude du gène *Tmem176b*.

Cependant, lors de l'identification de *Torid/Tmem176b* chez le rat, il était impossible de générer des rats déficients pour un gène. Cette limitation technique représentait un obstacle majeur pour ouvrir les perspectives de recherche dans ce modèle. Cet état de fait a porté préjudice aux études chez le rat jusqu'à l'apparition de la technologie des nucléases. Grâce à ces nouveaux outils de modification du génome le premier rat KO a été généré quelques années plus tard par une équipe de notre unité via l'utilisation des TALENs (Tesson et al., 2011).

Les limitations techniques de l'époque (Louvet et al., 2005) ont donc conduit notre groupe à s'orienter vers la génération d'une souris déficiente pour *Tmem176b*. Cette souris *Tmem176b*<sup>-/-</sup> a été conçue, en collaboration avec l'Institut Clinique de la Souris (ICS -

Strasbourg), par ciblage d'une région comprenant les exons 1 et 2 du gène. La délétion a été réalisée par recombinaison homologue dans des cellules souches embryonnaires murines. Les souris *Tmem176b*<sup>+/+</sup> (WT) et *Tmem176b*<sup>-/-</sup> (KO) utilisées en expérimentation résultent de plus de dix croisements sur le fond génétique C57BL/6 (Segovia et al., 2014) ; (Drujont et al., 2016).

#### **4. *Tmem176b* est requis pour l'activité immunorégulatrice de cellules dendritiques tolérogènes**

Chez la souris, le transfert de cellules dendritiques tolérogènes autologues combinées à un traitement anticorps anti-CD3 prolonge efficacement la survie d'une allogreffe de peau (antigènes mineurs mâles). En revanche, les mêmes cellules dendritiques issues de souris *Tmem176b*<sup>-/-</sup> perdent cette capacité (Segovia et al., 2014). Cette absence d'effet tolérogène a été associée à un défaut d'induction de lymphocytes T CD8<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> spécifiques des antigènes du donneur et précédemment identifiés comme régulateurs dans d'autres modèles (Seo et al., 2004). L'expression de TMEM176B par les cellules dendritiques tolérogènes est donc requis à l'induction de cellules T CD8<sup>+</sup> régulatrices favorisant la prolongation de survie de la greffe de peau (Segovia et al., 2014).

#### **5. TMEM176B participe au phénomène de présentation croisée dans les cellules dendritiques tolérogènes**

Les cellules dendritiques tolérogènes sont capables de moduler la réponse alloimmune contre le greffon en favorisant notamment l'induction de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> régulateurs (T<sub>REG</sub>) et en diminuant la réactivité des cellules T contre les antigènes du donneur (Yates et al., 2007) ; (Baas et al., 2014). Dans l'étude réalisée par Segovia et al. en 2014, la réduction de la réponse allogénique contre le greffon passerait par la présentation tolérogène des antigènes du donneur par les cellules dendritiques transférées. Comme nous l'avons vu précédemment, les cellules dendritiques *Tmem176b*<sup>-/-</sup> n'améliorent pas la survie du greffon. Cependant, le chargement de ces cellules *Tmem176b*<sup>-/-</sup> avec les antigènes mâles spécifiques du donneur restaure la prolongation de survie de l'allogreffe (Segovia et al., 2014). L'absence d'effet observé lors d'un transfert de cellules dendritiques *Tmem176b*<sup>-/-</sup> peut donc s'expliquer par une défaillance du processus de présentation antigénique.

Une faillite de la présentation antigénique croisée expliquerait la délétion de la population T CD8<sup>+</sup> régulatrice et donc l'échec de prolongation de survie de l'allogreffe. Des expériences de

présentation antigénique *in vitro* ont confirmées cette hypothèse. Ainsi, la protéine TMEM176B est requise pour la présentation antigénique croisée des antigènes exogènes aux cellules T CD8<sup>+</sup>. Cependant, TMEM176B n'impacte ni la présentation de ces antigènes sur le CMH de classe II aux cellules T CD4<sup>+</sup>, ni la présentation des antigènes endogènes via le CMH de classe I aux cellules T CD8<sup>+</sup> (Segovia et al., 2014).

La présentation croisée est le phénomène qui assure la présentation des antigènes exogènes sur les molécules du CMH de classe I (CMH-I) et permet l'activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> en effecteurs cytotoxiques ou régulateurs, selon le contexte (**Figure 8**). Deux types de présentation croisée ont été décrits : la voie « cytosolique » et la voie « vacuolaire » (Joffre et al., 2012). Dans les deux cas, le passage des antigènes dans les endosomes et phagosomes est un élément contradictoire avec une conservation de peptides non complètement dégradés puisqu'il s'agit de compartiments hostiles ; l'environnement y est acide et hautement protéolytique (Amigorena and Savina, 2010). *In vivo*, la présentation croisée est principalement effectuée par les cellules dendritiques (Mellman and Steinman, 2001). Parmi l'ensemble des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), les cellules dendritiques sont les seules à rassembler les critères nécessaires à une dégradation limitée des antigènes permettant leur liaison avec le CMH-I (Accapezzato et al., 2005). En comparaison avec les macrophages, les protéases lysosomales sont exprimées à un plus faible niveau dans les cellules dendritiques (Delamarre et al., 2005) et le pH est moins acide. Ces deux éléments sont indispensables au bon fonctionnement du processus de présentation croisée des antigènes.

Le contrôle du pH dans les endosomes et phagosomes est un élément clé de la présentation croisée. Plusieurs mécanismes sont à l'origine de l'alcalinisation (pH7,5) des compartiments endocytiques dans les cellules dendritiques. D'une part, l'assemblage de la V-ATPase a été décrit comme incomplet dans les lysosomes des cellules dendritiques immatures. La réduction de l'activité de cette pompe, chargée de l'import des protons dans la lumière des lysosomes, induit une augmentation du pH (Trombetta et al., 2003). D'autre part, l'enzyme NADPH NOX2 est recrutée très efficacement via Rab27a dans les endosomes et phagosomes des cellules dendritiques (Savina et al., 2006) ; (Jancic et al., 2007). Cette enzyme s'oppose à l'effet de la V-ATPase en générant des espèces réactives oxygénées (ROS). La synthèse de

ROS dans la lumière des phagosomes consomme des protons. Ainsi, l'activité enzymatique de la NADPH NOX2 favorise l'alcalinisation des compartiments endocytiques.

## **6. TMEM176B est un canal cationique intracellulaire impliqué dans la régulation du pH phagosomal**

Des études protéomiques ont suggéré que la protéine TMEM176B est exprimée au niveau de la membrane des phagosomes dans les macrophages (Shui et al., 2008) ; (Trost et al., 2009). Notre équipe a démontré que TMEM176B peut être détectée à la membrane des endosomes et phagosomes dans les cellules dendritiques tolérogènes (Segovia et al., 2014). Ces données de localisation renforcent l'hypothèse d'une participation de TMEM176B aux mécanismes moléculaires mis en jeu dans les compartiments endocytiques.

Comme nous l'avons vu précédemment, le contrôle du pH est indispensable au traitement des antigènes exogènes dans la lumière du phagosome. Or, dans les cellules dendritiques *Tmem176b*<sup>-/-</sup>, le pH post-phagocytose est transitoirement supérieur à celui mesuré dans les cellules dendritiques *Tmem176*<sup>+/+</sup> (Segovia et al., 2014). Ces résultats suggèrent un défaut d'acidification des compartiments endocytiques en l'absence de TMEM176B. Le maintien du pH résulte de l'équilibre de multiples flux ioniques. En conséquence, notre groupe a émis l'hypothèse que TMEM176B pourrait assurer une fonction de canal ionique (Segovia et al., 2014).

L'appartenance de TMEM176B à la famille des protéines MS4A a été évoquée au début de ce chapitre (Louvet et al., 2005) ; (Zuccolo et al., 2010). Cette parenté phylogénique étaye la théorie d'une fonction de canal ionique. En effet, le membre le mieux caractérisé de la famille MS4A, le CD20 est exprimé uniquement par les lymphocytes B et régule les flux calciques consécutifs à l'activation du récepteur d'antigènes de ces cellules (Polyak et al., 2008) ; (Zuccolo et al., 2010). De la même manière, MS4A12, un homologue du CD20 participe à l'entrée du calcium dans les cellules épithéliales de l'intestin (Koslowski et al., 2008).

Des expériences d'électrophysiologie ont prouvées que TMEM176B pouvait induire un flux cationique (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>) non sélectif et sensible au pH acide (Segovia et al., 2014). TMEM176B est exprimé à la membrane des phagosomes et l'activité de la V-ATPase y est perturbée dans les cellules *Tmem176b*<sup>-/-</sup>. TMEM176B favoriserait donc l'activité de cette pompe à protons en exportant des charges positives (Na<sup>+</sup>) hors du phagosome, dans le cytosol (**Figure 8**).

TMEM176B est un canal cationique qui impacte la présentation antigénique croisée en participant à la maîtrise du pH dans les compartiments endocytiques des cellules dendritiques (Segovia et al., 2014).

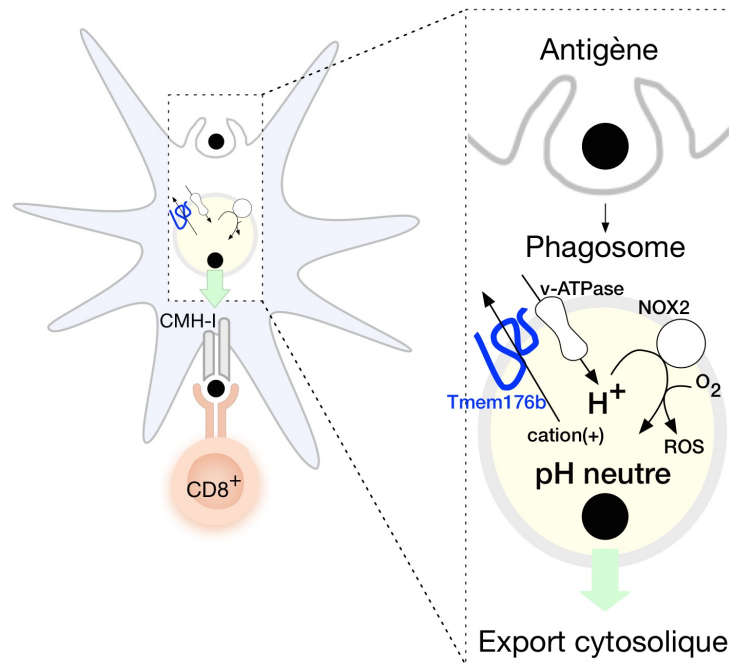


Figure 8 TMEM176B est un canal ionique intracellulaire impliqué dans la régulation du pH phagosomal dans les cellules dendritiques (DC).

(Figure réalisée selon Segovia et al. *American Journal of Transplantation*. 2014)

## 7. Hypothèse d'une redondance fonctionnelle entre *Tmem176b* et son homologue *Tmem176a*

La recherche de séquences protéiques homologues à TMEM176B/LR8 a révélé l'existence de HCA112 pour « human Hepatocellular Carcinoma-associated Antigen 112 ». Cette protéine possède 28,5% de similarité avec TMEM176B (Louvet et al., 2005). Elle a initialement été identifiée comme potentiel antigène de tumeur chez des patients atteints de carcinomes hépatocellulaires (Wang et al., 2002). GS188, l'orthologue murin de HCA112 a été associé aux gènes liés à l'immunité dans les cellules tubulaires proximales de souris exposées à une protéinurie (Nakajima et al., 2002).

HCA112/TMEM176A est le gène paralogue à TMEM176B. TMEM176B et son homologue HCA112/TMEM176A sont situés sur le même locus génomique : chromosome 7 chez l'homme, 6 chez la souris et 4 chez le rat. De plus, ils sont localisés au voisinage immédiat l'un de l'autre sur le chromosome et sont positionnés en opposition directionnelle (**Figure 9**).



De même que TMEM176B, TMEM176A est apparentée à la famille MS4A ; ensemble elles constituent la petite famille TMEM176. Les protéines TMEM176 seraient issues d'une translocation chromosomique d'un membre ancestral de la famille MS4A, les deux familles ont ensuite évolué en parallèle grâce à des duplications géniques (Louvet et al., 2005) ; (Zuccolo et al., 2010).

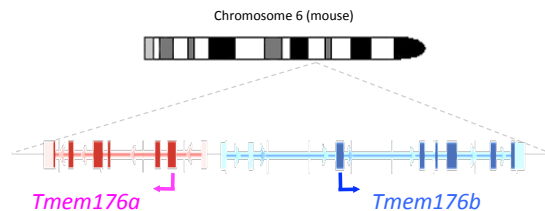


Figure 9 Les homologues *Tmem176a* et *Tmem176b* sont en position inversée sur le même locus et sont portés par le chromosome 6 chez la souris

Comme nous l'avons vu précédemment pour TMEM176B, son homologue est aussi une protéine à quatre domaines transmembranaires localisée à la membrane de compartiments intracellulaires (**Figure 10**). Il a également été démontré que les protéines TMEM176A et B pouvaient se multimériser et interagir ensemble, d'où le postulat d'un complexe membranaire intracellulaire (Condamine et al., 2010). Suite à l'identification de *Tmem176b* chez le rat, notre groupe a élargi l'étude aux deux homologues *Tmem176a/b* chez la souris. Les protéines TMEM176A/B sont co-exprimées et ont le même profil d'expression tissulaire (poumons, reins, rate) et cellulaire (cellules myéloïdes majoritairement) et elles jouent toutes les deux un rôle dans le maintien de l'immaturité des cellules dendritiques en diminuant l'expression des molécules de costimulation (Louvet et al., 2005) ; (Condamine et al., 2010).

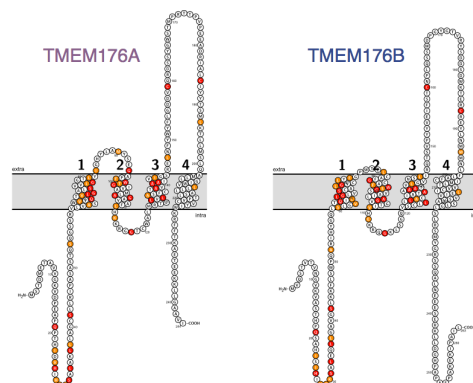


Figure 10 Les protéines TMEM176A et TMEM176B sont des protéines intracellulaires de structure homologue possédant quatre domaines transmembranaires.

(Figure tirée de Drujont et al. *Scientific Reports*. 2016)

Puisque TMEM176A et TMEM176B appartiennent à la même famille et partagent d'importantes similarités d'organisation des introns/exons, de localisation intracellulaire et de structure, il est tentant de conclure que, à l'image de son homologue, TMEM176A exerce également une activité de canal ionique.

## C. Hypothèse d'un rôle de *Tmem176a* et *b* dans les cellules ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>

Diverses études récentes ont élargi l'analyse de l'expression des homologues *Tmem176a* et *Tmem176b* au-delà de la lignée myéloïde. Auparavant, notre équipe avait établi que leur expression était très faible dans les cellules T naïves ou stimulées à court terme par le TCR sans polarisation spécifique (Louvet et al., 2005) ; (Condamine et al., 2010). Cependant, la question restait ouverte et non examinée quant à une possible expression dans les lignées T<sub>H</sub>1 ou T<sub>H</sub>2 – les T<sub>H</sub>17 n'étant alors pas encore formellement caractérisées – ainsi que dans les plus récemment décrites T<sub>REG</sub> Foxp3<sup>+</sup>. En ce sens et de façon surprenante, l'analyse en 2012 de données de puces ADN comparant les transcriptomes de T<sub>REG</sub> d'origine thymique (anciennement appelées "naturelles") et de T<sub>REG</sub> périphériques ("adaptatives") a permis de mettre en évidence une expression relative plus forte de *Tmem176b* dans ces dernières (Yadav et al., 2012). Cette observation indiquait que *Tmem176b* puisse avoir une fonction dans des différenciations T particulières, notamment en lien avec une signalisation par le TGF $\beta$ .

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> font partie des cellules immunes les mieux caractérisées. Pourtant, les mécanismes moléculaires assurant la spécialisation des différentes sous-populations T<sub>H</sub> se sont pas encore clairement élucidés. En parallèle de notre intérêt pour l'expression de *Tmem176b* dans les lymphocytes T, une publication importante du groupe de Dan Littman a permis de décrire en détail le réseau de régulation transcriptionnel des T<sub>H</sub>17 (Ciofani et al., 2012). Cette analyse a conduit à l'identification de onze cibles directes de ROR $\gamma$ t parmi lesquelles des gènes largement étudiés comme *Il17a*, *Il17f* ou *Il23r* mais aussi cinq nouvelles cibles qui, de façon inattendue, incluaient *Tmem176b* et son homologue *Tmem176a* (**Figure 11**). La réalisation au laboratoire d'expériences de différenciations in vitro de cellules T CD4<sup>+</sup> a ensuite permis de mettre en lumière une expression quasiment exclusive de ces deux gènes dans les cellules T<sub>H</sub>17 en comparaison aux autres polarisations testées (T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2 et T<sub>REG</sub>). De ces résultats découle l'hypothèse selon laquelle *Tmem176a* et *Tmem176b* pourraient jouer un rôle fondamental dans la biologie des T<sub>H</sub>17 en intervenant en aval du recrutement de ROR $\gamma$ t.

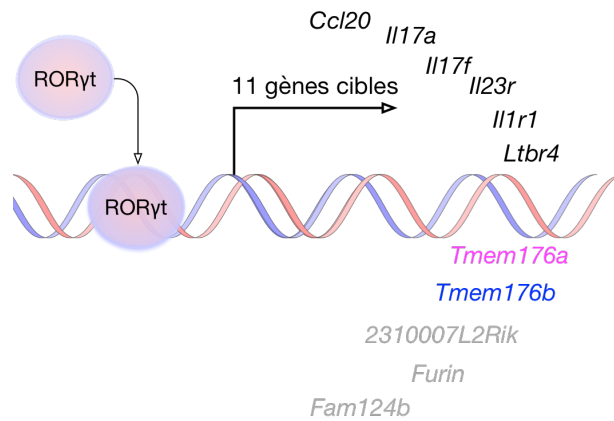


Figure 11 Représentation des onze gènes directement régulés par le facteur de transcription ROR $\gamma$ t. Cette étude a été réalisée par le groupe de Dan Littman chez la souris : les six gènes en noir étaient déjà reconnus comme étant des cibles de ROR $\gamma$ t avant 2012 ; les cinq autres gènes sont des cibles nouvellement identifiées (Figure réalisée selon Ciofani et al. *Cell*. 2012).

L'expression des gènes *Tmem176a* et *b* apparaît directement régulée par ROR $\gamma$ t qui est essentiel aux T<sub>H</sub>17 mais qui est également primordial pour d'autres cellules immunes telles que les ILC3s. Il nous semblait donc pertinent de s'intéresser à l'expression des transcrits *Tmem176a* et *b* au sein de ces ILC3s et plus largement dans l'ensemble des ILCs. Nous avons ainsi observé une expression forte et préférentielle de ces deux homologues dans les ILC3s en comparaison avec les ILC1s. Ces résultats ont été renforcés par une étude importante du groupe de Marco Colonna (Robinette et al., 2015) qui a établi une signature génique définissant les ILCs en contraste avec la lignée classique NK et qui mettait en exergue cinq transcrits incluant *Tmem176a* et *b* (**Figure 12**). Néanmoins, dans cette étude, l'expression de *Tmem176a*, *Tmem176b*, *Cxcr6* et *Il7r* apparaît significativement plus forte dans les ILC3s comparées aux autres ILCs, en accord avec nos observations.

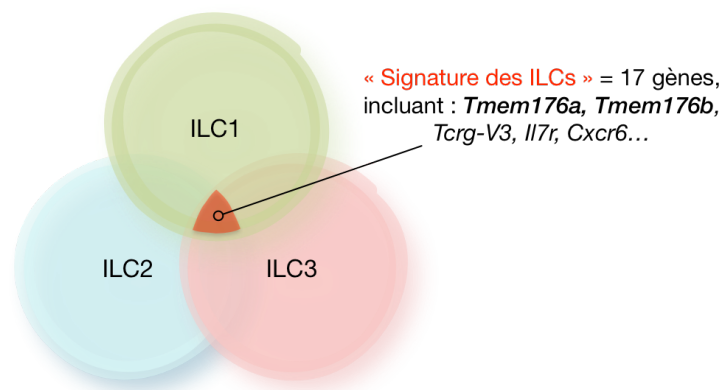


Figure 12 Les trois groupes d'ILCs ont une signature génique commune. Cette signature ILCs regroupe un nombre de gènes restreints dont les deux homologues *Tmem176a* et *Tmem176b* (Figure réalisée selon Robinette et al. *Nature Immunology*. 2015).

À partir de ces observations initiales de l'expression de *Tmem176a* et *b* dans des cellules de la famille ROR $\gamma$ t, j'ai donc décidé d'orienter l'essentiel de mon travail de thèse sur l'étude du rôle de ces deux homologues dans l'immunité de type 17. Ce travail sera tout d'abord décrit sous la forme d'un article publié en mars 2016 dans *Scientific Reports* (Drujont et al., 2016) notamment à travers l'étude de la souris « simple KO » *Tmem176b*<sup>-/-</sup>. Puis, je présenterai en deuxième partie les résultats préliminaires que j'ai obtenus sur l'étude des souris doublement déficientes pour les deux homologues.

# RÉSULTATS

## **A. Article publié dans *Scientific Reports*, « ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> cells selectively express redundant cation channels linked to the Golgi apparatus » (Drujont et al. 2016)**

Ce travail d'étude de *Tmem176a* et *b* dans les cellules ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> a pour objectif de répondre à trois questions principales :

- *Tmem176a* et *b* sont-ils préférentiellement exprimés dans différents types de cellules de la famille ROR $\gamma$ t ?

Pour répondre à cette première question, je me suis intéressée chez la souris à l'étude de trois populations ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> : les T<sub>H</sub>17, les ILC3s intestinales et les lymphocytes T $\gamma$  $\delta$ 17.

- Quelle est la localisation intracellulaire de ces homologues dans les cellules T<sub>H</sub>17 ?

Cette interrogation est fondamentale puisque contrairement aux cellules dendritiques, les lymphocytes T<sub>H</sub>17 qui sont au cœur de ce projet ne sont pas des cellules capables de phagocytose, la fonction de régulation de la présentation croisée apparaît donc très éloignée. L'identification de la localisation des homologues dans les T<sub>H</sub>17 peut nous fournir des pistes précieuses quant à leur fonction spécifique dans cette différenciation particulière. De plus, aucune étude exhaustive de localisation intracellulaire n'a été effectuée par le passé y compris dans les cellules dendritiques.

- Quel est l'impact de la déficience pour *Tmem176b* (souris « simple KO ») dans le développement de pathologies auto-immunes/inflammatoires associées aux cellules ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> ?

Il s'agit d'une question centrale de mon travail de thèse. Je me suis intéressée à l'étude des trois modèles d'auto-immunité/inflammation décrits dans la première partie de l'introduction : le modèle EAE d'auto-immunité, des modèles murins de MICI (au DSS et de transfert de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs CD45RB<sup>hi</sup> dans des souris immuno-déficientes) et le modèle de dermatite psoriasiforme induit par l'IMQ (crème Aldara™).

# SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

## ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> cells selectively express redundant cation channels linked to the Golgi apparatus

Received: 24 December 2015

Accepted: 08 March 2016

Published: 24 March 2016

Lucile Drujon<sup>1</sup>, Aurélie Lemoine<sup>1</sup>, Aurélie Moreau<sup>1</sup>, Géraldine Bienvenu<sup>1</sup>, Mélanie Lancien<sup>1</sup>, Thierry Cens<sup>2</sup>, Flora Guillot<sup>1</sup>, Gaëlle Bériou<sup>1</sup>, Laurence Bouchet-Delbos<sup>1</sup>, Hans Jörg Fehling<sup>3</sup>, Elise Chiffolleau<sup>1</sup>, Arnaud B. Nicot<sup>1</sup>, Pierre Charnet<sup>2</sup>, Jérôme C. Martin<sup>1,4,5</sup>, Régis Josien<sup>1,4,5</sup>, Maria Cristina Cuturi<sup>1,\*</sup> & Cédric Louvet<sup>1,\*</sup>

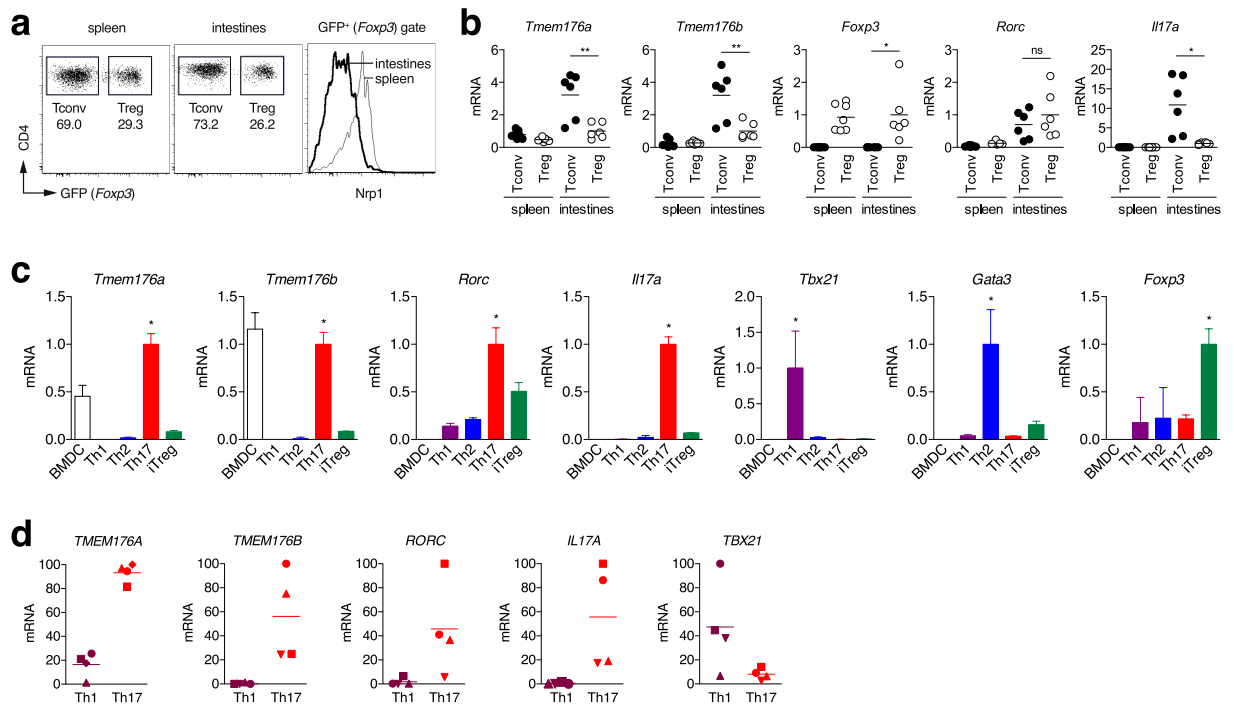
Retinoid-related orphan receptor gamma t (ROR $\gamma$ t) is a master transcription factor central to type 17 immunity involving cells such as T helper 17, group 3 innate lymphoid cells or IL-17-producing  $\gamma\delta$  T cells. Here we show that the intracellular ion channel TMEM176B and its homologue TMEM176A are strongly expressed in these ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> cells. We demonstrate that TMEM176A and B exhibit a similar cation channel activity and mainly colocalise in close proximity to the *trans*-Golgi network. Strikingly, in the mouse, the loss of *Tmem176b* is systematically associated with a strong upregulation of *Tmem176a*. While *Tmem176b* single-deficiency has no effect on the course of experimental autoimmune encephalomyelitis, T cell or DSS-induced colitis, it significantly reduces imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation. These findings shed light on a potentially novel specific process linked to post-Golgi trafficking for modulating the function of ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> cells and indicate that both homologues should be simultaneously targeted to clearly elucidate the role of this intracellular ion flow.

CD4<sup>+</sup> Th17 cells were definitely recognised as a distinct Th subset, along with Th1 and Th2, a decade ago owing to the identification of ROR $\gamma$ t as their master transcription factor<sup>1</sup>. While Th1 and Th2 cells are required for the control of intracellular pathogens or extracellular worms respectively, Th17 cells appear essential for proper defence against extracellular bacteria and fungi<sup>2</sup>. Moreover, it is now established that deregulated IL-17 secretion by Th17 cells also contributes to the development of several immune-mediated inflammatory diseases (IMiDs)<sup>3</sup>, and a number of clinical trials aiming at evaluating the therapeutic value of IL-17 or IL-17R blockade have been conducted that led to both impressive and disappointing results, depending on the disease targeted<sup>4,5</sup>. Interestingly, ROR $\gamma$ t function as a master regulator of transcription is not restricted to Th17 cells but also extends to group 3 innate lymphoid cells (ILC3s), which are regarded as their innate counterparts<sup>6</sup>. Additionally, ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> expression is also detected in IL-17-producing  $\gamma\delta$  T cells that emerge as important players in inflammatory diseases as well<sup>7–10</sup>. Unveiling novel and specific aspects of ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> lymphocytes beyond their cytokine production is thus important to better understand their actions during physiological and/or deregulated immune responses.

*Tmem176b*, initially named *Torid* (*tolerance-related and induced*), encodes a four-span transmembrane protein that we previously showed to be expressed in immature myeloid cells, including conventional dendritic cells (cDCs)<sup>11,12</sup>. More recently, we demonstrated that TMEM176B exerts major functions in the cross-presentation of antigens by tolerogenic DCs through acting as a non-selective cation channel that finely regulates the phagosomal pH<sup>13</sup>. Importantly, *Tmem176b* has a co-regulated homologue, namely *Tmem176a*, located within the same genomic locus and likely resulting from a recent duplication<sup>11,12,14</sup>. It is important to note that the co-expression of these two structurally similar genes is not restricted to myeloid cells but extends to other cell types including non-hematopoietic cells<sup>15–18</sup>, thus strongly suggesting other intracellular functions beyond anti-gen cross-presentation.

<sup>1</sup>INSERM UMR 1064, Center for Research in Transplantation and Immunology; Université de Nantes; CHU Nantes, Institut de Transplantation Urologie Néphrologie (ITUN); 44093 Nantes, France. <sup>2</sup>CNRS UMR 5237, CRBM, 34293 Montpellier, France. <sup>3</sup>Institute of Immunology, University Clinics Ulm, 8901 Ulm, Germany. <sup>4</sup>Faculté de Médecine, Université de Nantes, 44093 Nantes, France. <sup>5</sup>Laboratoire d'Immunologie, CHU Nantes, 44093 Nantes, France. \*These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.L. (email: cedric.louvet@univ-nantes.fr)





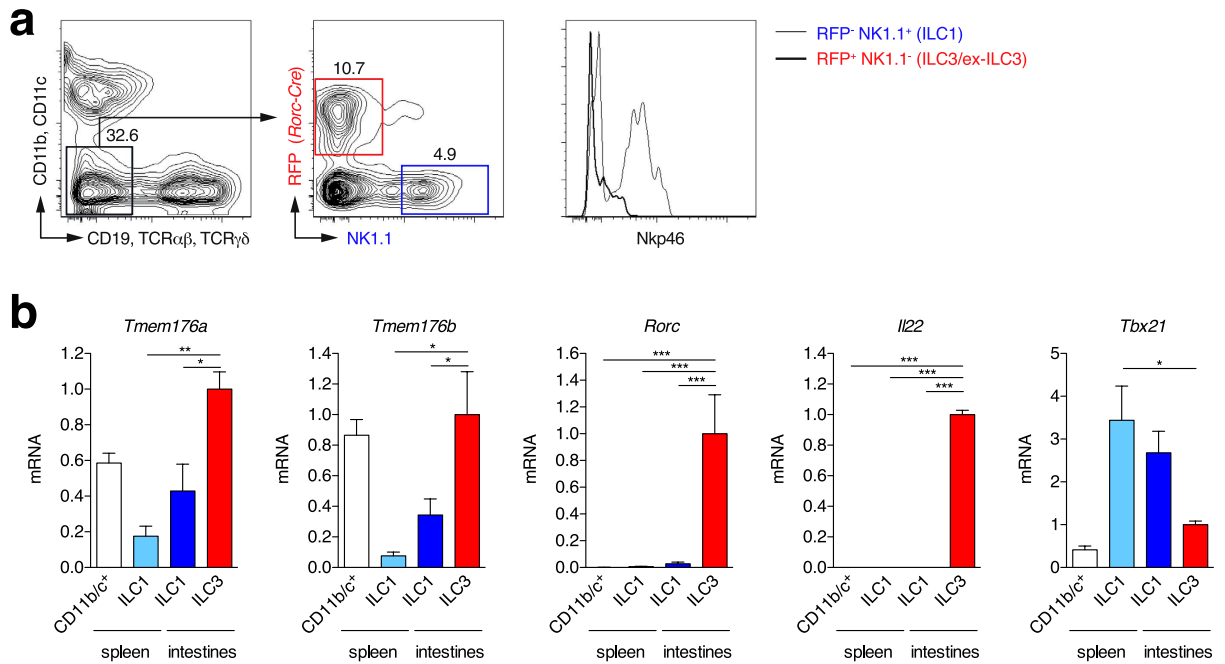
**Figure 1. *Tmem176a* and *b* mRNA expression in mouse and human T cells.** (a) Conventional GFP<sup>-</sup> (Foxp3<sup>-</sup> Tconv) or regulatory GFP<sup>+</sup> (Foxp3<sup>+</sup> Treg) CD4<sup>+</sup> T cells were FACS-sorted from the spleen or intestinal lamina propria (small intestine and colon) of *Foxp3<sup>EGFP</sup>* mice. As expected, the population of Nrp1<sup>-/low</sup> “adaptive” peripherally Tregs is dominant in the intestines. Conversely, Nrp1<sup>+</sup> “natural” thymically derived Tregs represent the major population of Tregs in spleen. (b) Expression of indicated genes was assessed by quantitative RT-PCR. Each dot represents an individual mouse (n = 6–7 in each group). Statistically significant differences between intestinal Tconv and Treg are indicated: \*p < 0.05, \*\*p < 0.01. (c) Mouse naive CD4<sup>+</sup> T cells were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 under Th1, Th2, Th17 or iTreg polarising conditions for 3 days. Immature bone marrow-derived DCs (BMDC) were generated with GM-CSF. Expression of indicated genes was assessed by quantitative RT-PCR. Data show triplicates (mean ± SD) for each condition and are representative of three independent experiments. \*indicates a statistically significant difference of the indicated population compared to all the other Th cells. (d) Human naive CD4<sup>+</sup> T cells were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 under Th1 or Th17 polarising conditions for 7 days. Expression of indicated genes was assessed by quantitative RT-PCR by comparing Th1 and Th17 obtained from 4 independent healthy volunteers. Each donor is coded by a specific symbol.

A recent study by Littman and colleagues<sup>19</sup> revealed that, along with *Il17a*, *Il17f*, *Il23r*, *Ccl20*, *Il1r1* or *Ltb4r1*, *Tmem176a* and *b* are part of the highly restricted group of 11 genes whose expression is directly dependent on ROR $\gamma$ t in Th17 cells. Concordant with this, a significant upregulation of both homologues was detected in whole-blood samples of patients with multiple sclerosis<sup>20</sup>, an IMID in which the pathogenic role of type 17 immunity is strongly suspected<sup>21–24</sup>. More recently, as part of the Immunological Genome Project, Colonna and colleagues highlighted several ILC-specific genes including *Tmem176a* and *b*, whose expression was remarkably higher in ILC3 subsets than in group 1 and 2 ILCs<sup>25</sup>. These findings thus logically raise the question whether *Tmem176a* and *b* play a role in type 17 immunity-related ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> lymphocytes, including Th17 cells and ILC3s, which is yet to be unveiled.

In the present study, we have characterised *Tmem176a* and *b* expression in ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> lymphocytes at transcriptional and protein levels and present evidence that both genes exert a redundant ion channel function related to a localisation in close proximity to the Golgi apparatus.

## Results

***Tmem176a* and *Tmem176b* are over-expressed in Th17 cells.** We previously reported very low expression of *Tmem176a* and *b* mRNA in naive or anti-CD3/CD28 stimulated T cells<sup>11,12</sup>. However, whether these genes are upregulated in terminally differentiated T cell subsets has not been investigated. To this end, we took advantage of *Foxp3<sup>EGFP</sup>* reporter mice that specifically express GFP under the control of the *Foxp3* promoter to purify Foxp3<sup>+</sup> (GFP<sup>+</sup>) Tregs along with Foxp3<sup>-</sup> (GFP<sup>-</sup>) conventional T cells (Tconv) from the spleen in which most of the Tregs are thymically-derived (Nrp1<sup>+</sup>), and the gut lamina propria in which specific environmental factors strongly drives the differentiation of peripherally derived Tregs (Nrp1<sup>lo</sup>) specific for food and commensal antigens (Fig. 1a). Concordant with published microarray data suggesting a preferential expression of *Tmem176a* and *b* in peripherally derived Tregs<sup>26</sup>, we detected significantly higher mRNA levels of both homologues in intestinal Tregs as compared to splenic Tregs. However, the highest levels of expression were actually found specifically



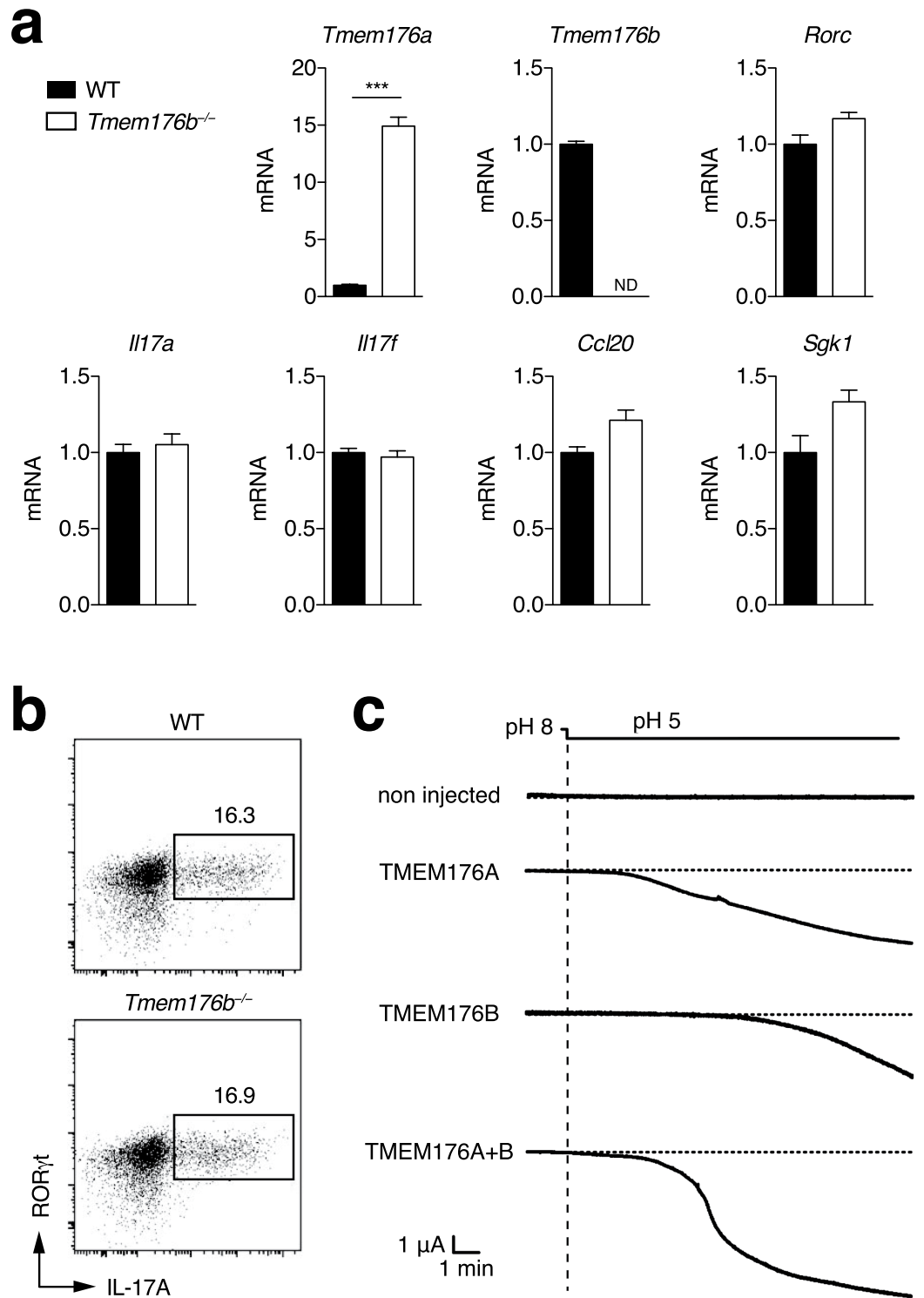
**Figure 2. *Tmem176a* and *b* mRNA expression in intestinal ILC3s.** (a) Lymphocytes from intestinal lamina propria of ROR $\gamma$ t-fate map mice (*Rorc*( $\gamma$ t)-*Cre*<sup>TRG</sup>  $\times$  *Rosa26-tdRFP*) were isolated. Lineage-negative (CD11b<sup>-</sup>CD11c<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>TCR $\alpha\beta$ <sup>-</sup>TCR $\gamma\delta$ <sup>-</sup>) RFP<sup>+</sup>NK1.1<sup>-</sup> ILC3-enriched and RFP<sup>-</sup>NK1.1<sup>+</sup> ILC1s were FACS-sorted. In parallel, CD11b/c<sup>+</sup> and lineage-negative NK1.1<sup>+</sup> conventional NK/ILC1s were FACS-sorted from the spleen. (b) Expression of indicated genes (mean  $\pm$  SD) was assessed by quantitative RT-PCR in each population isolated from 3–4 independent mice. Statistically significant differences between ILC3s and the other populations are indicated: \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001.

in intestinal Tconv cells (Fig. 1b), pointing to Th17 cells, the major T helper cell subset in the gut<sup>27</sup>, as another important population expressing *Tmem176a* and *b*.

The expression of both genes was therefore assessed in *in vitro* polarised Th cell subsets. As shown in Fig. 1c, expression of both genes was markedly induced in Th17 cells and, to a much lower extent, in induced Tregs (iTregs) but not in Th1 or Th2 cells. Within the lymphoid lineage, this expression profile mirrors the ones of *Rorc* or *Il17a* and is consistent with the findings reported by Ciofani *et al.*<sup>19</sup> showing that *Tmem176a* and *b* are direct targets of ROR $\gamma$ t in Th17 cells. Importantly, these results hold true in human T cells as high levels of both *TMEM176A* and *B* human orthologues were also found in *in vitro* polarised Th17 cells (Fig. 1d).

***Tmem176a* and *Tmem176b* are strongly expressed in ILC3s.** Similarly to Th17 cells, ILC3s require ROR $\gamma$ t for their development<sup>6</sup>, thus suggesting that high levels of *Tmem176a* and *b* expression should also be detected in these cells. To test for this hypothesis, we took advantage of a ROR $\gamma$ t-fate map mouse (*Rorc*( $\gamma$ t)-*Cre*<sup>TRG</sup>  $\times$  *Rosa26-tdRFP*) in which cells expressing, or having previously expressed, ROR $\gamma$ t are permanently marked by the tandem-dimer red fluorescent protein (RFP) and can be easily identified (Fig. 2a). We isolated lineage-negative (lin<sup>-</sup>) RFP<sup>+</sup> ILC3s and ex-ILC3s from the gut lamina propria<sup>28</sup>, and compared them to spleen and gut lin<sup>-</sup> RFP<sup>-</sup> NK1.1<sup>+</sup> ILC1s (including NK cells) for *Tmem176a* and *b* gene expression. Concordant with our hypothesis, the highest expression levels were indeed detected in the lin<sup>-</sup> RFP<sup>+</sup> population (Fig. 2b). In fact, *Tmem176a* and *b* mRNA expression respectively reached or was higher than the levels found in CD11b/c<sup>+</sup> myeloid cells that were previously considered as the strongest expressors of these two homologues among hematopoietic cells<sup>11,12</sup>. Thus, *Tmem176a* and *b* expression appears preferentially overexpressed in ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> lymphocytes, at least in Th17 cells and ILC3s.

***Tmem176a* and *Tmem176b* share a similar cation channel function.** *Tmem176a* and *b* genes are located within the same genomic locus in opposite direction (Fig. S1a), likely arising from the duplication of a common ancestral gene<sup>14</sup>, and are tightly co-regulated in various tissues<sup>11,12</sup>. Strikingly, we found that *Tmem176a* expression in Th17 cells was further increased in *Tmem176b*<sup>-/-</sup> compared to WT cells (mean fold change: 12.7  $\pm$  3.5 (SD) from 5 independent experiments) whereas the expression of other Th17-specific genes such as *Rorc*, *Il17a*, *Il17f*, *Ccl20* or *Sgk1*<sup>29,30</sup> were not altered (Fig. 3a). Consistently, IL-17A production revealed by intracellular FACS analysis remained unaltered (Fig. 3b). We<sup>12</sup> and others<sup>31</sup> have shown that *TMEM176A* and *B* are structurally similar transmembrane proteins that could physically interact. However, given that both homologues are also likely to function independently, *Tmem176a* upregulation might represent a physiological mechanism to compensate for the loss of *Tmem176b* and thus preserve, at least partially, their redundant and therefore presumably important ion channel activity.



**Figure 3. Expression compensation and ion channel activity of *Tmem176a* and *b*.** (a) Naive CD4<sup>+</sup> T cells from WT or *Tmem176b*<sup>-/-</sup> mice were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 under Th17 polarising conditions for 3 days. Expression of indicated genes was assessed by quantitative RT-PCR. Data show triplicates (mean  $\pm$  SD) for each condition and are representative of five independent experiments. \*\* $p < 0.01$ . ND: Not detected. (b) Intracellular ROR $\gamma$ t and IL-17A expression was assayed by FACS after PMA/ionomycin restimulation. (c) *Xenopus* oocytes were injected with *Tmem176a* or/and *Tmem176b* mRNA and currents were recorded in voltage-clamp 2–4 days later. Translocation of TMEM176A and TMEM176B to the plasma membrane was induced by a 30-min treatment with PMA. The currents were quantified 5–15 min after holding the extracellular pH at 5. Representative recordings are shown.

We recently demonstrated that *Tmem176b* encodes a non selective monovalent cation channel activated by acidification<sup>13</sup>. Protein sequence comparison across various mammalian species revealed that the most striking amino-acid conservations are concentrated within the three first transmembrane domains (Fig. S1b,c), strongly suggesting that both homologues could exert the same ion channel function. To test for this hypothesis, we expressed TMEM176A or TMEM176B proteins in *Xenopus* oocytes and recorded the electric activity under whole-cell patch clamp after PMA treatment in order to allow surface expression<sup>32</sup>. As shown in Fig. 3c, TMEM176A and B exhibited a similar ability to induce an inward current activated by acidification of the extracellular solution to pH 5, while concomitant expression resulted in the development of an even more intense current.

Taken together, these data show that both TMEM176A and B are cation channels, and suggest that each molecule has the potential to compensate for each other, either in terms of expression or function.

**TMEM176B intracellular localisation is strongly associated with the Golgi apparatus.** Having established the ion channel redundancy of TMEM176A and B, we next sought to determine their intracellular localisation in Th17 cells. We previously showed that, in DCs, TMEM176B is expressed in the endophagosomal membranes where its cationic conductance promotes V-ATPase activity and vesicular acidification<sup>13</sup>, a process referred to as counterion conductance. However, the localisation of TMEM176B in DCs is not restricted to the endophagosomes as we consistently observed TMEM176B expression in other intracellular vesicular compartments, notably in the perinuclear area<sup>11,13</sup>.

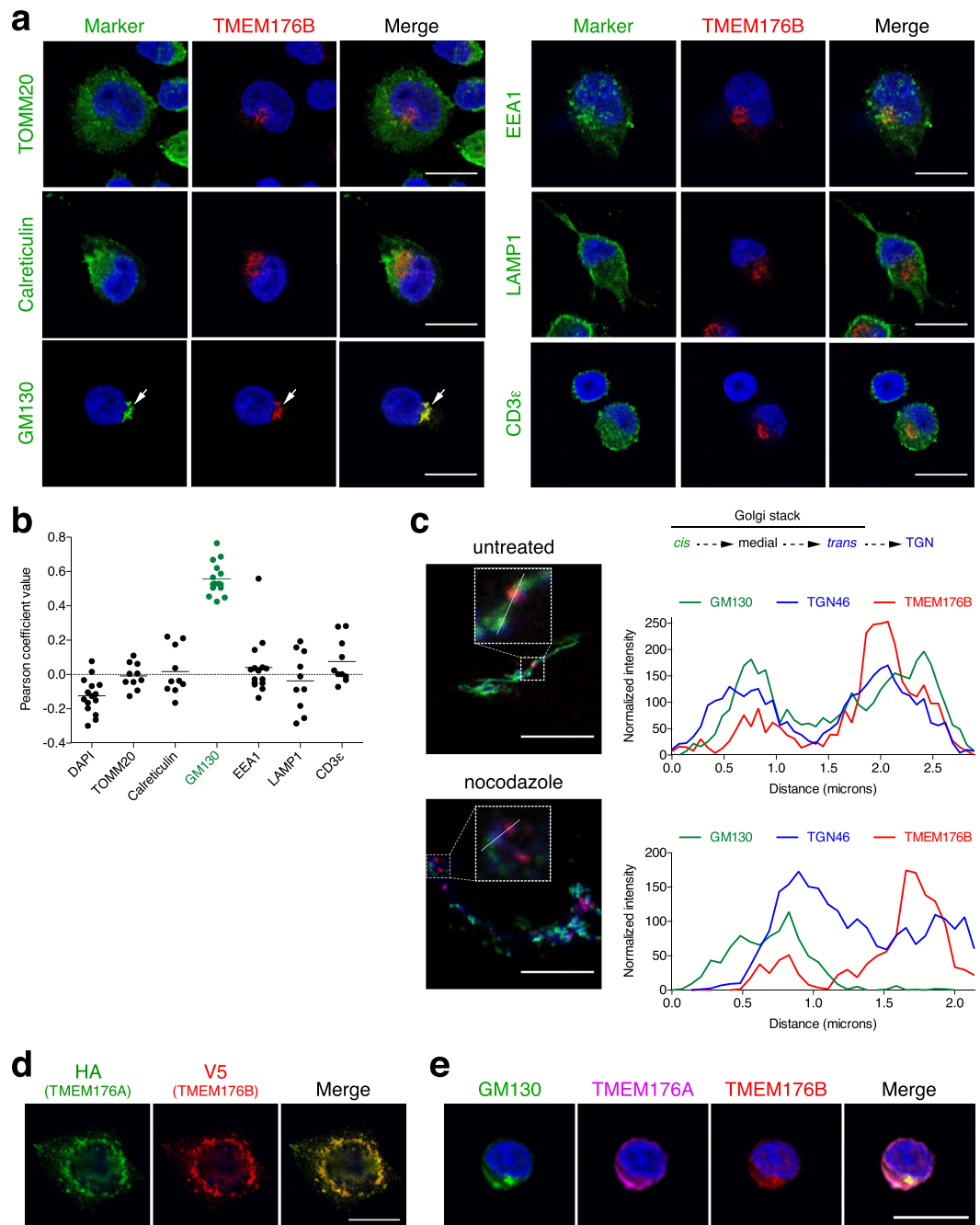
To determine the precise localisation of TMEM176B, we identified a polyclonal anti-human TMEM176B antibody whose specificity for indirect immunofluorescence application was checked on transiently transfected cells with an expression plasmid. Staining of *in vitro*-polarised human Th17 cells showed a predominant accumulation in a compact juxtannuclear compartment (Fig. 4a) while Th1 cells exhibited almost no staining (Fig. S2). This pattern was distinct from those observed with antibodies against the mitochondria (TOMM20), the endoplasmic reticulum (ER, calreticulin), the early endosomes (EEA1), the lysosomes (CD107a) or the T-cell receptor subunit CD3ε. In contrast, TMEM176B expression was closely apposed to GM130, a Golgi-resident protein, an observation confirmed by colocalisation measurement of several cells (Fig. 4b). Importantly, we found a similar pattern of expression in human monocyte-derived DCs (Fig. S3) as well as in HeLa cells (Fig. S4), strongly suggesting that TMEM176B association with the Golgi is a universal feature found in different types of cells. Of note, TMEM176B did not colocalise with autophagosomes in HeLa cells (Fig. S4).

The Golgi apparatus consists of a collection of stack of cisternae and associated vesicles where proteins and lipids from the ER enter at its *cis* face and exit at its *trans* face. In mammal cells, several stacks concentrate to form a compact Golgi ribbon that precludes precise discrimination of distinct regions. To further define the localisation of TMEM176B in relation with the Golgi, we treated HeLa cells with the microtubule-disrupting agent nocodazole that induces spatial separation of the Golgi stacks<sup>33</sup>. We combined TMEM176B analysis with GM130 (*cis*-Golgi) and TGN46 that marks the *trans*-Golgi face and the *trans*-Golgi network (TGN). Whereas untreated cells showed an expected dense and overlapping expression profile of the three proteins, nocodazole treatment allowed fragmentation of the Golgi apparatus and identification of individual stacks in which *cis* (GM130) to *trans* (TGN46) polarisation was discernable (Fig. 4c). Interestingly, TMEM176B expression was consistently more associated with TGN46 but also appeared clearly beyond this marker. Thus, TMEM176B is probably not a Golgi-resident protein but concentrates in vesicles in close proximity to the TGN from where it could emanate to reach (or be recycled from) the endosomal system, a finding which is coherent with TMEM176B detection in the phagosomal membrane in DCs<sup>13,34</sup>.

**TMEM176A and B are colocalised.** We next sought to determine the intracellular localisation of TMEM176A relative to TMEM176B. Co-transfection of HeLa cells with plasmids encoding epitope-tagged fusion proteins TMEM176A-HA and TMEM176B-V5 showed a strong colocalisation of these two proteins in the perinuclear region reminiscent of the Golgi apparatus but also in punctate, vesicle-like structures dispersed throughout the cytoplasm (Fig. 4d). Of note, this latter pattern of expression revealed by transfection and clearly outside from the Golgi was also observed in untransfected HeLa cells, Th17 cells and DCs by the TMEM176B-specific antibody, although to a lesser extent probably reflecting the detection limit of endogenous expression. In contrast to TMEM176B, we did not succeed in identifying a commercial antibody showing reproducible immunofluorescence specificity to human TMEM176A. We thus generated a rat polyclonal antibody directed against TMEM176A that could be combined with the rabbit antibody against TMEM176B and for which we checked the specificity on cells transiently expressing the fusion protein TMEM176A-HA. As shown in Fig. 4e, human Th17 cells displayed a strong colocalisation of TMEM176A and B along with GM130.

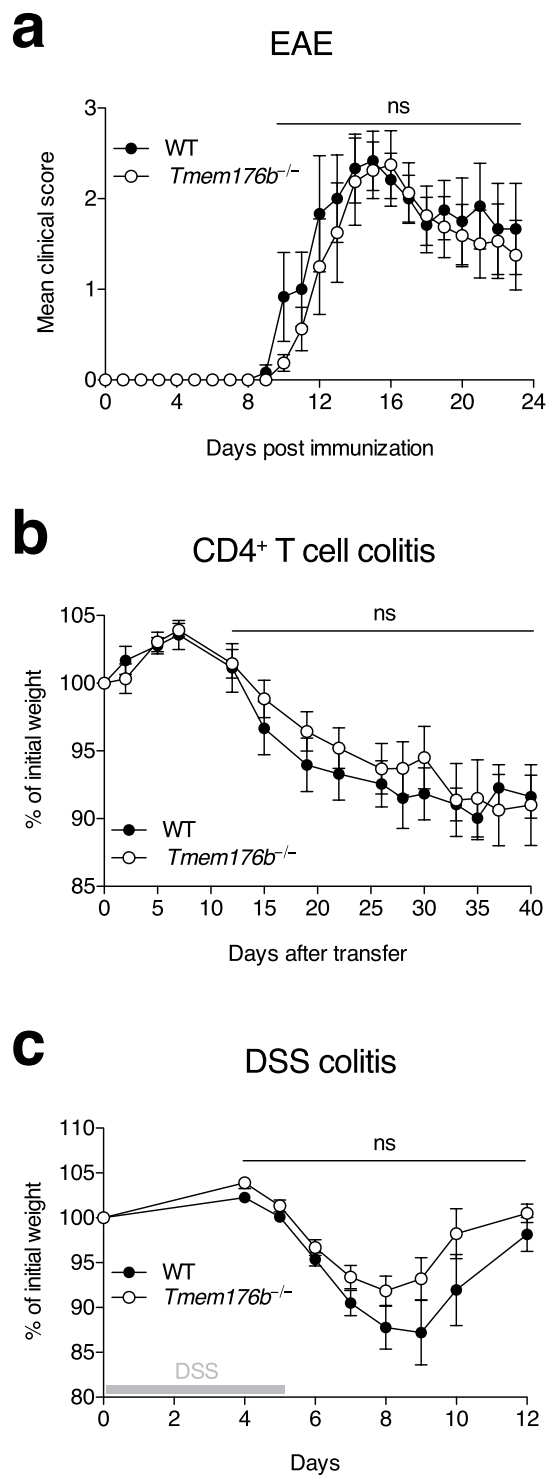
All together, these results show that TMEM176A and B are colocalised in intracellular vesicular structures that concentrate mainly in close association with the *trans* face of the Golgi apparatus, and more precisely the TGN.

**Impact of *Tmem176b* deficiency in mouse models of IMIDs.** High expression of *Tmem176a* and *b* in RORγt<sup>+</sup> cells suggests that these homologues play a role in immune disorders involving protective or pathogenic actions of these cells. Given that mice deficient for both genes or for *Tmem176a* alone were not available, we chose to analyse the *Tmem176b* single-KO mice that we previously described<sup>13</sup>. We first examined the susceptibility of these mice to the EAE model induced by the MOG<sub>35–55</sub> peptide, and which allowed the characterisation of RORγt as the master transcription factor for Th17 cells<sup>1</sup>. *Tmem176b* deficiency did not alter the susceptibility of mice to the disease, as we did not observe any significant difference between WT and *Tmem176b*<sup>-/-</sup> animals in terms of onset or severity of the disease (Fig. 5a). Second, we specifically assessed the role of *Tmem176b* in CD4<sup>+</sup> T cells by using the transfer model of colitis, in which the intrinsic expression of RORγt in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD45RB<sup>hi</sup> T



**Figure 4. Intracellular localisation of TMEM176A and TMEM176B.** (a) Human Th17 polarised cells from naive CD4<sup>+</sup> T cells were coated on microscopy slides, fixed, permeabilised and co-stained for TMEM176B (red) and the indicated markers (green). DAPI was used for nuclear staining (blue). Arrows indicate TMEM176B colocalisation with the *cis*-Golgi protein GM130. Bar, 10  $\mu$ m. (b) Pearson's correlation coefficients of TMEM176B and the indicated markers (n = 10–15 in each group). (c) HeLa cells were treated or not with nocodazole for 4 hr and subsequently fixed, permeabilised and co-stained for TMEM176B (red), GM130 (*cis*-Golgi, green) and TGN46 (*trans*-Golgi and *trans*-Golgi network (TGN), blue). Bar, 10  $\mu$ m. Insets represent higher magnifications of regions of interest. Linescans show fluorescence intensity along the lines overlaying the images. (d) HeLa cells were co-transfected with plasmids encoding TMEM176A-HA and TMEM176B-V5 fusion proteins and subsequently fixed, permeabilised and co-stained with HA (green) and V5 (red) monoclonal antibodies. DAPI was used for nuclear staining (blue). (e) Human Th17 polarised cells (as in A) were co-stained for GM130 (green), TMEM176A (purple) and TMEM176B (red). DAPI was used for nuclear staining (blue). Bar, 10  $\mu$ m.

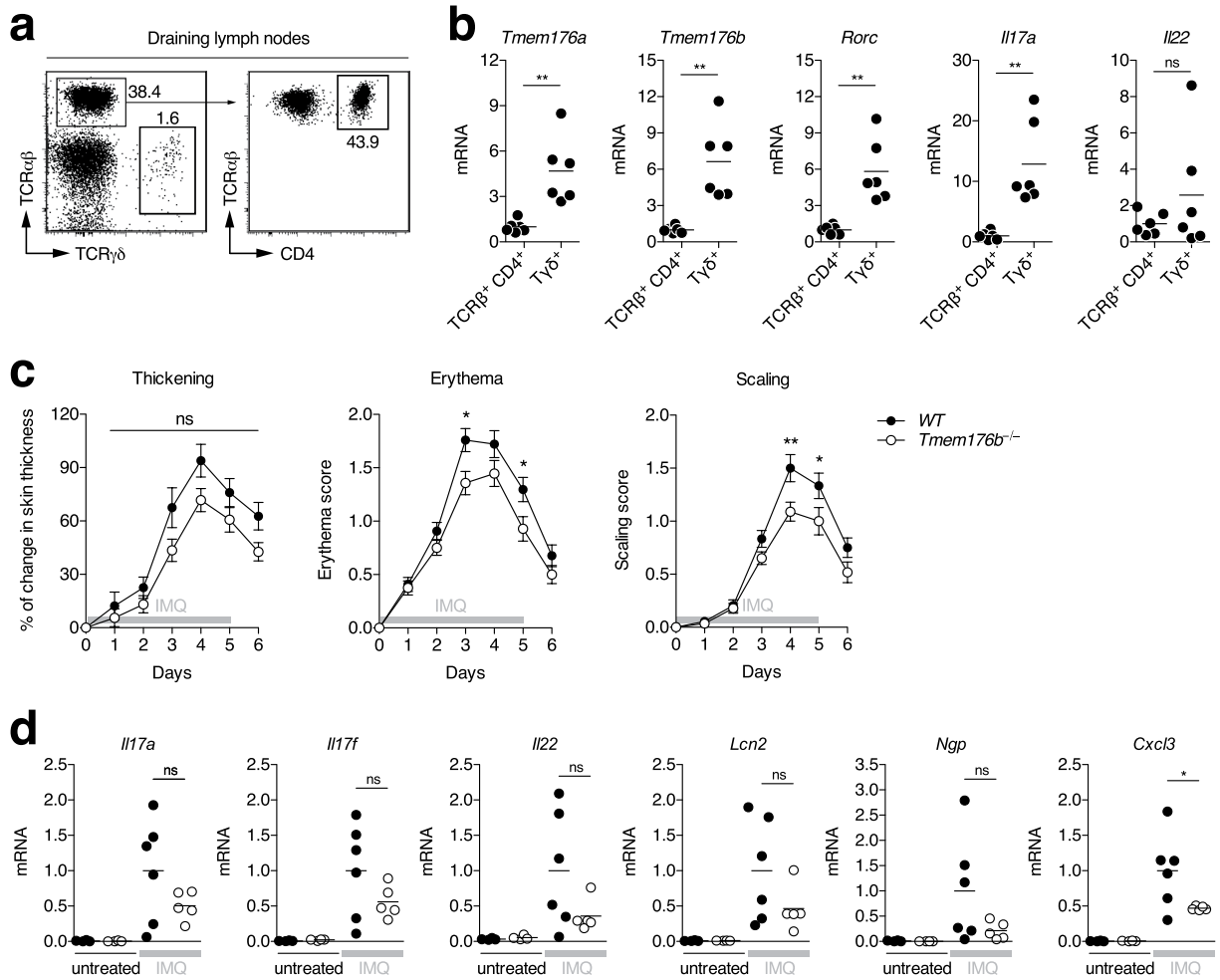
cells is known to be required to induce a severe colitis after injection into *Rag1*<sup>-/-</sup> recipients<sup>35</sup>. However, as shown in Fig. 5b, the absence of *Tmem176b* in transferred T cells did not alter the course of the disease. Next, to more



**Figure 5.** *Tmem176b* single-deficient mouse susceptibility to the development of EAE, chronic and acute colitis. **(a)** EAE was induced in WT ( $n = 6$ ) and *Tmem176b*<sup>-/-</sup> ( $n = 8$ ) mice by immunisation (s.c.) with MOG peptide in CFA. Clinical course of disease is shown. **(b)** Chronic colitis was induced in *Rag1*<sup>-/-</sup> mice ( $n = 11$ – $12$  in each group) by adoptive transfer (i.v.) of FACS-sorted CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>hi</sup> T cells from WT or *Tmem176b*<sup>-/-</sup> mice. Data are presented as percent of initial weight. **(c)** Acute colitis was induced in WT ( $n = 6$ ) and *Tmem176b*<sup>-/-</sup> ( $n = 8$ ) mice with 3% DSS in drinking water for 5 consecutive days. Data are presented as percent of initial weight.

specifically address the role of *Tmem176b* in innate cells, we moved to the dextran sulfate sodium (DSS) model of acute colitis. In this model, DSS rapidly induces epithelial damage leading to bacterial translocation and subsequent gut inflammation<sup>36,37</sup>. Previous work has demonstrated the crucial role of ILC3-derived IL-22 to restore





**Figure 6. *Tmem176b* single-deficient mouse susceptibility to the development of psoriasis-like dermatitis.**

(a) Psoriasis-like dermatitis was induced in WT mice by topical application of imiquimod (IMQ) cream on the shaved back skin. At day 4, draining (inguinal) lymph nodes were harvested and TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> and TCR $\beta$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells were FACS-sorted. (b) Expression of indicated genes was assessed by quantitative RT-PCR. Each dot represents an individual mouse (n = 6 in each group). Statistically significant differences are indicated: \*\*p < 0.01. (c) Psoriasis-like dermatitis was induced in WT (n = 27) and *Tmem176b*<sup>-/-</sup> (n = 28) mice by topical application of imiquimod (IMQ) cream on the shaved back skin during 5 consecutive days. Mice were weighed and scored daily on a scale from 0 to 4 for skin thickening, erythema and scaling. \*p < 0.05, \*\*\*p < 0.01. (d) Expression of indicated genes was assessed by quantitative RT-PCR in the skin of untreated or IMQ-treated WT and *Tmem176b*<sup>-/-</sup> mice (n = 4–6 in each group). Statistically significant differences between IMQ-treated WT and *Tmem176b*<sup>-/-</sup> mice are indicated: \*p < 0.05.

epithelial barrier integrity and thus recovery of treated mice<sup>38,39</sup>. Again, in this model, *Tmem176b*<sup>-/-</sup> mice exhibited no difference with WT animals regarding colitis severity or duration (Fig. 5c).

Lastly, we examined the model of psoriasis-like skin inflammation induced by topical application of Aldara cream (imiquimod, IMQ) where ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T cells and ILC3s, but not  $\alpha\beta$  T cells, are the primary source of pathogenic IL-17A, IL-17F and IL-22<sup>8,9,40</sup>. Importantly,  $\gamma\delta$  T cells isolated from the draining lymph nodes of treated mice (Fig. 6a) exhibited higher expression of *Tmem176a* and *b* than CD4<sup>+</sup> T cells, similarly to *Rorc* or *Il17a* (Fig. 6b). Interestingly, although thickening was similar, *Tmem176b*<sup>-/-</sup> mice exhibited significantly reduced reddening and scaling of the skin compared to WT mice (Fig. 6c). Furthermore, *Il17a*, *Il17f* and *Il22* as well as induced genes such as *Lcn2* (lipocalin-2), *Ngp* (neutrophilic granule protein) or *Cxcl3* mRNA levels of expression were decreased in the skin of treated *Tmem176b*<sup>-/-</sup> compared to WT mice but only with *Cxcl3* reaching statistical significance (Fig. 6d).

Thus, *Tmem176b* single-deficiency can be associated with a significant although limited reduction of ROR $\gamma$ t-dependent pathological inflammation that reinforces the possibility of compensatory mechanisms mediated by its homologue *Tmem176a*.

## Discussion

The discovery of Th17 cells as a distinct differentiation of T cell has sparked an intense research on their role in host defence and IMIDs. ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> lymphocytes comprise other cells than T cells and notably include ILC3s, the innate counterpart of Th17. Much attention has been given to these cells through the prism of key cytokines they produce, namely IL-17A, IL-17F, IL-22 or GM-CSF (CSF2), leading to mucosal defence and repair. In contrast to plasma membrane ion channels<sup>41</sup>, little is known about intracellular ion flows, especially if these channels are involved in specific immune cells. The high expression of TMEM176A and B cation channels in ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> cells is intriguing and could represent a novel therapeutic entry point for treating IMIDs.

Here we demonstrate that the homologues *Tmem176a* and *b* are strongly expressed in Th17 as compared to other CD4<sup>+</sup> T cells subsets both in mouse and human. These results extend the work of Ciofani *et al.* which revealed that, like *Il17a* and *f*, *Tmem176a* and *b* are direct targets of ROR $\gamma$ t in Th17 cells<sup>19</sup>. In line with these results, the expression levels of *Tmem176a* and *b* were found significantly decreased after pharmacological treatment specifically targeting Th17 transcriptional program<sup>42</sup>. We also found that Foxp3<sup>+</sup> Tregs exhibit a significant expression of *Tmem176a* and *b*, although to a lesser extent than Th17 cells, likely related to the presence of double positive Foxp3<sup>+</sup>ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> cells that now emerge as regulators of specific helper T cell responses in the colon<sup>43,44</sup>. Interestingly, with regard to Tregs, *Tmem176a* and *b* have recently been shown to be preferentially expressed in amphiregulin-producing IL-10<sup>-</sup>IL-18R<sup>+</sup> Tregs that are proficient in tissue repair<sup>45</sup>.

It is tempting to link the cation channel function of TMEM176A and B with the recent findings of the effect of sodium on Th17 cells<sup>29,30</sup>, Tregs<sup>46</sup> or M2 macrophages<sup>47</sup>. Furthermore, *TMEM176A* and *B* mRNA upregulation in whole blood cells of MS patients<sup>20</sup> raises the possibility of a causal connection with high dietary salt that has been associated with increased disease activity<sup>48</sup>.

Reasoning that *Tmem176a* and *b* may also be induced in other ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> lymphocytes, we found high levels of expression in intestinal ILC3s. Of note, given that RFP<sup>+</sup> cells from ROR $\gamma$ t-fate map mouse contain a substantial proportion of ROR $\gamma$ t<sup>-</sup> ex-ILC3s, this expression was likely underestimated, notably because intestinal lamina propria preparations included the colon which is particularly permissive for ROR $\gamma$ t loss in ILC3s<sup>28</sup>. Retrospective analysis of published microarray data comparing lung ILC2 and spleen ILC3s<sup>49</sup> revealed a clear differential expression of *Tmem176a* and *b* in ILC3s. However, this expression does not appear restricted to ILC3s since we found it substantially increased in ILC1s from the intestines compared to the spleen (conventional NK cells). In fact, Colonna and colleagues have recently shown that *Tmem176a* and *b* expression was also significantly increased in both ILC1s and ILC2s from the small intestine compared to conventional NK<sup>25</sup>. Thus, although *Tmem176a* and *b* highest levels of expression were found in ILC3, these genes could also play key roles in other types of ILCs, notably in the intestinal environment where local factors could favour their induction independently of ROR $\gamma$ t.

Besides Th17 cells and ILC3s, we also found that IL-17-producing  $\gamma\delta$  T cells preferentially expressed *Tmem176a* and *b*. In fact, the development of psoriasis-like dermatitis in which these cells are central was partially reduced in *Tmem176b* single-deficient mice, suggesting an important intrinsic role of both homologues in these emerging players of type 17 immunity.

Based on the *in vivo* and *in vitro* data presented here, we propose that TMEM176A and B exert a redundant ion channel function at the interface of the endosomal network and the Golgi apparatus. It is then likely that pronounced phenotypes will be observed only when the two homologues are simultaneously targeted. To this end, we are currently generating a double KO mouse that will represent an invaluable tool to elucidate the role of these cation channels in ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> cells or other cells such as selected DC subsets in which they are highly expressed<sup>50–52</sup>. Furthermore, conditional tissue-specific deletion will be instrumental to draw definitive conclusions on the contribution of *Tmem176a* and *b* in virtually any specific cell types.

To date, only one Golgi-resident ion channel (GPHR: Golgi pH regulator, *Gpr89*) have been reported to allow a pH gradient from the *cis* to the *trans* face of the Golgi apparatus that is crucial for optimal protein transport or glycosylation<sup>53</sup>. Counterion conductance generated by TMEM176B<sup>13</sup> and presumably by TMEM176A could be required for further acidification control of organelles linked to the TGN (*trans* Golgi network) such as maturing endophagosomes or secretory vesicles<sup>54</sup> and thus directly participate in the dynamic of the endocytic and exocytic system which is central for the cells to communicate with their surroundings. According to this hypothesis, we previously showed that non-physiological overexpression of *Tmem176b* in DCs altered their capacity to upregulate MHC II and CD86 molecules at the surface and to secrete IL-12<sup>11</sup>. Taking into consideration the pivotal role of ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> cells in tissues that interface with the microbial environment, these cells could foster specific intracellular processes required for their sentinel function and in which TMEM176A and B are involved.

## Methods

**Mice.** All mice in this study are on the C57BL/6 background. C57BL/6J mice were purchased from Centre d'élevage Janvier (France). *Foxp3<sup>EGFP</sup>* reporter mice<sup>55</sup> were provided by Bernard Malissen. BAC transgenic *Rorc*( $\gamma$ t)-*Cre*<sup>TG</sup> mice<sup>56</sup> (provided by Gérard Eberl) and *Rosa26-tdRFP* reporter mice<sup>57</sup> (generated by Hans Jörg Fehling and provided by Bernard Malissen) were crossed to obtain a ROR $\gamma$ t-fate map mouse. *Tmem176b*<sup>-/-</sup> mice were previously described<sup>13</sup> and backcrossed for 12 generations onto the C57BL/6J background. *Rag1*<sup>-/-</sup> were obtained from Institut Curie (Paris). All mice were kept under specific pathogen-free conditions and experimental procedures were carried out in strict accordance with the protocols approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of Pays de la Loire and authorized by the French Government's Ministry of Higher Education and Research.

**FACS analysis and cell sorting.** Antibodies used in this study for FACS analysis and sorting are listed in Supplementary Table 1. Red blood cells were lysed with ammonium chloride. CD16/32 antibody (BD Biosciences) was used to block the non-specific binding to Fc receptors before all stainings. Dead cells were excluded using DAPI (Invitrogen). For Tconv and Treg isolation from *Foxp3<sup>EGFP</sup>* reporter mice, CD45<sup>+</sup>TCR $\beta$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells,



respectively GFP<sup>-</sup> and GFP<sup>+</sup>, were FACS-sorted (BD FACS ARIA™ Iiu). Nrp1 staining was added to verify that the proportion of Nrp1<sup>-low</sup> “adaptive” pTregs was substantially increased in the intestines compared to the spleen. For ILC3 isolation, CD45<sup>+low</sup> lineage-negative (CD11b<sup>-</sup>CD11c<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>TCRαβ<sup>-</sup>TCRγδ<sup>-</sup>) RFP<sup>+</sup>NK1.1<sup>-</sup> cells were FACS-sorted from the intestines of RORγt-fate map mice (*Rorc(γt)-Cre<sup>tg</sup> × Rosa26-tdRFP*). Lineage-negative NK1.1<sup>+</sup> ILC1s were FACS-sorted from spleen or intestines. CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> myeloid cells were FACS-sorted from the spleen. TCRγδ<sup>+</sup> and TCRβ<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells were FACS-sorted from inguinal lymph nodes of mice developing psoriasis-like dermatitis. All populations were isolated (>10<sup>5</sup> cells per mouse) to a purity of >98%.

**Mouse *in vitro* Th polarisation.** Spleens were harvested from adult mice and red blood cells were lysed with ammonium chloride. CD4<sup>+</sup> T cells were enriched using magnetic-activated cell sorting (Miltenyi Biotec) and live (DAPI<sup>-</sup>) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>lo/-</sup> naive T cells were subsequently FACS-sorted to a purity of >98%. Cells were then cultured during 3 days in 48-well plates (5 × 10<sup>5</sup> cells per well) coated with 5 μg/mL anti CD3ε (145-2C11, BD Biosciences) in complete DMEM medium with GlutaMAX (Invitrogen) with 2 μg/mL soluble anti CD28 (37.51, BD Biosciences). Cultures were supplemented as follows. Th1: IL-12 (2 ng/mL, PeproTech) + neutralising anti IL-4 (2 μg/mL, eBioscience); Th2: IL-4 (2 ng/mL, eBioscience) + neutralising anti IFNγ (2 μg/mL, eBioscience); Th17: IL-6 (20 ng/mL, Sigma) + TGF-β (0.3 ng/mL, R&D systems) + neutralising anti IFNγ and anti IL-4; iTreg: TGF-β (5 ng/mL) + neutralising anti IFNγ and anti IL-4. Gene expression in Th1, Th2, Th17 and iTregs was compared to immature bone marrow-derived DCs generated as previously described<sup>13</sup>.

**Human *in vitro* Th polarisation.** Peripheral blood samples were collected from healthy donors upon written informed consent and approval by the Institutional Review Board (Etablissement Français du Sang Pays de la Loire, Nantes, France). This study was conducted in accordance with the approved guidelines by the Declaration of Helsinki. Live (DAPI<sup>-</sup>) CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup> naive T cells were FACS-sorted to a purity of >98% and then cultured during 6 days in 96-well round-bottom plates (50,000 cells per well) coated with 5 μg/mL anti CD3ε (OKT3, prepared in the laboratory) in complete RPMI medium (Invitrogen) with 1 μg/mL soluble anti CD28 (CD28.2, prepared in the laboratory). Cultures were supplemented as follows. Th1: IL-12 (10 ng/mL, R&D systems); Th17: TGF-β (12.5 ng/mL, Peprotech) + IL-1β (5 ng/mL, Peprotech) + IL-6 (25 ng/mL, Peprotech) + IL-23 (25 ng/mL, Peprotech).

**Quantitative RT-PCR.** Total RNA from cells was isolated using RNeasy Mini Kit (Qiagen). Skin samples were powderised at low temperature before total RNA isolation using TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). Reverse transcription was performed using M-MLV Reverse Transcriptase and random primers following manufacturer's instructions (Invitrogen). Gene expression was assessed with the Fast SYBR Green Master Mix reagent (Applied Biosystems, Foster City, CA). Mouse and human-specific primers used in this study (listed in Supplementary Table 2) were all designed over different exons to prevent amplification of genomic DNA. Real-time PCR was performed using the ViiA 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). For both mouse and human, gene expression was normalised to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh/GAPDH*) and expressed in arbitrary units using the 2<sup>-ΔΔCt</sup> method.

**Experimental Autoimmune-Encephalomyelitis (EAE) induced by immunisation with MOG<sub>35-55</sub> peptide.** Mice aged 8–12 weeks were immunised subcutaneously at the base of the tail and lower flanks with 200 μg of MOG<sub>35-55</sub> peptide (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK, purity >85%, Genecust Europe, France) emulsified with complete Freund's adjuvant supplemented with Mycobacterium tuberculosis H37Ra at 6 mg/mL (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). Pertussis toxin (300 ng) was injected intraperitoneally (i.p.) on the day of immunisation and 2 days later. (Calbiochem, Darmstadt, Germany). Mice were scored daily for EAE clinical signs on a scale of 0–5: 0, no disease; 1, complete limp tail; 2, limp tail with unilateral hindlimb paralysis; 3, bilateral hindlimb paralysis; 4, bilateral hindlimb paralysis and forelimb weakness (end point). The observer was blinded to the genotype during the scoring.

**Chronic colitis induced by CD4<sup>+</sup> T cell adoptive transfer.** Naive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD45RB<sup>hi</sup> T cells from the spleen were FACS-sorted to a purity of >98% and 5 × 10<sup>5</sup> cells were injected intravenously into C57BL/6 *Rag1*<sup>-/-</sup> recipients aged 8–12 weeks. Mice were monitored and weighed daily.

**Acute colitis induced by dextran sulfate sodium (DSS).** Mice aged 8–12 weeks were given 3% DSS (36,000–50,000 MW, MP Biomedical, Santa Ana, CA) in drinking water ad libitum as indicated for 5 days followed by a recovery period without DSS. Mice were monitored and weighed daily.

**Psoriasis-like skin inflammation induced by imiquimod (IMQ) cream.** Backs of mice aged 8–12 weeks were shaved with an electric clipper and then treated with depilatory cream (Veet) to remove hair. Two days later, mice received a daily topical dose of 62.5 mg of commercially available IMQ cream 5% (Aldara, 3M Pharmaceuticals) on the shaved back for 5 consecutive days, as previously described<sup>58</sup>. Mice were scored daily for skin inflammation. Dorsal skin thickening was determined by measuring double-skinfold thickness using a digital micrometer (Mitutoyo). Erythema and scaling were scored independently on a scale from 0 to 4: 0 = none, 1 = slight, 2 = moderate, 3 = marked, 4 = severe. For quantitative RT-PCR analysis, back skins were harvested from mice treated with IMQ at day 4 or from untreated mice.

**Confocal microscopy analysis.** Antibodies used in this study for confocal microscopy analysis are listed in supplementary Table 3. Th17 cells were plated on poly-L-lysine-coated slides (Thermo Scientific) for 1, 5 hr in complete medium at 37 °C. The cells were then washed with PBS and fixed in 4% paraformaldehyde, 4%

sucrose for 15 min at RT followed by 3 washes with PBS and permeabilisation in 0.05% Triton-X100 for 15 min at RT. Stainings were then directly performed with primary antibodies (diluted in PBS) for 2 h at RT followed by 3 washes with PBS (5 min each at RT) and stainings with adapted secondary antibodies conjugated with fluorochromes (or biotin) for 30 min at RT. A step with fluorochrome-conjugated streptavidin was added when necessary. After 3 washes with PBS (5 min each at RT), DAPI (diluted in PBS) was incubated 10 min at RT. Slides were mounted with ProLong Gold antifade (Invitrogen). Images were obtained with A1 R Si Confocal microscope (Nikon, Champigny sur Marne, France) and analysed with Fiji software. Pearson's correlation coefficients were calculated with Volocity software (PerkinElmer).

HeLa were seeded in 8-well  $\mu$ -Slide (ibidi) and immunostaining was achieved as described above for Th17. HeLa cells were treated with 10  $\mu$ M nocodazole (Sigma) for 4 hr prior fixation to disrupt the juxtannuclear Golgi ribbon. Linescan data were generated with Fiji software and plotted using Graphpad Prism software (La Jolla, CA). HeLa cells were transfected (Lipofectamine 2000, Invitrogen) with expression plasmids (pCI-neo, Promega) in which we cloned human *TMEM176A* (NM\_018487.2) (codon optimisation was performed on a 5' region of *TMEM176A* sequence to decreased G/C content) or *TMEM176B* (NM\_014020.3) cDNA fused (C-term) to HA (YPYDVPDYA) or V5 (GKPIPPLLGLDST) epitopes, respectively. After 48 hr, the cells were fixed, permeabilized and co-stained with monoclonal antibodies against HA or V5 followed by secondary antibody staining. HA and V5 specificity was verified on cells separately transfected with *TMEM176A*-HA or *TMEM176B*-V5-encoding plasmids.

**Statistical analysis.** All statistical analyses were performed using Graphpad Prism software (La Jolla, CA) with two-tailed unpaired Student's t test or one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. P values < 0.05 were considered significant.

## References

- Ivanov, I. I. *et al.* The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* **126**, 1121–1133, doi: 10.1016/j.cell.2006.07.035 (2006).
- Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M. & Kuchroo, V. K. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* **27**, 485–517, doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132710 (2009).
- Weaver, C. T., Elson, C. O., Fouser, L. A. & Kolls, J. K. The Th17 pathway and inflammatory diseases of the intestines, lungs, and skin. *Annu Rev Pathol* **8**, 477–512, doi: 10.1146/annurev-pathol-011110-130318 (2013).
- Hueber, W. *et al.* Secukinumab, a human anti-IL-17A monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn's disease: unexpected results of a randomised, double-blind placebo-controlled trial. *Gut* **61**, 1693–1700, doi: 10.1136/gutjnl-2011-301668 (2012).
- Langley, R. G. *et al.* Secukinumab in plaque psoriasis—results of two phase 3 trials. *N Engl J Med* **371**, 326–338, doi: 10.1056/NEJMoa1314258 (2014).
- Eberl, G., Colonna, M., Di Santo, J. P. & McKenzie, A. N. Innate lymphoid cells. Innate lymphoid cells: a new paradigm in immunology. *Science* **348**, aaa6566, doi: 10.1126/science.aaa6566 (2015).
- Mabuchi, T., Takekoshi, T. & Hwang, S. T. Epidermal CCR6+ gammadelta T cells are major producers of IL-22 and IL-17 in a murine model of psoriasisiform dermatitis. *J Immunol* **187**, 5026–5031, doi: 10.4049/jimmunol.1101817 (2011).
- Cai, Y. *et al.* Pivotal role of dermal IL-17-producing gammadelta T cells in skin inflammation. *Immunity* **35**, 596–610, doi: 10.1016/j.immuni.2011.08.001 (2011).
- Pantelyushin, S. *et al.* Ror $\gamma$  innate lymphocytes and gammadelta T cells initiate psoriasisiform plaque formation in mice. *J Clin Invest* **122**, 2252–2256, doi: 10.1172/JCI61862 (2012).
- Lee, J. S. *et al.* Interleukin-23-Independent IL-17 Production Regulates Intestinal Epithelial Permeability. *Immunity* **43**, 727–738, doi: 10.1016/j.immuni.2015.09.003 (2015).
- Louvet, C. *et al.* Identification of a new member of the CD20/Fc $\epsilon$ 1/R $\beta$  family overexpressed in tolerated allografts. *Am J Transplant* **5**, 2143–2153, doi: 10.1111/j.1600-6143.2005.01007.x (2005).
- Condamine, T. *et al.* Tmem176B and Tmem176A are associated with the immature state of dendritic cells. *J Leukoc Biol* **88**, 507–515, doi: 10.1189/jlb.1109738 (2010).
- Segovia, M. *et al.* Autologous dendritic cells prolong allograft survival through Tmem176b-dependent antigen cross-presentation. *Am J Transplant* **14**, 1021–1031, doi: 10.1111/ajt.12708 (2014).
- Zuccolo, J. *et al.* Phylogenetic analysis of the MS4A and TMEM176 gene families. *PLoS One* **5**, e9369, doi: 10.1371/journal.pone.0009369 (2010).
- Maeda, Y. *et al.* Role of Clast1 in development of cerebellar granule cells. *Brain Res* **1104**, 18–26, doi: 10.1016/j.brainres.2006.05.068 (2006).
- Ryu, S. H. *et al.* Oncogenic Ras-mediated downregulation of Clast1/LR8 is involved in Ras-mediated neoplastic transformation and tumorigenesis in NIH3T3 cells. *Cancer Sci* **101**, 1990–1996, doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01626.x (2010).
- Yano, M., Kawao, N., Tamura, Y., Okada, K. & Kaji, H. A novel factor, Tmem176b, induced by activin-like kinase 2 signal promotes the differentiation of myoblasts into osteoblasts. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **122**, 7–14, doi: 10.1055/s-0033-1357129 (2014).
- Otsubo, T. *et al.* Identification of novel targets for antiangiogenic therapy by comparing the gene expressions of tumor and normal endothelial cells. *Cancer Sci* **105**, 560–567, doi: 10.1111/cas.12394 (2014).
- Ciofani, M. *et al.* A validated regulatory network for Th17 cell specification. *Cell* **151**, 289–303, doi: 10.1016/j.cell.2012.09.016 (2012).
- Nickles, D. *et al.* Blood RNA profiling in a large cohort of multiple sclerosis patients and healthy controls. *Hum Mol Genet* **22**, 4194–4205, doi: 10.1093/hmg/ddt267 (2013).
- Matuszewicz, D. *et al.* Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult Scler* **5**, 101–104 (1999).
- Tzartos, J. S. *et al.* Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol* **172**, 146–155, doi: 10.2353/ajpath.2008.070690 (2008).
- Kebir, H. *et al.* Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol* **66**, 390–402, doi: 10.1002/ana.21748 (2009).
- Cao, Y. *et al.* Functional inflammatory profiles distinguish myelin-reactive T cells from patients with multiple sclerosis. *Sci Transl Med* **7**, 287ra274, doi: 10.1126/scitranslmed.aaa8038 (2015).
- Robinette, M. L. *et al.* Transcriptional programs define molecular characteristics of innate lymphoid cell classes and subsets. *Nat Immunol* **16**, 306–317, doi: 10.1038/ni.3094 (2015).
- Yadav, M. *et al.* Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets *in vivo*. *J Exp Med* **209**, 1713–1722, S1711–1719, doi: 10.1084/jem.20120822 (2012).
- Atarashi, K. *et al.* ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation. *Nature* **455**, 808–812, doi: 10.1038/nature07240 (2008).

28. Vonarbourg, C. *et al.* Regulated expression of nuclear receptor ROR $\gamma$  confers distinct functional fates to NK cell receptor-expressing ROR $\gamma$  innate lymphocytes. *Immunity* **33**, 736–751, doi: 10.1016/j.immuni.2010.10.017 (2010).
29. Kleinewietfeld, M. *et al.* Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. *Nature* **496**, 518–522, doi: 10.1038/nature11868 (2013).
30. Wu, C. *et al.* Induction of pathogenic TH17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1. *Nature* **496**, 513–517, doi: 10.1038/nature11984 (2013).
31. Cuajungco, M. P. *et al.* Abnormal accumulation of human transmembrane (TMEM)-176A and 176B proteins is associated with cancer pathology. *Acta Histochem* **114**, 705–712, doi: 10.1016/j.acthis.2011.12.006 (2012).
32. Lan, J. Y. *et al.* Protein kinase C modulates NMDA receptor trafficking and gating. *Nat Neurosci* **4**, 382–390, doi: 10.1038/86028 (2001).
33. Dejgaard, S. Y., Murshid, A., Dee, K. M. & Presley, J. F. Confocal microscopy-based linescan methodologies for intra-Golgi localization of proteins. *J Histochem Cytochem* **55**, 709–719, doi: 10.1369/jhc.6A7090.2007 (2007).
34. Shui, W. *et al.* Membrane proteomics of phagosomes suggests a connection to autophagy. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 16952–16957, doi: 10.1073/pnas.0809218105 (2008).
35. Leppkes, M. *et al.* ROR $\gamma$ -expressing Th17 cells induce murine chronic intestinal inflammation via redundant effects of IL-17A and IL-17F. *Gastroenterology* **136**, 257–267, doi: 10.1053/j.gastro.2008.10.018 (2009).
36. Chassaing, B., Aitken, J. D., Malleshappa, M. & Vijay-Kumar, M. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Curr Protoc Immunol* **104**, Unit 15 25, doi: 10.1002/0471142735.im1525s104 (2014).
37. Martin, J. C., Bériou, G. & Josien, R. Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Acute Colitis in the Rat. *Methods Mol Biol* **1371**, 197–203, doi: 10.1007/978-1-4939-3139-2\_12 (2016).
38. Sugimoto, K. *et al.* IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J Clin Invest* **118**, 534–544, doi: 10.1172/JCI33194 (2008).
39. Pickert, G. *et al.* STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *J Exp Med* **206**, 1465–1472, doi: 10.1084/jem.20082683 (2009).
40. Van Belle, A. B. *et al.* IL-22 is required for imiquimod-induced psoriasiform skin inflammation in mice. *J Immunol* **188**, 462–469, doi: 10.4049/jimmunol.1102224 (2012).
41. Feske, S., Wulff, H. & Skolnik, E. Y. Ion channels in innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* **33**, 291–353, doi: 10.1146/annurev-immunol-032414-112212 (2015).
42. Mele, D. A. *et al.* BET bromodomain inhibition suppresses TH17-mediated pathology. *J Exp Med* **210**, 2181–2190, doi: 10.1084/jem.20130376 (2013).
43. Ohnmacht, C. *et al.* MUCOSAL IMMUNOLOGY. The microbiota regulates type 2 immunity through ROR $\gamma$  T cells. *Science* **349**, 989–993, doi: 10.1126/science.aac4263 (2015).
44. Sefik, E. *et al.* MUCOSAL IMMUNOLOGY. Individual intestinal symbionts induce a distinct population of ROR $\gamma$  regulatory T cells. *Science* **349**, 993–997, doi: 10.1126/science.aaa9420 (2015).
45. Arpaia, N. *et al.* A Distinct Function of Regulatory T Cells in Tissue Protection. *Cell* **162**, 1078–1089, doi: 10.1016/j.cell.2015.08.021 (2015).
46. Hernandez, A. L. *et al.* Sodium chloride inhibits the suppressive function of FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Clin Invest* **125**, 4212–4222, doi: 10.1172/JCI81151 (2015).
47. Binger, K. J. *et al.* High salt reduces the activation of IL-4- and IL-13-stimulated macrophages. *J Clin Invest* **125**, 4223–4238, doi: 10.1172/JCI80919 (2015).
48. Farez, M. F., Fiol, M. P., Gaitan, M. I., Quintana, F. J. & Correale, J. Sodium intake is associated with increased disease activity in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **86**, 26–31, doi: 10.1136/jnnp-2014-307928 (2015).
49. Monticelli, L. A. *et al.* Innate lymphoid cells promote lung-tissue homeostasis after infection with influenza virus. *Nat Immunol* **12**, 1045–1054, doi: 10.1038/ni.2131 (2011).
50. Gao, Y. *et al.* Control of T helper 2 responses by transcription factor IRF4-dependent dendritic cells. *Immunity* **39**, 722–732, doi: 10.1016/j.immuni.2013.08.028 (2013).
51. Jaitin, D. A. *et al.* Massively parallel single-cell RNA-seq for marker-free decomposition of tissues into cell types. *Science* **343**, 776–779, doi: 10.1126/science.1247651 (2014).
52. Anandasabapathy, N. *et al.* Classical Fc $\gamma$ 3L-dependent dendritic cells control immunity to protein vaccine. *J Exp Med* **211**, 1875–1891, doi: 10.1084/jem.20131397 (2014).
53. Maeda, Y., Ide, T., Koike, M., Uchiyama, Y. & Kinoshita, T. GPHR is a novel anion channel critical for acidification and functions of the Golgi apparatus. *Nat Cell Biol* **10**, 1135–1145, doi: 10.1038/ncb1773 (2008).
54. Casey, J. R., Grinstein, S. & Orłowski, J. Sensors and regulators of intracellular pH. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 50–61, doi: 10.1038/nrm2820 (2010).
55. Wang, Y. *et al.* Th2 lymphoproliferative disorder of LatY136F mutant mice unfolds independently of TCR-MHC engagement and is insensitive to the action of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Immunol* **180**, 1565–1575 (2008).
56. Lochner, M. *et al.* *In vivo* equilibrium of proinflammatory IL-17<sup>+</sup> and regulatory IL-10<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> ROR $\gamma$  T cells. *J Exp Med* **205**, 1381–1393, doi: 10.1084/jem.20080034 (2008).
57. Luche, H., Weber, O., Nageswara Rao, T., Blum, C. & Fehling, H. J. Faithful activation of an extra-bright red fluorescent protein in “knock-in” Cre-reporter mice ideally suited for lineage tracing studies. *Eur J Immunol* **37**, 43–53, doi: 10.1002/eji.200636745 (2007).
58. van der Fits, L. *et al.* Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *J Immunol* **182**, 5836–5845, doi: 10.4049/jimmunol.0802999 (2009).

## Acknowledgements

This work was supported by the Labex IGO project (n°ANR-11-LABX-0016-01) funded by the «Investissements d’Avenir» French Government programme, managed by the French National Research Agency (ANR). This work was realised in the context of the IHU-Cesti project which received French government financial support managed by the National Research Agency via the «Investment Into The Future programme» ANR-10-IBHU-005. The IHU-Cesti project is also supported by Nantes Métropole and région Pays de la Loire. LD was supported by an Inserm-Région Pays de la Loire fellowship. CL was supported by Fondation Progreffe. We are grateful to Philippe Hulin and Steven Nedellec from the MicroPICell imagery core facility (Nantes, France) for excellent assistance with confocal microscopy and to Claire Usal, Emmanuel Merieau and Chad Lemee for mouse housing and experimental help. We thank Gérard Eberl for providing *Rorc*( $\gamma$ )-*Cre*<sup>tg</sup> mice.

## Author Contributions

Conceptualization, C.L., A.M., E.C., J.C.M., R.J. and M.C.C.; Investigation, C.L., L.D., A.L., M.L., T.C., F.G., G.B., L.B.D., G.B., A.B.N. and P.C.; Resources, H.J.F.; Funding Acquisition, C.L. and M.C.C.; Writing—Original Draft, C.L.; Writing—Review & Editing, C.L., J.C.M. and R.J.

### Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

**Competing financial interests:** The authors declare no competing financial interests.

**How to cite this article:** Drujont, L. *et al.* ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> cells selectively express redundant cation channels linked to the Golgi apparatus. *Sci. Rep.* **6**, 23682; doi: 10.1038/srep23682 (2016).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

## Supplementary Informations

### **ROR $\gamma$ <sup>t</sup> cells selectively express redundant cation channels linked to the Golgi apparatus**

Lucile Drujon<sup>1</sup>, Aurélie Lemoine<sup>1</sup>, Aurélie Moreau<sup>1</sup>, Géraldine Bienvenu<sup>1</sup>, Mélanie Lancien<sup>1</sup>, Thierry Cens<sup>2</sup>, Flora Guillot<sup>1</sup>, Gaëlle Bériou<sup>1</sup>, Laurence Bouchet-Delbos<sup>1</sup>, Hans Jörg Fehling<sup>3</sup>, Elise Chiffolleau<sup>1</sup>, Arnaud Nicot<sup>1</sup>, Pierre Charnet<sup>2</sup>, Jérôme Christophe Martin<sup>1,4,5</sup>, Régis Josien<sup>1,4,5</sup>, Maria Cristina Cuturi<sup>1,6</sup> and Cédric Louvet<sup>1,6,\*</sup>

<sup>1</sup> INSERM UMR 1064, Center for Research in Transplantation and Immunology; Université de Nantes; CHU Nantes, Institut de Transplantation Urologie Néphrologie (ITUN); 44093 Nantes, France.

<sup>2</sup> CNRS UMR 5237, CRBM, 34293 Montpellier, France.

<sup>3</sup> Institute of Immunology, University Clinics Ulm, 8901 Ulm, Germany

<sup>4</sup> Faculté de Médecine, Université de Nantes, 44093 Nantes, France.

<sup>5</sup> Laboratoire d'Immunologie, CHU Nantes, 44093 Nantes, France.

<sup>6</sup> Co-senior authors.

\* Corresponding author.

## Supplementary Figure Legends

### **Figure S1. *Tmem176a/b* genomic locus, amino acid and structural identities of TMEM176A**

**and TMEM176B homologs. (a)** Organisation of *Tmem176a/b* mouse genomic locus (6 B2.3; 6).

For each gene, exons are shown (boxes) with untranslated (light) regions and translated (dark,

ATG : start codon). **(b)** TMEM176A and B protein sequences from mouse (NP\_079602.4,

NP\_075543.1), rat (NP\_001034097.1, NP\_599217.1), dog (XP\_532758.1, XP\_005629732.1), pig

(XP\_005657767.1, XP\_003484042.1), cattle (NP\_991348.1, NP\_001092615.1), chimpanzee

(XP\_009452826.1, XP\_003318950.1) and human (NP\_060957.2, NP\_054739.3) were aligned

using Clustal Omega (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/clustalw>). The four predicted transmembrane

domains are indicated (grey). Complete (red) and partial (orange) identities were mainly found in

the N-terminal region and within the three first transmembrane domains. **(c)** Graphical

representation of the topology of mouse TMEM176A and B proteins using Protter<sup>1</sup>

(<http://wlab.ethz.ch/protter/start/>).

### **Figure S2. TMEM176B protein expression in Th1 and Th17 cells.** Human Th1 or Th17

polarized cells from naive CD4<sup>+</sup> T cells were coated on microscopy slides, fixed, permeabilized and

stained for TMEM176B (red). DAPI was used for nuclear staining (blue). Bar, 10  $\mu$ m.

### **Figure S3. Intracellular localization of TMEM176B in human monocyte-derived DCs. (a)**

Monocytes were isolated from peripheral blood mononuclear cells from healthy volunteers donors

(French Blood Service, Nantes, France) and cultured for 7 days in complete RPMI medium

(Invitrogen) supplemented with recombinant human GM-CSF (1000 U/mL) and IL-4 (200 U/mL) (CellGenix, Germany) in 6-well plates. Immature monocyte-derived DCs (Mo-DCs) were then coated on microscopy slides, fixed, permeabilized and co-stained for TMEM176B (red) and the indicated markers (green). DAPI was used for nuclear staining (blue). Arrows indicate TMEM176B colocalization with the *cis*-Golgi protein GM130. Bar, 10  $\mu$ m. **(b)** Pearson's correlation coefficients of TMEM176B and the indicated markers (n = 10–17 in each group).

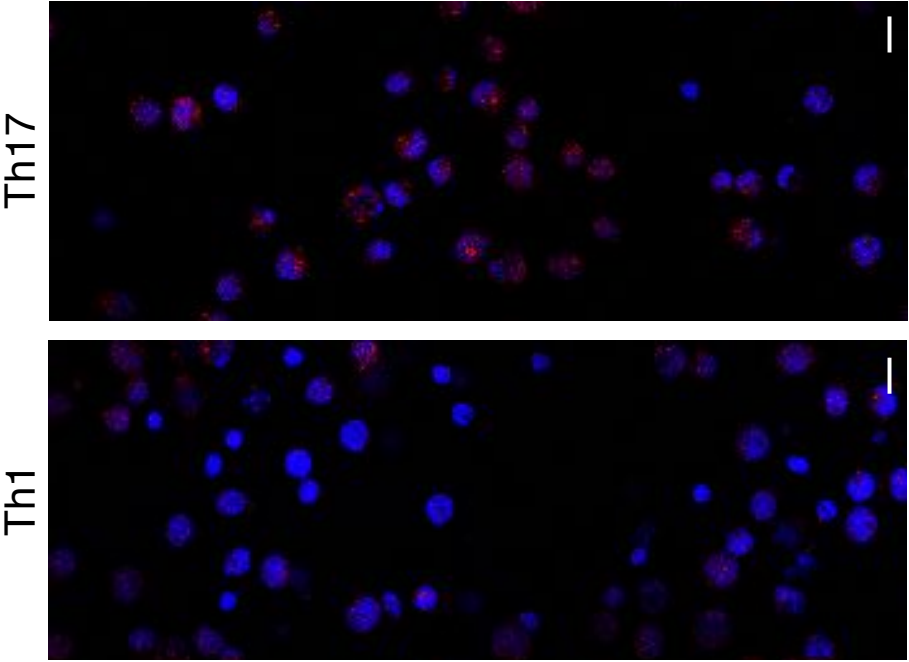
**Figure S4. Intracellular localization of TMEM176B in HeLa cells.** **(a)** HeLa were cultured in 8-well  $\mu$ -Slide (ibidi) and then fixed, permeabilized and co-stained for TMEM176B (red) and the indicated markers (green). DAPI was used for nuclear staining (blue). Arrows indicate TMEM176B colocalization with the *cis*-Golgi protein GM130. Bar, 10  $\mu$ m. **(b)** HeLa cells were treated with 1  $\mu$ M Rapamycin and 20  $\mu$ M chloroquine (CQ) (Enzo Life Sciences) for 18 hr at 37°C to induce the formation and accumulation of autophagosomes<sup>2</sup> detected by LC3-specific antibody (Nanotools) or Cyto-ID Green dye (Enzo Life Sciences). **(c)** Pearson's correlation coefficients of TMEM176B and the indicated markers (n = 7-10 in each group).



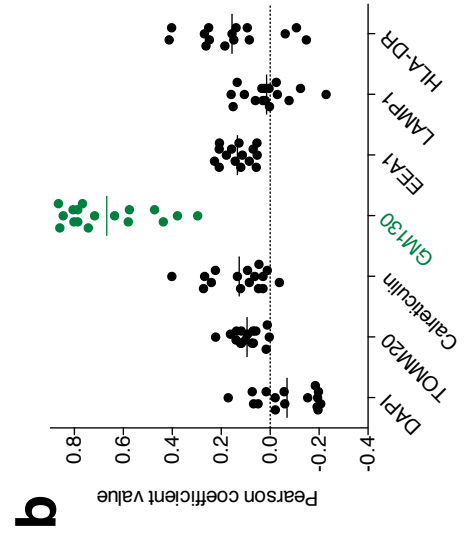
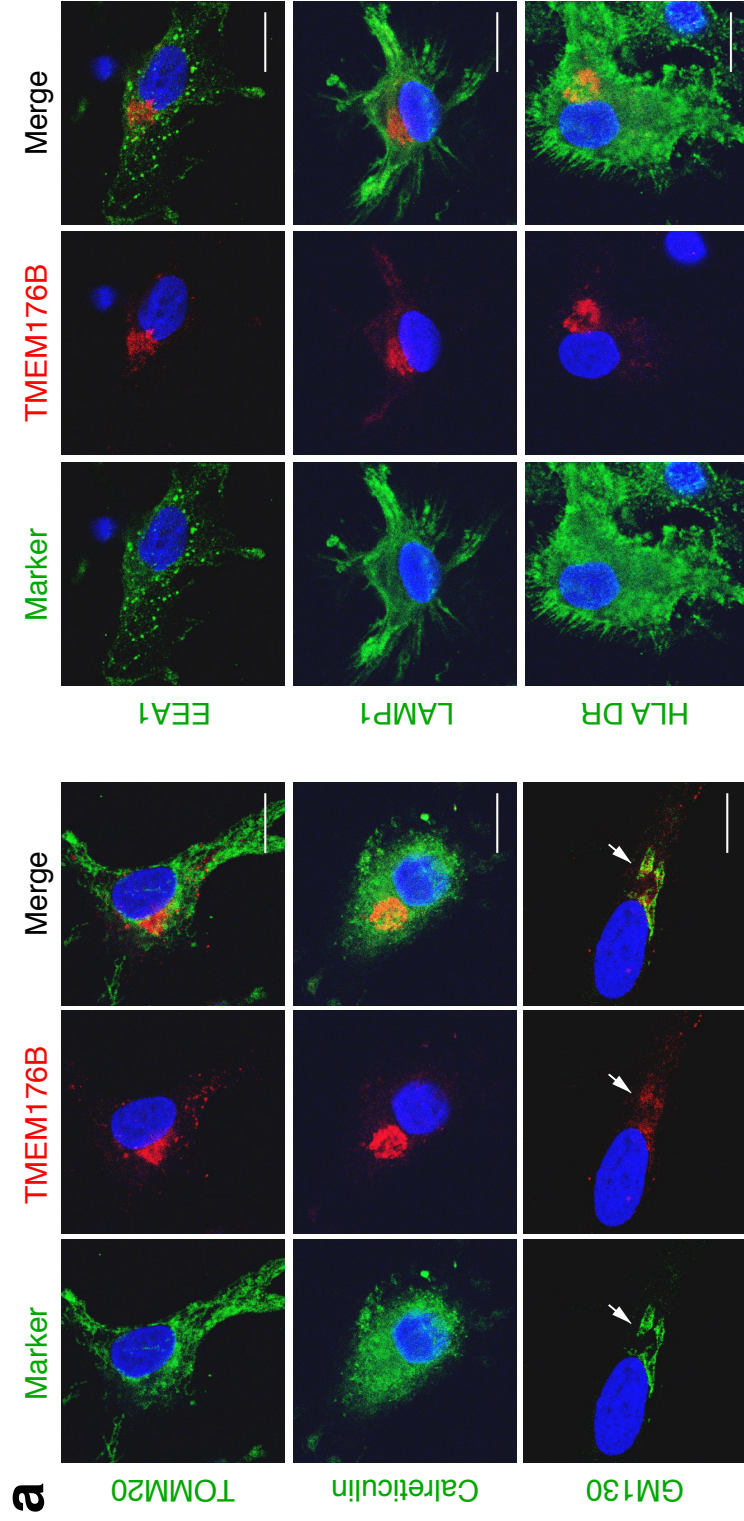




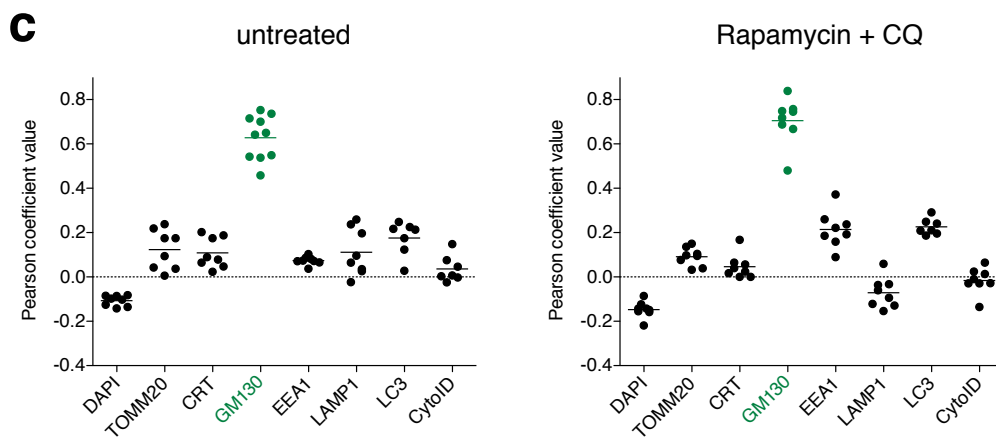
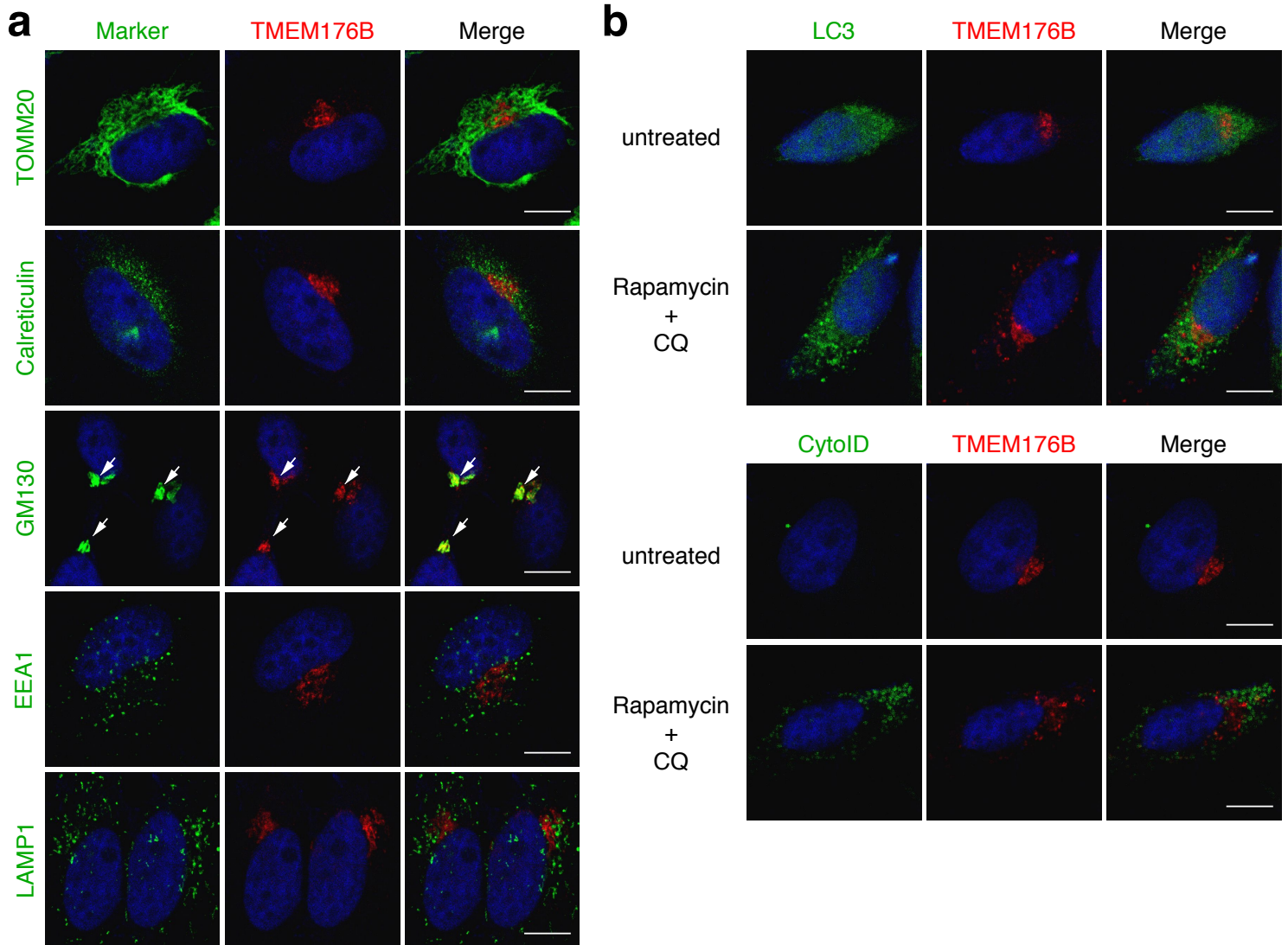
**Figure S2**



**Figure S3**



# Figure S4



## Supplementary Methods

### *Isolation of mouse intestinal lamina propria lymphocytes*

Large and small intestines were harvested from adult mice (10-20 weeks of age). Fat tissues and Peyer's patches were removed. Intestines were flushed with PBS, cut open longitudinally and then cut into 1 cm pieces. Intestine pieces were incubated for 10 min at 37°C with horizontal shaking (100 rpm, 50-mL tube in a horizontal position) in 10 mL (for each mouse) of PBS containing 15 mM EDTA and 1.5 mM DTT, then vigorously shaken (using vortex for 45 sec and manually for 30 sec) and washed in PBS. The same cycle was repeated three times in PBS containing 15 mM EDTA (no DTT). After these steps aiming at removing epithelial cells, intestine pieces were further processed into smaller fragments in a Petri dish with 5 mL of RPMI 1640 medium (Invitrogen) containing 2 mg/mL Collagenase D (Sigma). Five mL of Collagenase-medium supplemented with 200 µg/mL (then 100 µg/mL final in 10mL) DNase I (Sigma) were added and digestion was performed in a 50-mL tube for 30 min at 37°C with shaking. After suspension with a 10-mL pipet, the digested tissues were passed through a stainless steel mesh followed by successive filtrations through 100 µm and 40 µm cell strainers that were rinsed each time with 10 mL of PBS containing 2% fetal calf serum (FCS) and 2 mM EDTA (PFE) (~30 mL final). Undigested intestine pieces were subjected to a second cycle of digestion before pooling both cell preparations in 1 mL of PFE. Typical preparations yielded 10–30 x 10<sup>6</sup> live cells.

### *Electrophysiology*

Whole-cell patch clamp was performed as previously described<sup>3</sup>. Briefly, *Xenopus laevis* female oocytes were then injected with 40 nL of in vitro synthesized (mMESSAGE mMACHINE Ultra

Kit) *Tmem176a* or/and *Tmem176b* mRNA at 1 mg/mL. The day after injection, the oocytes were placed in a pH 8 solution (in mM, NaCl, 100; KCl, 3; MgCl<sub>2</sub>, 2; HEPES, 15; pH 8) that was changed daily. Two to three days later, currents were recorded in two-electrode voltage-clamp using a genclamp500 amplifier (Axon Inst., Foster City, CA) interfaced to a personal computer using the Digidata 1200 interface and the pClamp software (ver 7.0; Axon Inst.). Prior to recording, oocytes were incubated in phorbol myristate acetate (PMA) at 100 nM in the pH 8 solution for 20–30 min. Currents were filtered at 100 Hz and digitized at 0.5 kHz before storage and further analysis. During recording, oocytes were continuously superfused with the pH 8 solution. On TMEM176A or B-expressing oocytes, induction of an inward current was obtained by switching to a pH 5 solution (in mM NaCl, 100; KCl, 3; MgCl<sub>2</sub>, 2; MES, 15; pH 5).

Supplemental Tables

Supplementary Table 1. Primers used for quantitative PCR.

Mouse gene name	Forward primer	Reverse primer	Amplicon (bp)
<i>Foxp3</i>	CCCAGGAAAGACAGCAACCTT	CTGCTTGGCAGTGCCTTGAGAA	133
<i>Ccl20</i>	CTCACCTCTGCAGCCAGG	TCTGCTTTGGATCAGCGCAC	183
<i>Cxcl3</i>	CCCAGACAGAAAGTCATAGCCAC	CCCAGACAGAAAGTCATAGCCAC	193
<i>Gapdh</i>	GGTGAAAGGTCGGTGTGAACGG	TCGCTCCTGGAAGATGGTGAT	232
<i>Gata3</i>	CCCATTACCACCTATCCGCC	GCATTGCAAAGGTAGTGCCC	209
<i>Il17a</i>	AGTCCAGGGAGAGCTTCA TCT	TC TTTCAT TGC GG TGGAGAGTC	248
<i>Il17f</i>	GAAGTGCACCCGTGA AACAG	AACTGGAGCGGTTCTGG AAT	230
<i>Il22</i>	CCTACATGCAGGAGGTGGTG	AAACAGCAGGTCCAGTTCCC	176
<i>Lcn2</i>	ATGTCACTCCATCCTGGTC	GCGAACTGGTTGAGTCCGT	169
<i>Ngp</i>	CCACTCCGCCTTCTAGTCAG	AATCCCTGTCGCAGGTC AAG	198
<i>Rorc</i>	GCGCACCAACCTCTTTTCAC	AGGACGACTTCCATTGCTCC	201
<i>Sgkl</i>	ATGCAGTAAACCAAGCCGGT	CAGCAGGGCCAGTGTACTTC	209
<i>Tbx21</i>	GTCTGGGAAGCTGAGAGTCTG	CTTTCCACACTGCACCCACT	229
<i>Tmem176a</i>	CAAACTTCTGCTGGCCGGAT	GTGAAGGAAGGCAACAGCTC	238
<i>Tmem176b</i>	AAGAAAGTTTCTCTCCTGGCCT	CAGTTTTCCTGCTCTTCTCA	222

Human gene name	Forward primer	Reverse primer	Amplicon (bp)
<i>IL17A</i>	GACCTCATTGGTGTCACTGCT	CAAGGTGAGGTGGATCGGTT	207
<i>RORC</i>	CAGAGCCAAAGGCTCAGTCAT	ATGGGGCAGTTCTGCTGAC	179
<i>TBX21</i>	ACAACCACCTGTTGTGGTCC	GACGTACAGCGGTTTCCCTG	239
<i>TMEM176A</i>	ACCTCCTTCATGGACATGCT	GCATGGCTAGATTCCACTCAC	183
<i>TMEM176B</i>	GCCATTGTCCATGAGAAGCA	ATTGCTGTGAACAACACTTCCCTCAG	281

**Supplementary Table 2. Antibodies used for FACS analysis and sorting.**

<b>Mouse experiment</b>	<b>Antigen specificity</b>	<b>Fluorochrome</b>	<b>Clone</b>	<b>Manufacturer</b>	<b>Catalog #</b>
CD4 <sup>+</sup> Tconv and Treg isolation	CD45.2	APC-Cy7	104	BD Biosciences	560694
	CD4	PE-Cy7	RM4-5	BD Biosciences	552775
	Neuropilin-1	APC	761705	R&D Systems	FAB5994A
	TCR $\beta$	PE	H57-597	BD Biosciences	562841
Naive CD4 <sup>+</sup> T cell isolation for Th1/Treg in vitro polarization	CD4	V450	RM4-5	BD Biosciences	560468
	CD25	PE	7D4	BD Biosciences	558642
	CD44	PerCP-Cy5.5	IM7	BD Biosciences	560570
	CD62L	APC	MEL-14	BD Biosciences	561919
ILC3, ILC1 and CD11b/c <sup>+</sup> isolation	CD11b	biotin	M1/70	BD Biosciences	553309
	CD11c	biotin	HL3	BD Biosciences	553800
	CD19	APC	1D3	BD Biosciences	550992
	CD45.2	APC-Cy7	104	BD Biosciences	560694
	NK1.1	PE-Cy7	PK136	BD Biosciences	552878
	NKp46	FITC	29A1.4	BD Biosciences	560756
	TCR $\beta$	APC	H57-597	eBioscience	17-5961-81
	TCR $\gamma\delta$	APC	GL3	eBioscience	17-5711-82
	Streptavidin	PerCP-Cy5.5	-	BD Biosciences	551419
	CD4	A647	RM4-5	BD Biosciences	557681
Naive CD4 <sup>+</sup> CD45RB <sup>hi</sup> T cells isolation for adoptive transfer into <i>Rag1</i> <sup>-/-</sup> mice	CD25	PE-Cy7	PC61	BD Biosciences	552880
	CD45RB	FITC	16A	BD Biosciences	553100
	CD4	V450	RM4-5	BD Biosciences	560468
CD4 <sup>+</sup> TCR $\beta$ <sup>+</sup> and T $\gamma\delta$ <sup>+</sup> T cell isolation from IMQ-treated mice	TCR $\beta$	APC	H57-597	eBioscience	17-5961-81
	TCR $\gamma\delta$	PE	GL3	eBioscience	12-5711-82
<b>Human experiment</b>	<b>Antigen specificity</b>	<b>Fluorochrome</b>	<b>Clone</b>	<b>Manufacturer</b>	<b>Catalog #</b>
Naive CD4 <sup>+</sup> T cell isolation for Th1/17 in vitro polarization	CD3	PE-Cy7	SK7	BD Biosciences	557851
	CD4	PerCP-Cy5.5	L200	BD Biosciences	552838
	CD45RA	PE	HI100	BD Biosciences	555489
	CD45RO	FITC	UCHL1	BD Biosciences	555492

**Supplementary Table 3. Antibodies used for confocal analysis.**

<b>Primary antibodies (unconjugated except for LC3 : biotin)</b>				
<b>Antigen specificity</b>	<b>Isotype</b>	<b>Clone</b>	<b>Manufacturer</b>	<b>Catalog #</b>
Calreticulin	Mouse IgG1	16/Calreticulin	BD Biosciences	612136
CD3e	Mouse IgG2a, κ	HIT3a	BD Biosciences	555337
EEA1	Mouse IgG1	14/EEA1	BD Biosciences	610456
GM130	Mouse IgG1, κ	35/GM130	BD Biosciences	610822
HLA-DR	Mouse IgG2a, κ	G46-6	BD Biosciences	555810
LAMP1/CD107a	Mouse IgG1, κ	H4A3	BD Biosciences	555798
LC3	Mouse IgG1	5F10	Nanotools	0231-100BIOTIN/LC3-5F10
TGN46	Sheep	Polyclonal	AbD Serotec	AHP500GT
TMEM176A	Rat	Polyclonal	Biotem	-
TMEM176B	Rabbit	Polyclonal	Abcam	ab103929
TOMM20	Mouse IgG1, κ	4F3	Sigma	WH0009804M
HA	Mouse IgG3	HA.C5	Abcam	ab18181
V5	Mouse IgG2a	-	Life Technologies	R960-25

<b>Secondary antibodies and streptavidin</b>				
<b>Reactivity</b>	<b>Fluorochrome</b>	<b>Isotype</b>	<b>Manufacturer</b>	<b>Catalog #</b>
Mouse IgG	Alexa Fluor 488	Goat	Life Technologies	A-11029
Mouse IgG1	Alexa Fluor 488	Goat	Life Technologies	A-21121
Mouse IgG2a	Alexa Fluor 568	Goat	Life Technologies	A-21134
Mouse IgG2a	Alexa Fluor 488	Goat	Life Technologies	A-21131
Mouse IgG3	Alexa Fluor 488	Goat	Life Technologies	A-21151
Rabbit IgG	Alexa Fluor 568	Goat	Life Technologies	A-11031
Rabbit IgG	Alexa Fluor 647	Goat	Life Technologies	A-21245
Rat IgG	Alexa Fluor 568	Goat	Life Technologies	A-11077
Sheep	biotin	Donkey	Jackson ImmunoResearch	713-066-147
Streptavidin	Alexa Fluor 488	-	Life Technologies	S11223
Streptavidin	Alexa Fluor 647	-	Life Technologies	S21374



## Supplementary References

- 1 Omasits, U., Ahrens, C. H., Muller, S. & Wollscheid, B. Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. *Bioinformatics* **30**, 884-886, doi:10.1093/bioinformatics/btt607 (2014).
- 2 Mizushima, N., Yoshimori, T. & Levine, B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell* **140**, 313-326, doi:10.1016/j.cell.2010.01.028 (2010).
- 3 Segovia, M. *et al.* Autologous dendritic cells prolong allograft survival through Tmem176b-dependent antigen cross-presentation. *Am J Transplant* **14**, 1021-1031, doi:10.1111/ajt.12708 (2014).

## **B. Génération et étude d'une souris double déficiente pour *Tmem176a* et *b* (DKO)**

### **1. Génération des souris DKO**

Le travail décrit précédemment (Drujont et al., 2016) sur l'étude de l'expression de *Tmem176a* et *b* dans la famille des cellules ROR $\gamma$ <sup>+</sup> et des souris "simple KO" pour *Tmem176b* a mené à poser l'hypothèse de la nécessité d'un ciblage simultané des deux homologues afin d'éliminer tout phénomène de compensation.

**Première approche : Interférence par ARN.** J'ai tout d'abord tenté d'utiliser la technologie d'interférence par ARN pour cibler le gène *Tmem176a* dans les cellules *Tmem176b*<sup>-/-</sup> de nos souris "simple KO". J'ai ainsi procédé (selon (Lo et al., 2012)) à l'enrichissement (tri par FACS) de cellules c-Kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup> de la moelle osseuse de souris *Tmem176b*<sup>-/-</sup> et à leur infection (en présence de Thrombopoïétine) par des lentivirus codant pour la GFP et pour un ARN interférent spécifique de *Tmem176a* ou non relevant (contrôle). La reconstitution de souris irradiées avec ces cellules avait ensuite pour objectif de générer des souris chimériques dans lesquelles les cellules hématopoïétiques GFP<sup>+</sup> devaient théoriquement être considérées KO et "KD" (knock-down) pour les gènes *Tmem176b* et *Tmem176a*, respectivement. J'ai cependant dû abandonner cette stratégie après plusieurs tentatives à la suite desquelles je n'ai pu obtenir que des taux de chimérisme faibles et très variables (avec en moyenne moins de 5% de cellules GFP<sup>+</sup> parmi les cellules hématopoïétiques totale CD45<sup>+</sup> du sang ou de la rate) qui ne permettaient pas des conditions d'étude optimales. Il est probable que plusieurs raisons expliquent cet échec, en particulier un nombre trop faible de cellules progénitrices viables injectées, une infection non optimale et un régime d'irradiation insuffisamment adapté et reproductible malgré mes multiples tentatives de mise au point. Bien que des améliorations aient pu être apportées, nous nous sommes tournés vers un ciblage en lignée germinale.

**Deuxième approche : Génération d'une souris double KO conditionnel (cDKO).** Fin 2013, la génération d'une souris portant un allèle *Tmem176a/b* "floxed" a été initiée (financement IHU-Cesti) par l'Institut Clinique de la Souris (ICS, Ilkirch, France). Cette stratégie est très intéressante au regard de la finesse d'analyse qu'elle permet. En effet, le croisement de souris cDKO *Tmem176ab*<sup>flox</sup> avec des souris exprimant la recombinase Cre sous le contrôle de promoteurs spécifiques permettra de cibler des types cellulaires précis tels que les

cellules du système hématopoïétique (souris  $Vav^{Cre}$ ), les cellules myéloïdes ( $LysM^{Cre}$ ), les cellules T (souris  $CD4^{Cre}$  ou  $LCK^{Cre}$ ) ou les cellules  $ROR\gamma^+$  (souris  $Rorc^{Cre}$ , il faut noter que dans ces souris, toutes les cellules T seront également ciblées puisque les cellules T du thymus expriment transitoirement  $ROR\gamma$  au stade  $CD4^+CD8^+$  double-positives). Ce système permettra également d'utiliser le système CreERT2 qui ajoute un contrôle temporel (par administration de tamoxifène) sur le ciblage. Cependant, le développement de cette souris  $Tmem176ab^{flox}$  par la technique "classique" des cellules ES (dans le fond génétique C57BL/6N) a nécessité deux cycles de modification de clones ES en raison d'une distance trop importante entre les deux sites *loxP* à insérer dans des régions introniques qui encadrent les premiers exons codants de chaque gène, placés dos-à-dos sur le locus). De plus, les premiers essais de génération de souris chimères ont échoué en terme de transmission de l'allèle "floché", malgré la validation du clone ES final sélectionné. L'équipe de l'ICS a ainsi dû produire de nouveaux clones ES avant d'obtenir avec succès des souris portant l'allèle d'intérêt en lignée germinale. Cette étape a seulement été atteinte en avril 2016, il s'agit ensuite de procéder à des croisements supplémentaires afin d'éliminer la cassette de sélection (néomycine). Cette souris sera donc disponible au laboratoire pour initier des croisements avec des lignées Cre (notamment  $Rorc^{Cre}$ , d'ores-et-déjà obtenue du laboratoire de Gérard Eberl, Institut Pasteur, Paris) à l'horizon de l'été-automne 2016.

**Troisième approche : Génération d'une souris double KO.** De façon évidente, il est apparu très tôt que je n'aurais pas la possibilité de travailler sur ces souris cDKO avant la fin de ma thèse, même si leur développement s'était déroulé selon le calendrier prévu. Nous avons alors décidé d'exploiter la technologie alors naissante et révolutionnaire CRISPR-Cas9 afin de générer une souris DKO en ciblant directement des embryons de souris, en collaboration avec Francina Langa du CIGM (centre d'ingénierie génétique murine) de l'Institut Pasteur pour la partie micro-injection. Ce travail a été réalisé par Aurélie Lemoine (ingénieure) sous la direction de Cédric Louvet et a donné lieu à la publication d'un article publié en 2016 (Lemoine et al. 2016). La stratégie qui a été mise en place avec succès est largement détaillée dans cet article, placé en Annexe II : Lemoine et al. *Journal of Genetics and Genomics*. 2016. Je développerai par la suite le travail de croisement que j'ai effectué à partir de l'obtention de ces souris afin de générer des groupes expérimentaux. Je présenterai ensuite les résultats préliminaires que j'ai obtenus.

## 2. Stratégie de croisement des souris DKO

La gestion de lignées murines génétiquement modifiées est une problématique complexe qui nécessite d'une part l'adaptation des stratégies d'accouplements aux besoins expérimentaux et d'autre part requiert un investissement humain important pour le suivi des reproducteurs, le sevrage et le génotypage des animaux. C'est l'ensemble de ces étapes qui permet à terme de constituer des groupes expérimentaux solides. Les souris composant ces groupes doivent être du même âge, du même sexe et provenir de la même animalerie ; l'environnement d'élevage influence la flore intestinale des animaux qui joue elle-même sur leur système immunitaire. De plus, pour une même expérience il est essentiel d'utiliser des animaux issus de la même portée, on parle de « littermates ». Durant ma thèse, j'ai participé directement avec Cédric Louvet et Aurélie Lemoine (technicienne) à ce travail de gestion des lignées murines transgéniques.

Nos premiers animaux potentiellement fondateurs portant un allèle *Tmem176ab* double KO (DKO) ont été obtenus relativement rapidement mais au prix d'un fond génétique mélangé DBA/2×C57BL/6, signifiant une problématique de variation phénotypique plus importante que dans le cas d'un fond pur. C'est la raison pour laquelle nous avons ensuite procédé avec succès (mais à environ un an d'intervalle) à la génération de souris DKO directement dans le fond pure C57BL/6 (Voir l'annexe II : Lemoine et al. 2016). Je décris ci-dessous essentiellement nos stratégies de croisement en fond mélangé et de croisement en retour (« backcross ») qui nous ont permis d'obtenir la majorité des résultats préliminaires que je présenterai par la suite.

**DKO fond mélangé – Stratégie à court terme :** L'animal fondateur (#30) portant une délétion majeure dans le locus *Tmem176* a été accouplé avec des souris B6 (C57BL/6J de Janvier Labs) pour tout d'abord vérifier la transmission de cet allèle d'intérêt. Ces souris F1 (signalées comme « BC1 » = backcross 1) étaient donc hétérozygotes (WT/DKO c'est à dire +/-) et ont ensuite été croisées entre elles (« intercross ») pour obtenir des souris +/- (hétérozygotes ou Het), ++ (WT) et -- (DKO homozygotes). Afin d'obtenir rapidement des groupes expérimentaux conséquents, nous avons procédé au croisement de souris +/- avec des souris -- pour obtenir des proportions similaires de souris +/- et -- formant ainsi rapidement de groupes expérimentaux de « littermates » de même sexe (**Figure 13**).

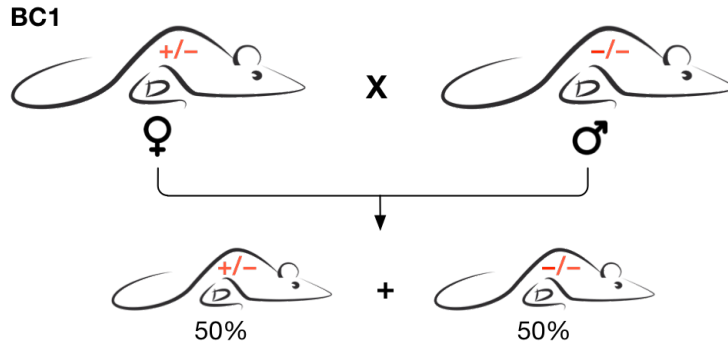


Figure 13 Fond génétique mélangé – Stratégie de croisement à court terme.

**DKO fond mélangé – Stratégie à long terme :** La stratégie évoquée précédemment est rapide mais souffre de deux problèmes majeurs : 1) Le fond génétique reste très mélangé (un seul backcross sur fond B6 pur) et de nombreux polymorphismes se distribuent ainsi aléatoirement dans les différentes souris d'étude menant à une variabilité phénotypique d'autant plus probable ; 2) Les souris contrôles sont +/- et non +/+, rendant difficile une mise en évidence de différences avec les souris -/- puisqu'il est courant d'observer des phénotypes intermédiaires chez les souris +/- . Nous avons donc procédé à un croisement en retour (« backcross ») supplémentaire sur fond B6 pour obtenir des souris hétérozygotes dites « BC2 » que nous avons ensuite croisées entre elles (« intercross ») pour générer directement des groupes expérimentaux à partir des souris +/+ et -/- (logiquement relativement moins abondantes puisque représentant chacune en théorie 25% des petits de chaque portée selon les ratios Mendéliens attendus) (**Figure 14**).

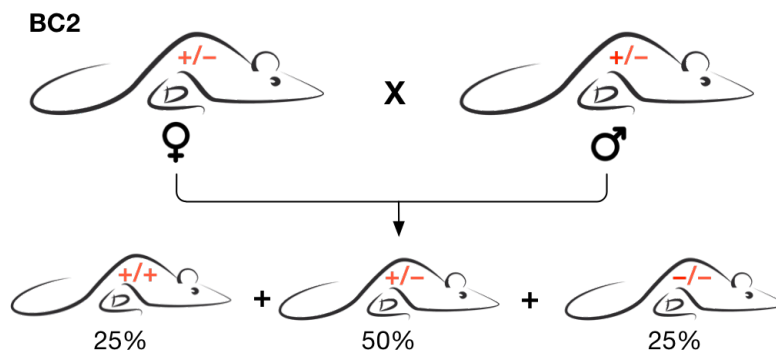


Figure 14 Fond génétique mélangé – Stratégie à long terme.

Le croisement en retour a été poursuivi en parallèle sur 3 autres générations jusqu'au début de l'année 2016 pour atteindre des souris « BC5 ». Comme représenté sur la **Figure 15**, la

probabilité de fond B6 dans les souris « BC2 » atteint 75% alors que pour les souris « BC5 » elle est de 96,9%, s’approchant alors significativement d’un fond génétiquement pur. De plus, il s’agit d’estimations à minima puisque le fond génétique de la souris F0 était déjà un fond mélangé DBA/2×C57BL/6.

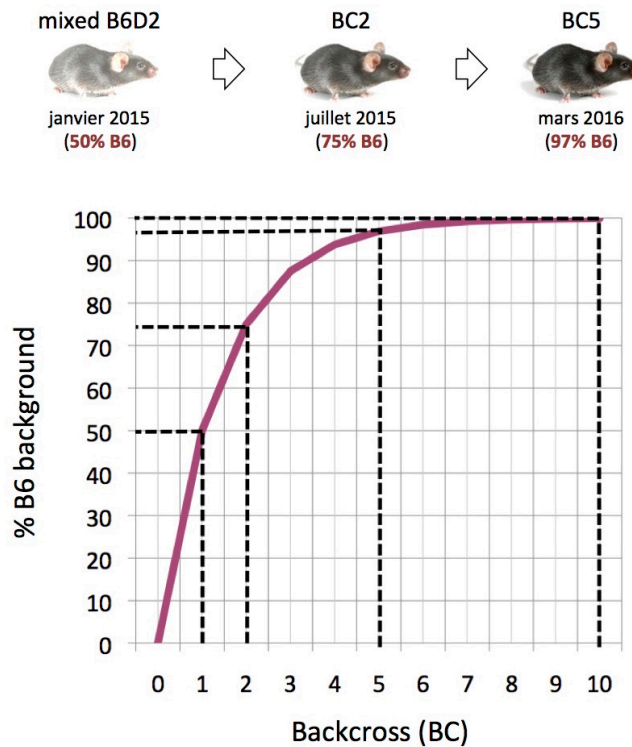


Figure 15 Probabilité de fond génétique B6 au fil du nombre de croisements en retour (« backcross »).

**DKO fond pur B6 :** Comme indiqué dans l’article décrivant la génération des souris DKO (Lemoine et al. 2016), nous avons également généré des souris DKO en fond pur B6 (C57BL6/N). Ces souris présentent l’avantage d’exclure tout problème de mélanges génétiques et sont actuellement (avril-mai 2016) en phase de redérivation au sein du CDTA/TAAM (Orléans) pour développer un élevage externalisé en conditions optimales, notamment au niveau de la qualité environnementale supérieure à notre animalerie à Nantes (Bâtiment Jean Monnet). Ces souris n’ont pas été disponibles à temps pour mon travail de thèse mais représenteront à terme le modèle de choix pour poursuivre l’étude du rôle des gènes *Tmem176a* et *b*.

En conclusion j’ai donc exploité dans un premier temps, de façon relativement rapide, des souris au fond génétique largement mélangé (« BC1 ») en comparant des animaux « littermates » +/- (Het) et -/- (DKO). Dans un deuxième temps, j’ai pu initier des

expériences dans des souris « BC2 » avec un fond génétique B6 plus important et en comparant des animaux « littermates » +/+ (WT) et -/- (DKO).

Le recul que j'ai désormais via à vis des résultats obtenus à l'issu de la reproduction de ces souris génétiquement modifiées me permet d'affirmer que la double délétion de *Tmem176a/b* ne semble pas affecter la fertilité, la viabilité, le ratio Mendélien de distribution des génotypes et la croissance des souris DKO, mâles ou femelles, en comparaison des souris contrôles Het et WT.

### **3. Résultats préliminaires de l'étude du système immunitaire des souris DKO en conditions normales**

En parallèle de l'étape de reproduction des souris *Tmem176a/b*<sup>-/-</sup> afin de générer des groupes expérimentaux, j'ai effectué la mise au point de la technique de préparation cellulaire à partir de l'intestin et j'ai conçu et optimisé les panels d'anticorps permettant l'analyse des populations immunitaires dans différents tissus lymphoïdes incluant principalement le thymus, la rate, les ganglions mésentériques (mesLNs) et la lamina propria du petit intestin (SILP).

Dans le contexte de cette étude, la stratégie de marquage anticorps pour l'analyse par cytométrie en flux (FACS) des populations immunes doit être rigoureuse pour deux raisons :

- Malgré l'optimisation de la technique de préparation des cellules de la lamina propria intestinale, la suspension cellulaire obtenue reste riche en débris cellulaires, en cellules mortes et contient aussi des cellules non hématopoïétiques CD45<sup>-</sup>.
- Comme je l'ai expliqué dans mon introduction, je me suis intéressée aux populations lymphoïdes ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> et dans cette étude préliminaire j'ai fait le choix d'analyser les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2 et T<sub>H</sub>17) et les ILCs (ILC1s, ILC2s et ILC3s). Puisque les ILCs représentent une fraction relativement faible des cellules immunes le marquage doit être suffisamment précis pour assurer la fiabilité de l'analyse.

Que ce soit pour le thymus, la rate et les ganglions mésentériques, l'analyse des grandes populations lymphocytaires (cellules B, T et myéloïdes) n'a pas montré de différences significatives entre les souris DKO et les contrôles Het ou WT. En particulier, la double délétion en *Tmem176a* et *b* ne semble pas affecter la fréquence des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dans ces organes lymphoïdes primaires et secondaires en conditions non pathologiques.

Je me suis ensuite intéressée directement à la distribution des cellules T CD4<sup>+</sup> incluant les Th17 (RORγt<sup>+</sup>) dans la lamina propria du petit intestin de nos souris DKO ; en effet les cellules de l'immunité de type 17 jouent un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie de cet organe. La stratégie d'analyse des marquages FACS effectués sur les cellules intestinales est la suivante :

- La sélection morphologique (**Figure 16**) est restreinte à une zone correspondant aux cellules lymphoïdes qui sont de petite taille (FSC) et de faible granularité (SSC).
- Après élimination des doublets cellulaires, les cellules hématopoïétiques (CD45<sup>+</sup>) vivantes restantes sont sélectionnées (**Figure 16**).

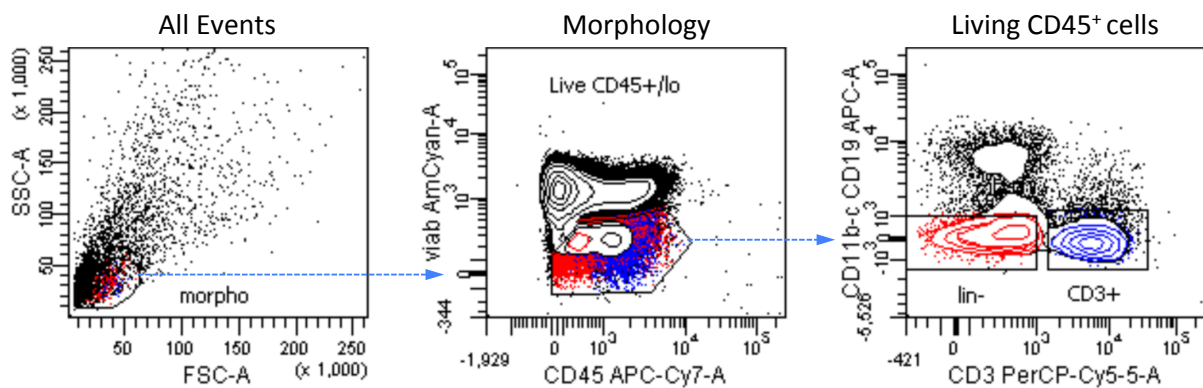


Figure 16 Stratégie d'analyse des marquages FACS obtenus sur les cellules de la lamina propria intestinale avec une focalisation sur les cellules lymphoïdes T CD3<sup>+</sup> et ILCs.

- Pour l'analyse des **lymphocytes T**, comme représenté sur les **Figures 16 et 17**, ce sont ensuite les cellules **CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>CD11c<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>** (et CD8<sup>+</sup>) qui sont sélectionnées et analysées soit sur l'expression des facteurs de transcription RORγt, GATA-3 et Foxp3 (le marquage T-bet est exclu car généralement trop faible) soit sur la production des cytokines (**Figure 20A**), notamment l'IL-17A (après stimulation PMA-ionomycine).



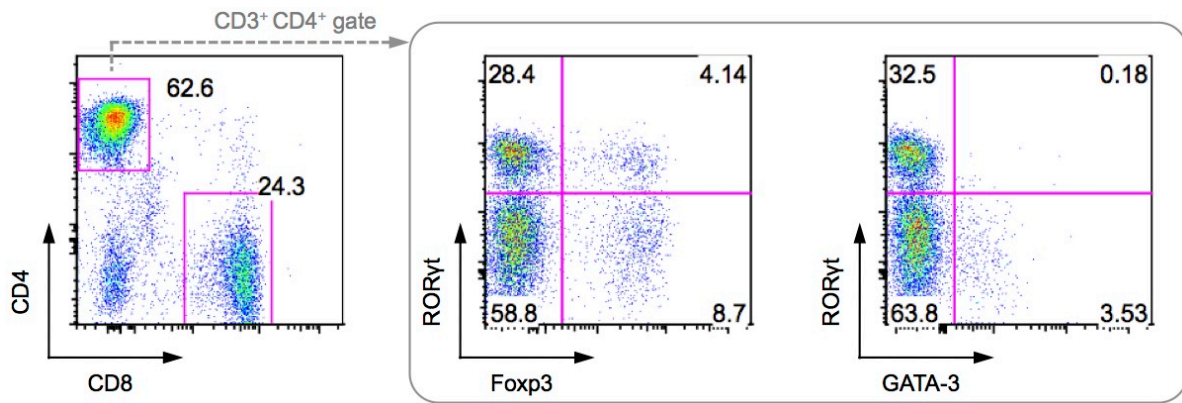


Figure 17 Analyse de l'expression de facteurs de transcription par marquages FACS dans les LT CD4<sup>+</sup> de la lamina propria intestinale.

- Pour l'analyse des ILCs je sélectionne les cellules **CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup>CD11c<sup>-</sup>** qui sont ensuite analysées sur les mêmes caractéristiques que les cellules lymphoïdes : RORγt, GATA-3 et T-bet ou IL-17A, IL-22 et GM-CSF.

Notons que pour les panels d'anticorps précédents, le marquage CD3 est effectué en intracellulaire pour inclure les lymphocytes qui l'ont « down-régulé ». Cette stratégie sera importante pour l'étude des ILCs puisque ces cellules sont définies par leur absence d'expression des marqueurs caractéristiques des autres lignées hématopoïétiques (Lin<sup>-</sup>).

Les résultats préliminaires que j'ai obtenu suite à la comparaison de plusieurs paires de souris BC1 « littermates » DKO et contrôles (Het) montrent une diminution du pourcentage de lymphocytes T CD3<sup>+</sup> totaux dans la lamina propria intestinale des DKO (**Figure 18**).

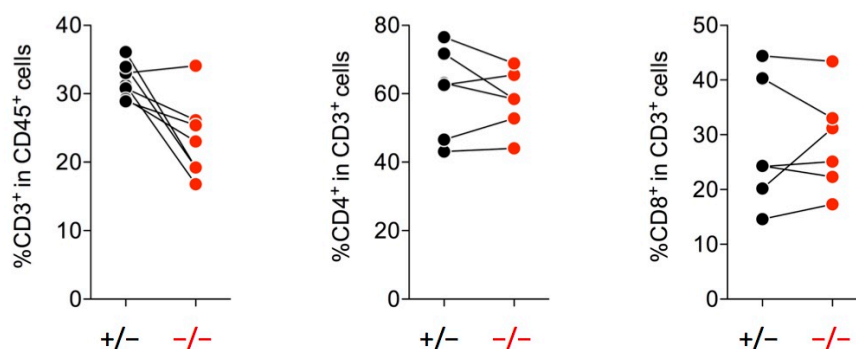


Figure 18 Représentation comparative entre Het et DKO des pourcentages de LT dans la lamina propria intestinale. Analyse des pourcentages de cellules T CD3<sup>+</sup> dans la population CD45<sup>+</sup> totale et de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> dans la population CD3<sup>+</sup> totale (les souris « littermates » Het et WT sont appariées).

De façon intéressante, on observe une baisse significative de la fréquence des lymphocytes T RORγt<sup>+</sup> (T<sub>H</sub>17) au contraire des populations GATA-3<sup>+</sup> (T<sub>H</sub>2) et Foxp3<sup>+</sup> (T<sub>REG</sub>) (**Figure 19**).

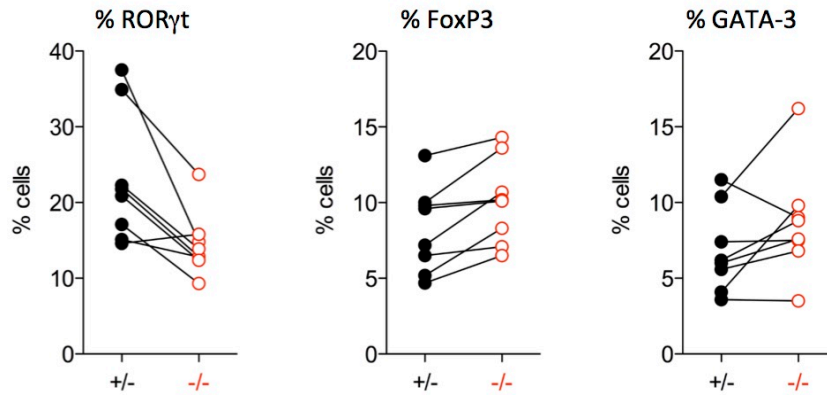


Figure 19 Représentation comparative entre Het et DKO des pourcentages de cellules ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>, Foxp3<sup>+</sup> et GATA-3<sup>+</sup> parmi les LT CD4<sup>+</sup> de la lamina propria intestinale.

Enfin, l'analyse de la production cytokinique des lymphocytes T de la lamina propria après stimulation PMA/ionomycine a révélé une diminution du pourcentage de cellules T CD4<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup> DKO en comparaison avec des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> Het contrôles (**Figure 20A et B**).

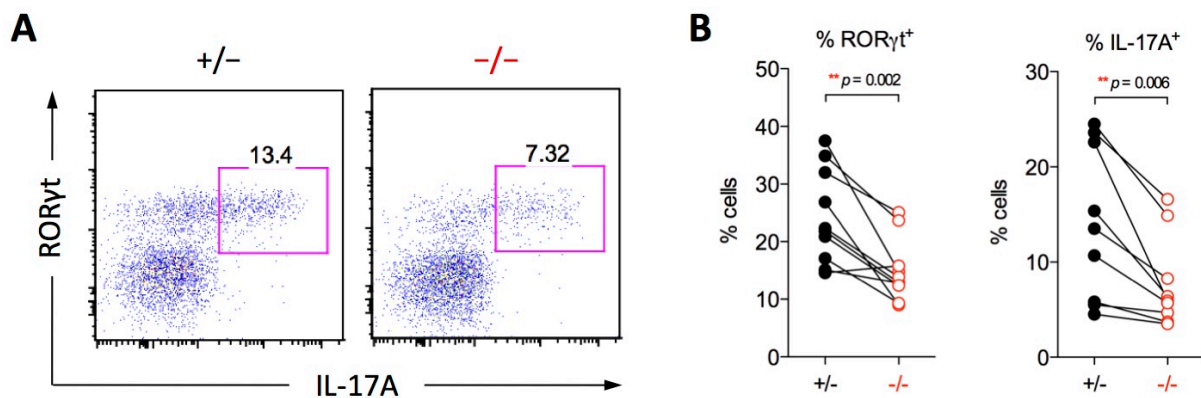


Figure 20 Représentation comparative entre Het et DKO des marquages FACS et des pourcentages de cellules IL-17A<sup>+</sup> et ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> parmi les LT CD4<sup>+</sup> de la lamina propria intestinale.

Je me suis ensuite intéressée aux ILCs qui représentent des populations relativement plus rares et plus difficiles à mettre en évidence de façon correcte et reproductible que les cellules T. J'ai néanmoins réussi à établir des panels d'anticorps appropriés et une stratégie (**Figure 21**) incluant une sélection (gate) restreinte sur les paramètres FSC/SSC, une sélection des cellules vivantes et exprimant CD45 en incluant absolument les CD45<sup>lo</sup> puis une sélection des cellules négatives pour l'expression CD11b, CD11c, CD19 (ou B220) et CD3 (ce dernier marquage étant intracellulaire). Ces cellules Lin<sup>-</sup> sont ensuite analysées sur la base de l'expression de ROR $\gamma$ t et GATA-3 pour identifier les ILC3s et les ILC2s, respectivement. Les ILC1s qui sont incluses dans les cellules Lin<sup>-</sup> sont ROR $\gamma$ t<sup>-</sup> GATA-3<sup>-</sup>. La population ILC3 peut

ensuite être disséquée pour mettre en évidence les fractions LTi ( $CD4^+NKp46^-$ ),  $NCR^+$  ( $NKp46^+$ ) et  $NCR^-$  ( $NKp46^-$ ). En suivant cette stratégie, j'ai pu obtenir des résultats reproductibles en expériences indépendantes sur des souris WT. Il sera désormais intéressant de réaliser cette analyse en comparant nos souris DKO avec des souris contrôles WT, dans le « backcross » le plus avancé afin de réduire au maximum les variabilités.

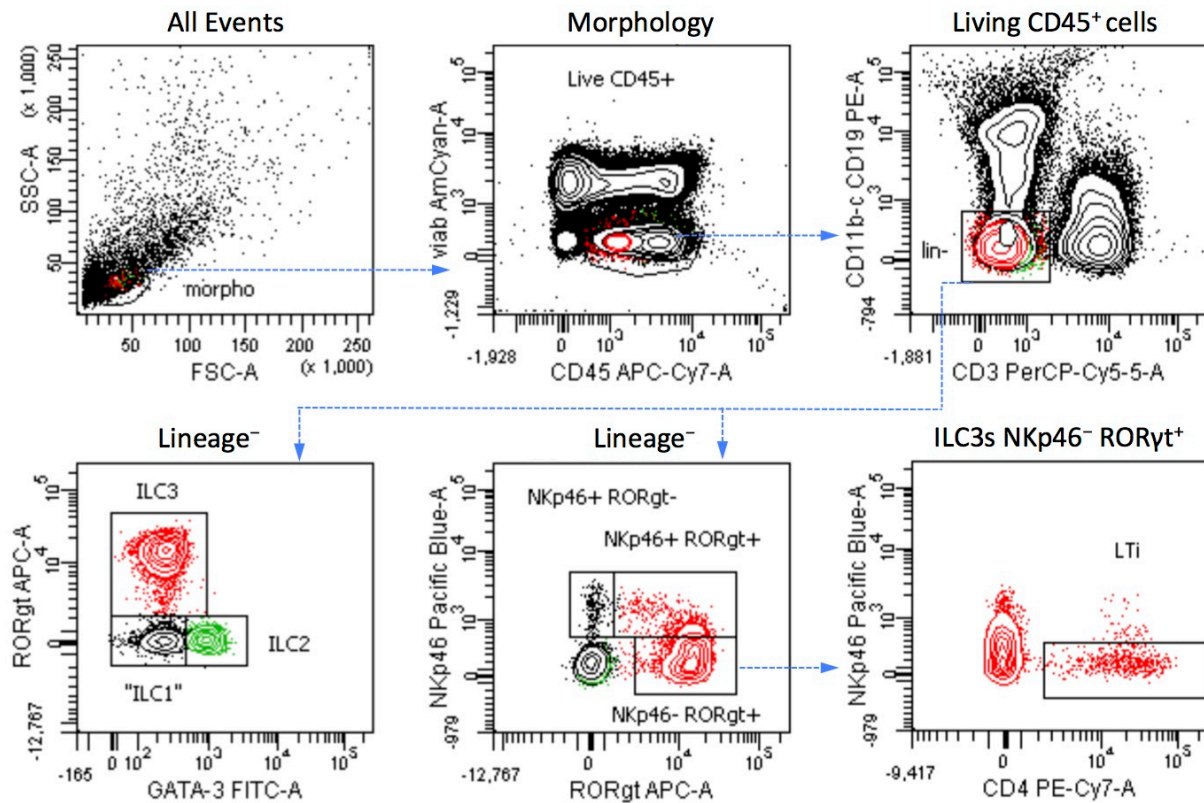


Figure 21 Stratégie d'analyse des marquages FACS obtenus sur les cellules de la lamina propria intestinale avec une focalisation sur les ILCs

#### 4. Étude des souris DKO dans deux modèles immuno-pathologiques dépendants des cellules $ROR\gamma^+$

Les expériences in vivo préliminaires qui ont été réalisées chez les souris DKO reprennent des modèles pathologiques associés aux cellules  $ROR\gamma^+$  précédemment décrits dans l'article présenté dans cette thèse (Drujont et al. 2016). Il sera très pertinent d'utiliser le modèle de dermatite/psoriasis dans lequel j'ai pu mettre en évidence une réduction partielle mais significative de l'inflammation dans les souris « simple KO »  $Tmem176b^{-/-}$  (Drujont et al. 2016). Cependant, durant les derniers mois de ma thèse, j'ai fait le choix d'initier l'analyse des souris DKO dans le contexte de modèles inflammatoires relativement plus rapides à

développer : le modèle EAE d'auto-immunité et des modèles de maladies inflammatoires de l'intestin.

#### 4.1. Modèle EAE de sclérose en plaques

Une expérience préliminaire réalisée avec des souris BC2 a montré un décalage important de l'induction de la pathologie (« onset ») dans les souris DKO en comparaison des contrôles (Het ou WT). En moyenne, les souris déficientes pour *Tmem176a/b* présentent donc un retard de quelques jours dans l'apparition des premiers symptômes mais aussi une atteinte globale moins importante avec des scores cliniques inférieurs au pic de la maladie, bien que ce dernière observation n'apparaisse pas statistiquement significative avec les effectifs de souris que nous avons utilisés (**Figure 22**). Ces résultats préliminaires sont prometteurs et de nouvelles expériences seront cruciales pour tenter de les confirmer, notamment avec des souris BC5 ou des souris en fond pur B6, avant de décider d'une analyse mécanistique précise.

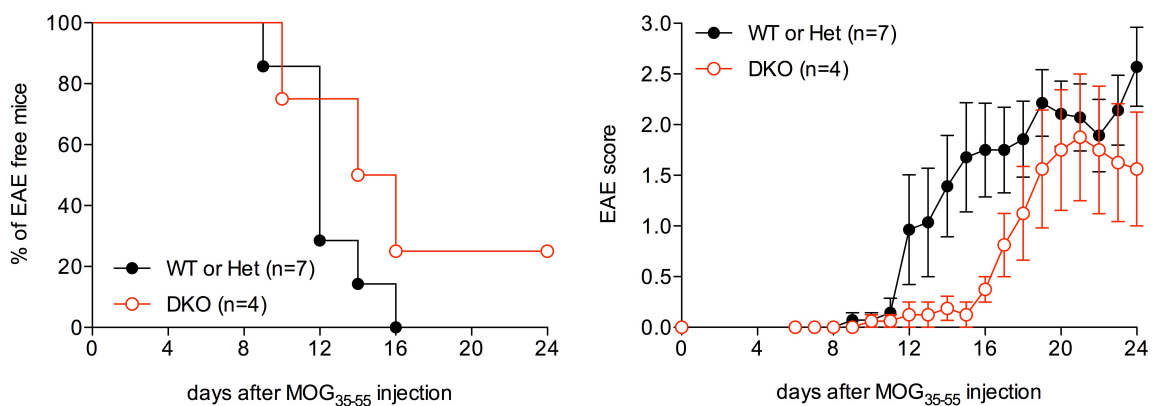


Figure 22 Modèle EAE de sclérose en plaques chez les souris DKO (BC2).

#### 4.2. Modèles de pathologies inflammatoires de l'intestin

##### Modèle de colite chronique induite par un transfert de cellules T CD4<sup>+</sup> CD45RB<sup>hi</sup>

Dans ce modèle de colite chronique, des souris RAGKO (immuno-déficientes) reçoivent par injection intraveineuse des cellules T CD4<sup>+</sup> CD45RB<sup>hi</sup> naïves ( $0.5 \times 10^6$ ) triées par FACS à partir de souris donneuses DKO ou contrôles (Het ou WT). La maladie se développe ensuite sur plusieurs semaines avant de se caractériser par une perte de poids progressive et un affaiblissement général causés par une inflammation de la muqueuse intestinale conduisant à terme au sacrifice des animaux (lorsque la perte de poids est  $\geq$  à 20% du poids initial et/ou

si l'aspect général des souris le requiert – autorisation éthique PROJET 2015062422511525 - APAFIS 927 - *Etude du rôle des gènes Tmem176a et b dans les colites inflammatoires chez la souris*, 2015).

Dans la première expérience, la maladie était nettement retardée chez les souris ayant reçu des lymphocytes T DKO avec 20% de mortalité à J45 contre 83% dès J25 chez les souris RAGKO receveuses de lymphocytes T contrôles (Het) (**Figure 23**). Cependant, il est important de noter que cette différence pourrait s'expliquer par un fond génétique encore très mélangé (BC1).

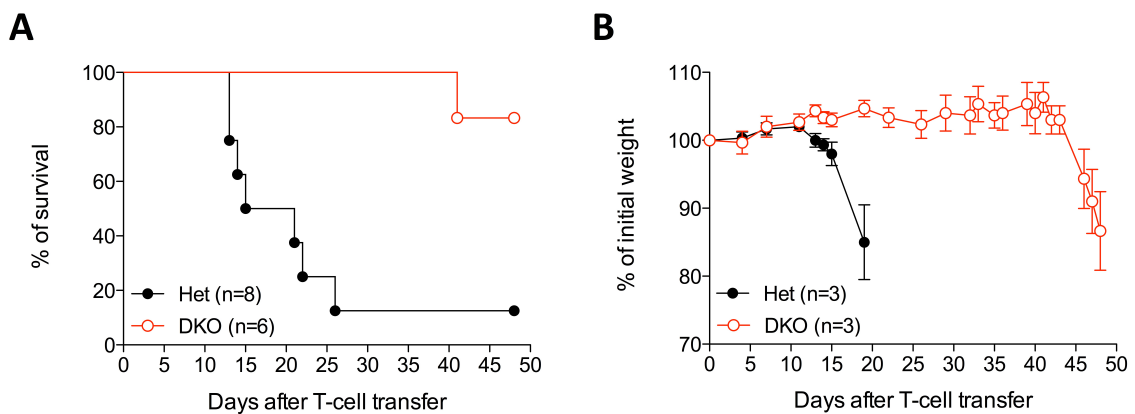


Figure 23 Modèle de colite chronique induite par un transfert de LT CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>hi</sup> DKO (BC1) chez des souris RAGKO. (A) Pourcentage de survie post-transfert de souris RAGKO mâles et femelles ayant reçues par injection intraveineuse  $0,5 \times 10^6$  LT CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>hi</sup> Het ou DKO (B) Représentation de la perte de poids observée chez les mâles RAGKO (inclus dans le graphique A) après le transfert des LT CD4<sup>+</sup> naïfs.

La poursuite de l'étude de ce modèle avec les BC1 et les BC2 n'a malheureusement pas permis d'obtenir des conclusions définitives sur l'impact de la double déficience en *Tmem176a/b* sur la fonction des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dans ce modèle. En effet, je n'ai plus réussi à induire de façon cohérente et homogène des pertes de poids caractéristiques de ce modèle. L'une des hypothèses explicatives réside dans le polymorphisme des souris donneuses BC1 et BC2 qui conservent un fond génétique fortement mélangé (DBA/2-C57BL/6). Pour espérer conclure en diminuant l'impact supposé du polymorphisme sur l'induction de la colite, il est donc nécessaire d'attendre un « backcross » plus avancé (BC5) ou les souris DKO générées en fond B6 pur. L'autre possibilité est que les variations environnementales de notre animalerie impactent aléatoirement nos souris RAGKO en influençant notamment leur microbiote intestinal. À l'avenir, les réponses qui seront fournies par ces expériences pourront s'avérer précieuses puisque ce modèle permet

d'observer les répercussions de la double déficience de façon intrinsèque au sein des lymphocytes T DKO transférés dans les souris RAGKO.

### **Modèle de colite aiguë induite par le Dextran Sulfate de Sodium (DSS)**

Ce modèle de colite aiguë est basé sur l'administration d'un traitement chimique dans l'eau de boisson des souris : le dextran sulfate de sodium (ou DSS) qui provoque des lésions tissulaires et une perméabilité pathologique de la muqueuse intestinale. L'environnement d'élevage et le fond génétique murin influencent fortement la composition de la flore intestinale des souris traitées ; de cette variabilité du microbiote résulte une sensibilité plus ou moins forte des animaux face au traitement DSS. En général, le dosage du DSS dans l'eau de boisson est compris entre 1,5% et 3% et dure de 5 jours à une semaine. Dans ce modèle, il est important de noter que le rôle de l'IL-22, principalement produit rapidement par les ILC3s, est majeur pour la récupération et la réparation d'une fonction intestinale normale après l'arrêt du traitement (Pickert et al., 2009 ; Sugimoto et al., 2008 )

Les premières expériences que j'ai réalisées dans ce modèle chez nos souris *Tmem176a/b*<sup>-/-</sup> ont été faites avec des animaux BC1. La première étape a donc été de déterminer la dose et la durée induisant une perte de poids significative suivie d'une récupération complète chez les souris contrôles (Het) : soit 2,5% de DSS pendant 5 jours. En premier lieu, j'ai fait le choix d'utiliser les mâles et les femelles disponibles pour évaluer le plus exhaustivement possible l'impact de la double déficience sur l'induction de la pathologie. Comme représenté dans la **Figure 24A**, les femelles DKO et contrôles réagissent de la même façon au traitement tandis que les mâles DKO présentent une nette exacerbation de la pathologie en comparaison des mâles Het (**Figure 24B**).

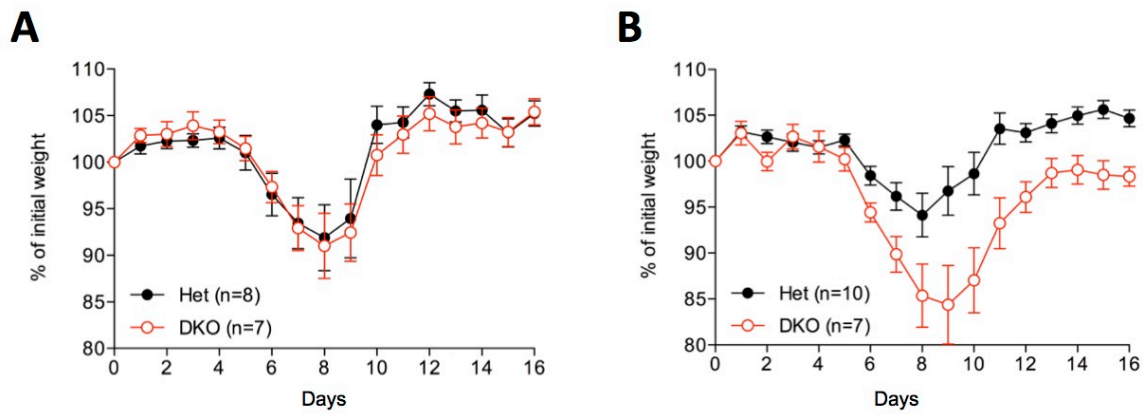


Figure 24 Modèle DSS de colite aiguë chez les souris DKO (BC1).

(A) Traitement à 2,5% de DSS pendant 5 jours chez des femelles Het et DKO (B) Traitement à 2,5% de DSS pendant 5 jours chez des mâles Het et DKO

Initialement, les souris DKO et contrôles (Het) étaient hébergées en « co-housing » (**Figure 25A**). J'ai supposé que le fait de séparer les souris DKO des contrôles Het (**Figure 25B**) dès le sevrage pourrait permettre de révéler un phénotype chez les femelles. En effet, lorsque les animaux sont hébergés dans les mêmes cages « co-housing », un phénomène de nivelage du microbiote se produit et cet échange de flore pourrait compenser des déficiences initiales chez des souris génétiquement modifiées ; et ce, particulièrement dans des contextes pathologiques impliquant l'intestin. Une nouvelle expérience menée avec des femelles placées dans des cages séparées a montré dans ce second cas l'apparition d'une exacerbation de la maladie chez les femelles DKO par rapport aux contrôles Het (**Figure 25B**). Dès lors, et bien que le co-housing ne semble pas influencer la gravité de la pathologie pour les mâles (données non illustrées), j'ai fait le choix de réaliser la suite de mes expériences de colite au DSS en cages séparées pour les deux sexes.



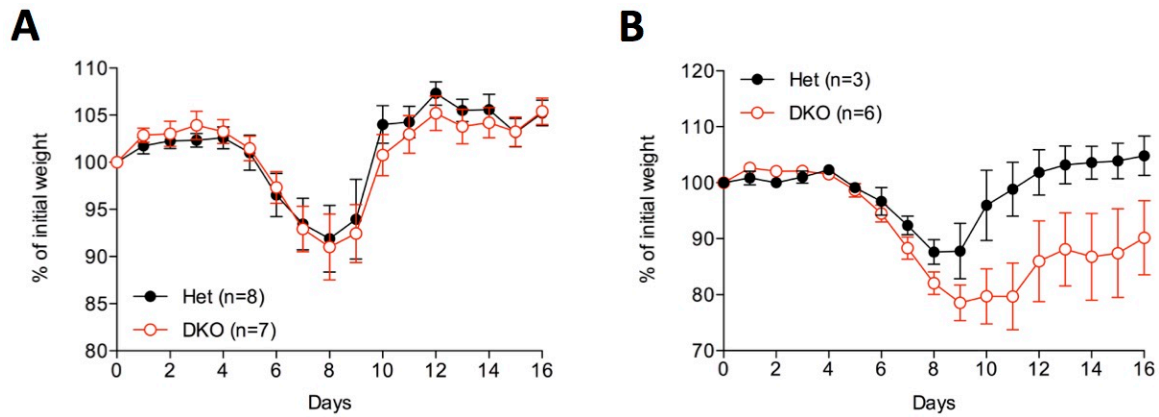


Figure 25 Modèle DSS de colite aiguë chez les femelles DKO (BC1).

(A) Traitement à 2,5% de DSS pendant 5 jours chez des femelles Het et DKO hébergées dans des cages communes en « co-housing » (B) Traitement à 2,5% de DSS pendant 5 jours chez des femelles Het et DKO hébergées dans des cages séparées en fonction de leur génotype dès le sevrage.

Lorsque des groupes expérimentaux de souris BC2 ont pu être constitués j'ai voulu confirmer les résultats prometteurs que nous avons obtenus avec les souris BC1, en particulier pour les mâles qui montraient une nette aggravation de la pathologie. J'ai donc réalisé une expérience chez les BC2 avec les doses préalablement établies pour les BC1 (2,5% pendant 5 jours). Malheureusement la sensibilité des mâles BC2 face à l'induction de la pathologie s'est avérée beaucoup plus forte que celle des mâles BC1 ; les mâles DKO et WT BC2 ayant tous dû être sacrifiés à J8 (résultats non montrés). Notons que la sensibilité des femelles n'a quant à elle pas été affectée par l'avancement du « backcross » (données non montrées). Il a donc fallu procéder à une nouvelle mise au point du traitement pour les BC2 : soit 2% pendant 5 jours. Il s'agit désormais de la dose établie que nous utilisons pour ce modèle.

Ainsi, de façon importante, en réadaptant le traitement, nous avons pu mettre en évidence que l'on observe tant chez les mâles BC1 que BC2 une exacerbation franche et reproductible de la gravité de la maladie pour les DKO (la perte de poids maximale moyenne est supérieure) en comparaison des contrôles (**Figure 26A**). De plus, comme on peut le voir sur la **Figure 26B**, le rétrécissement du colon à J6 chez les mâles DKO est supérieur à celui des mâles WT. Tout comme la perte de poids plus importante, cette observation est révélatrice de l'exacerbation de la pathologie chez les souris DKO.



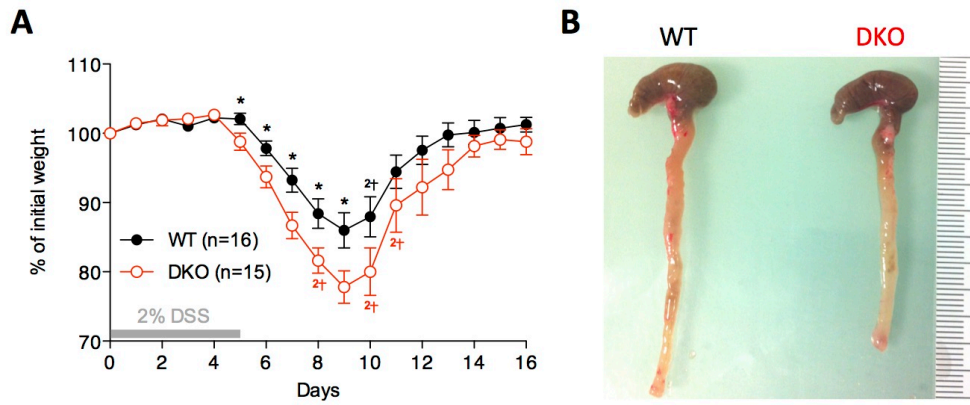


Figure 26 Modèle DSS de colite aiguë chez les mâles DKO (BC2).

(A) Traitement à 2% de DSS pendant 5 jours chez des mâles WT et DKO hébergés dans des cages séparées en fonction de leur génotype dès le sevrage. (A) Mesure à J6 du rétrécissement du colon de mâles WT et DKO traités pendant 5 jours avec 2% de DSS dans leur eau de boisson.

# DISCUSSION

L'identification des T<sub>H</sub>17, une nouvelle population de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> effecteurs dont la différenciation est sous la dépendance du facteur de transcription ROR $\gamma$ t, a initié depuis une dizaine d'années une multitude d'études quant à leur rôle dans la défense de l'hôte et dans le développement de pathologies auto-immunes et inflammatoires. À la suite de ces découvertes, les immunologistes ont identifié une grande diversité de populations lymphoïdes en miroir des polarisations T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2 et T<sub>H</sub>17 et dépendantes des mêmes facteurs de transcription T-bet, GATA-3 et ROR $\gamma$ t. Il semble désormais de plus en plus clair que la majorité des types cellulaires lymphoïdes, qu'ils soient adaptatifs ou innés tels que les lymphocytes T $\gamma$  $\delta$ , les cellules NKT et les ILCs, semble être organisée selon ce même schéma de polarisation et divergent notamment sur la rapidité de réponse et leur localisation anatomique.

En parallèle de ces découvertes sur les cellules lymphoïdes et plus particulièrement sur les cellules ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>, notre équipe s'est intéressé depuis 2005 à l'étude de *Tmem176b* un gène initialement identifié (sous le nom de *Torid*) comme fortement exprimé dans les cellules myéloïdes immatures dans un contexte d'inhibition du rejet aigu d'allogreffe chez le rat (Louvét et al., 2005). De façon intéressante, ces deux domaines d'étude (auto-immunité/inflammation et régulation de la réponse allogénique) ont convergés lorsque le groupe de Dan Littman a mis en évidence que *Tmem176b* et son homologue *Tmem176a* faisaient partie des onze gènes directement ciblés par ROR $\gamma$ t (Ciofani et al., 2012).

A partir de cette observation, mon travail a permis de réaliser pour la première fois une étude comparative et précise de l'expression de *Tmem176a* et *b* dans les cellules lymphoïdes de type 1, 2 et 17 (Drujont et al., 2016). En cohérence avec les résultats du groupe de Dan Littman sur les gènes cibles de ROR $\gamma$ t ainsi qu'avec les récentes publications des groupes de Marco Colonna et Mitchell Kronenberg montrant une association des deux homologues avec, respectivement, les ILC3s et les NKT17, nous avons mis en évidence une surexpression spécifique de *Tmem176a* et *b* dans les T<sub>H</sub>17 par rapport aux T<sub>H</sub>1 et aux T<sub>H</sub>2 mais aussi dans les ILC3 et les T $\gamma$  $\delta$ 17 (Ciofani et al., 2012 ; Drujont et al., 2016 ; Engel et al., 2016 ; Robinette et al., 2015 ). Enfin, nous avons démontré que TMEM176A est un canal cationique comme TMEM176B et que ces deux homologues sont localisés à proximité du réseau trans-Golgien dans les T<sub>H</sub>17 humains (Drujont et al., 2016 ; Segovia et al., 2014 ).

## CANAUX IONIQUES ET RÉPONSE IMMUNE DE TYPE 17 ?

Peu de choses sont connues au sujet des flux ioniques intracellulaires et nos connaissances actuelles sont encore plus limitées lorsqu'il s'agit de canaux ioniques impliqués dans des fonctions immunes spécifiques (Feske et al., 2015). L'originalité de mon projet de thèse peut donc être résumée par les problématiques suivantes :

- En quoi la surexpression spécifique des canaux cationiques TMEM176A et B dans les cellules ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> est-elle importante pour des fonctions particulières de ces cellules lymphoïdes ?
- L'étude de ces deux homologues peut-elle représenter un nouvel angle d'approche pour la mise en place de stratégies thérapeutiques dans le domaine des pathologies auto-immunes et inflammatoires humaines dépendantes de ROR $\gamma$ t ?

Il apparaît désormais clairement que les flux ioniques jouent des rôles majeurs dans les cellules immunes, notamment dans le développement lymphocytaire et l'induction des réponses immunes innées et adaptatives (expressions géniques, prolifération, apoptose, migration). Dans les cellules immunes, les flux de cations divalents (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>) ont surtout un rôle de seconds messagers pour réguler les voies de signalisation intracellulaires. Tandis que les flux d'ions monovalents (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>) ont principalement un rôle dans la régulation du potentiel de membrane, ils participent donc indirectement au contrôle de l'afflux calcique dans les cellules immunitaires.

L'écrasante majorité des connaissances actuelles en terme de flux ioniques dans les cellules T sont relatives aux canaux calciques exprimés à la membrane plasmique : il s'agit des canaux CRAC. L'une des fonctions essentielle de l'afflux de Ca<sup>2+</sup> via les canaux CRAC est de réguler l'expression de gènes codant pour des chimiokines et des cytokines. Le Ca<sup>2+</sup> agit en induisant la voie calcineurine-NFAT qui est aussi stimulée en amont par le signal provenant du TCR. Le pore calcique des canaux CRAC est constitué par la protéine ORAI1. Dans un lymphocyte T, suite à la stimulation du TCR, l'afflux massif de Ca<sup>2+</sup> dans la cellule via ORAI1 est régulé par la protéine STIM1 située dans le réticulum endoplasmique et elle-même sensible au Ca<sup>2+</sup>. L'entrée de Ca<sup>2+</sup> joue un rôle clé dans les processus de régulation

transcriptionnelle dans les lymphocytes T. En effet, il a été démontré que les canaux CRAC influencent les capacités de production cytokinique des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> effecteurs. Par exemple, une étude récente du groupe de Stefan Feske a démontré que l'inhibition sélective de ORAI1 était capable de s'opposer à l'induction de l'EAE. De plus, dans ces souris ORAI1 KO la production de cytokines telles que l'IL-17, l'IFN $\gamma$  et le GM-CSF dans le SNC est presque complètement abolie (Kaufmann et al., 2016).

Mis à part les deux homologues TMEM176A et B, à notre connaissance il existe très peu d'autres canaux cationiques strictement spécifiques des T<sub>H</sub>17. Les canaux K<sup>+</sup> qui maintiennent le potentiel de membrane sont un second exemple de canaux dont l'expression est spécifiquement associée à certaines lignées lymphocytaires. En effet, contrairement aux T<sub>H</sub>1 et T<sub>H</sub>2 dans lesquels l'activité des KCa3.1 domine, les T<sub>H</sub>17 dépendent principalement des canaux Kv1.3 pour l'activation et la production d'IL-17A (Di et al. 2010). De plus, les souris Kv1.3 KO se sont révélées résistantes à l'EAE et les cellules T CD4<sup>+</sup> de ces souris produisent peu d'IFN $\gamma$  et d'IL-17 et sont moins capables de proliférer (Gocke et al., 2012).

Actuellement, le rôle et l'importance des canaux cationiques TMEM176A et B dans les cellules lymphoïdes sont inconnus. Il s'agit d'un domaine de recherche prometteur qui pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents indispensables à l'activité lymphocytaire de type 17 et de révéler de nouvelles pistes thérapeutiques. Comment des canaux ioniques spécifiquement exprimés dans certaines lignées lymphocytaires sont-ils capables d'influencer la différenciation et/ou l'activité de ces cellules immunes ?

### **PERSPECTIVE D'ETUDE DANS LES T<sub>H</sub>17 ET LES ILC3s**

Il sera très intéressant de poursuivre l'étude des souris DKO dans le contexte du modèle EAE qui est le modèle de référence pour la pathogénicité des cellules Th17 et dans lequel nos résultats préliminaires montrent un retardement de l'apparition de signes cliniques dans les souris DKO. A ce sujet, il sera important de comparer l'expression de *Tmem176a* et *b* dans les cellules Th17 pathogéniques et non-pathogéniques. L'analyse de données publiées pourrait représenter une première approche (Gaublomme et al., 2015 ; Wang et al., 2015). Il

serait aussi possible de purifier des cellules Th17 produisant à la fois de l'IL-17 et de l'IFN $\gamma$  par la technique « cytokine capture assay » (cellules en vie, sans fixation et marquage intracellulaire, permettant une isolation des ARNm). L'autre alternative serait de développer une technique de marquage intracellulaire permettant une conservation des ARNm. J'ai tenté de développer une telle approche (Hrvatín et al., 2014) en l'adaptant des cellules purifiées de l'intestin mais qui ne s'est malheureusement pas révélé suffisante pour permettre d'obtenir d'ARNm non dégradés.

Les résultats préliminaires d'exacerbation dans le modèle DSS suggèrent une dysfonction des ILC3s dans les souris DKO. Il sera important d'analyser plus finement les mécanismes physiopathologiques à l'œuvre dans ce modèle, notamment par une analyse anatomopathologique, une quantification de la perméabilité intestinale et de la production d'IL-22 en relation avec la distribution des ILC3s dans la lamina propria du colon.

Quel que soit le modèle d'étude poursuivi, l'utilisation de la souris cDKO (DKO conditionnel) sera essentielle pour déterminer précisément à quel type cellulaire est attribuée l'altération fonctionnelle provoquée par l'absence de ces deux canaux ioniques homologues.

### **FONCTION INTRACELLULAIRE DES CANAUX CATIONIQUES TMEM176A ET B ?**

Afin de mieux comprendre la fonction intracellulaire de TMEM176A et B, il est tout d'abord intéressant de noter qu'elle n'est très probablement pas strictement restreinte aux cellules myéloïdes (et en particulier à la présentation croisée antigénique) ou aux cellules ROR $\gamma$ <sup>+</sup>. Il est possible que cette fonction s'adapte selon le type cellulaire. En effet, il a été détecté des niveaux d'expression en général plus faibles mais significatifs dans de multiples autres types cellulaires immunitaires (Condamine et al., 2010 ; Drujont et al., 2016 ; Louvet et al., 2005) mais aussi dans des cellules non hématopoïétiques aussi diverses que certains fibroblastes (Lurton et al., 1999), des neurones (Maeda et al., 2006) ou diverses cellules tumorales (Cuajungco et al., 2012 ; Otsubo et al., 2014) (**Figure 27**). L'étude du rôle de ces homologues dépasse donc le cadre de l'immunologie. Il n'existe cependant que très peu d'études visant à comprendre la fonction de ces homologues. Maeda et al. ont généré une souris déficiente pour *Tmem176b* (appelée mClast1-KO) similaire à la notre et ont observé l'apparition d'ataxie dans une fraction des souris associée à une désorganisation du cervelet due à la

perte des cellules neuronales dites granulaires dans lesquelles *Tmem176b* est préférentiellement exprimé en comparaison avec d'autres types de neurones (Maeda et al., 2006). Dans deux autres études, les auteurs ont examiné l'effet de l'induction de l'expression de *Tmem176b* : D'une part, Ruy et al. ont observé que *Tmem176b* était négativement régulé par une forme oncogénique de Ras et que le maintien de son expression réduisait la tumorigénicité de cellules NIH3T3 (transformées par H-RasV12) dans des souris NUDE (Ryu et al., 2010). D'autre part, Yano et al. ont rapporté que l'expression de *Tmem176b* (induite par le récepteur Activin-Like-Kinase 2, ALK2) favorisait la différenciation de myoblastes en ostéoclastes (Yano et al., 2014).

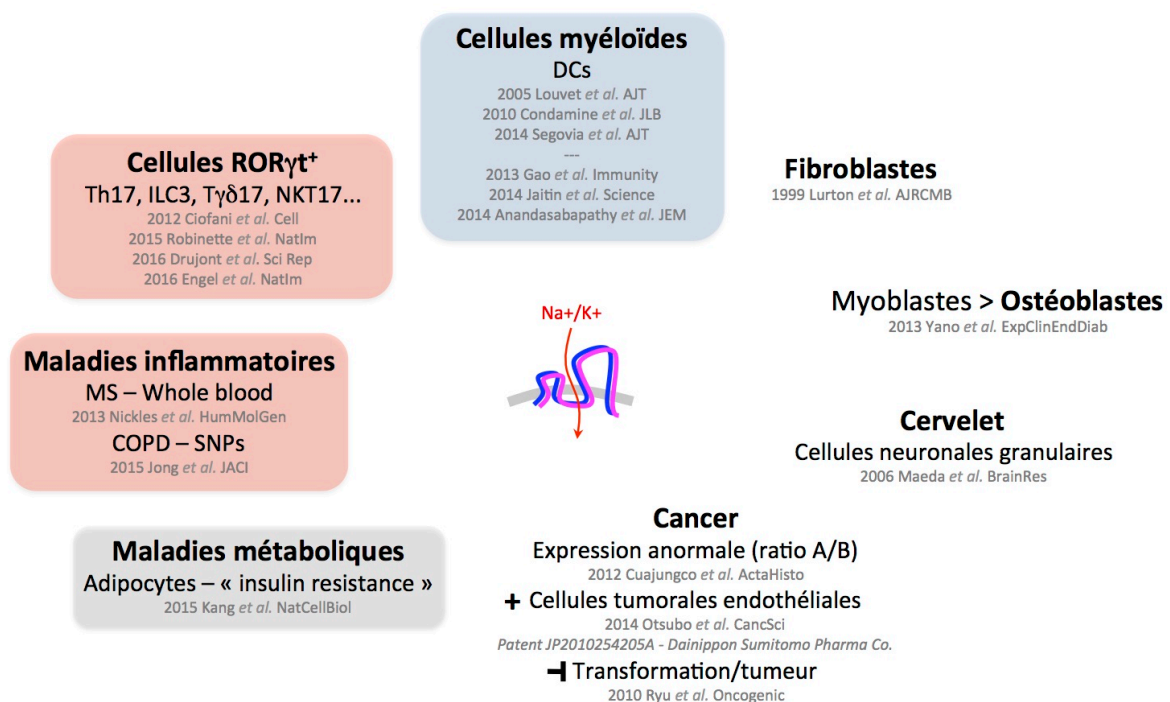


Figure 27 Expression sélective mais diverse de *Tmem176a* et *b*.

La plupart des publications reportant une expression de ces homologues, chez la souris ou l'homme, ne sont pas associées avec une étude fonctionnelle *in vivo*. La souris double KO (DKO) que nous avons générée aura donc une grande utilité dans des champs de recherche très variés, au delà de l'immunologie.

Ainsi, les protéines TMEM176A et B semblent être présentes à un niveau basal dans une grande variété de cellules mais peuvent être induites à de forts niveaux d'expression par des stimuli spécifiques (comme ceux qui induisent l'expression de ROR $\gamma$ t) pour les besoins spécialisés de certaines différenciations cellulaires. Il restait donc à découvrir à partir de quelle fonction universelle, si elle existe, liée à un organe intracellulaire ubiquitaire ces canaux cationiques pourraient médier leur(s) fonction(s).

## LIEN AVEC LE GOLGI ?

Il avait précédemment été montré que TMEM176B pouvait être détecté au niveau de la membrane des phagosomes dans les DCs humaines (Segovia et al., 2014 ; Shui et al., 2008 ). Cependant, une large part de l'expression de cet homologue apparaissait en dehors de ce compartiment cellulaire, notamment au regard des analyses préliminaires chez le rat qui suggéraient une localisation principalement péri-nucléaire (Louvet et al., 2005). Finalement, ces premiers résultats sont cohérents avec notre démonstration récente (Drujont et al., 2016) d'une accumulation de TMEM176A et B au niveau de l'appareil de Golgi. Cet organe complexe est formé d'une multitude d'unités fonctionnelles regroupées en ruban ("Golgi ribbon") près du centrosome (région péri-nucléaire), chacune constituée d'un empilement ("stack") de citernes plates à travers lesquelles transitent les cargos moléculaires provenant du réticulum endoplasmique (RE), successivement du *cis*-Golgi vers le *trans*-Golgi et le réseau *trans*-Golgi (TGN, trans-Golgi network). Grâce à la combinaison de marqueurs *cis*- et *trans*-Golgi et à des traitements permettant de séparer chaque unité du Golgi, nous avons trouvé que TMEM176B se localisait plus précisément à l'extrémité du TGN. De façon importante, cette forte association au Golgi a été retrouvée à la fois dans des cellules HeLa, dans des DCs dérivées de monocytes ainsi que dans des Th17 différenciées in vitro. Ces résultats sont cohérents avec une fonction de TMEM176B (et A) dans les phagosomes de DCs puisque le TGN est en étroite relation avec le compartiment endo/phagosomal et dans les deux directions (antérograde et rétrograde). La fonction dans les Th17 reste cependant à élucider.

De façon intéressante, des résultats préliminaires de visualisation en temps réel de la dynamique intracellulaire de TMEM176B ont été obtenus récemment grâce à une collaboration avec le groupe de Franck Perez (Institut Curie, Paris). Ce travail a été développé au laboratoire par Mélanie Lancien (stage de M2) sur la technique dite "RUSH" (Boncompain et al., 2012) et montre clairement que TMEM176B transite à partir du RE vers le Golgi à partir duquel il va s'associer progressivement avec des vésicules mobiles, se déplaçant vers la membrane plasmique mais aussi à l'intérieur de la cellule. Ces observations requièrent désormais l'identification de la nature de ces vésicules mais renforce dès à présent notre hypothèse que TMEM176B (et probablement aussi TMEM176A) ne sont pas des canaux ioniques résidents du Golgi, mais jouent un rôle plus probablement en aval à



partir du TGN et touchant potentiellement plus largement le système endo/phagosomal dans son ensemble ainsi que la machinerie de sécrétion et/ou recyclage. En ce sens, il sera intéressant d'examiner l'impact de la double déficience pour *Tmem176a* et *b* sur la capacité de sécrétion cytokinique (et pas seulement de production/accumulation) des Th17 (ou ILC3 etc...) mais aussi sur leur sensibilité à la signalisation de récepteurs spécifiques tels que l'IL-23R, l'IL-1R, le TGF $\beta$ R ou le CCR6 (**Figure 28**).

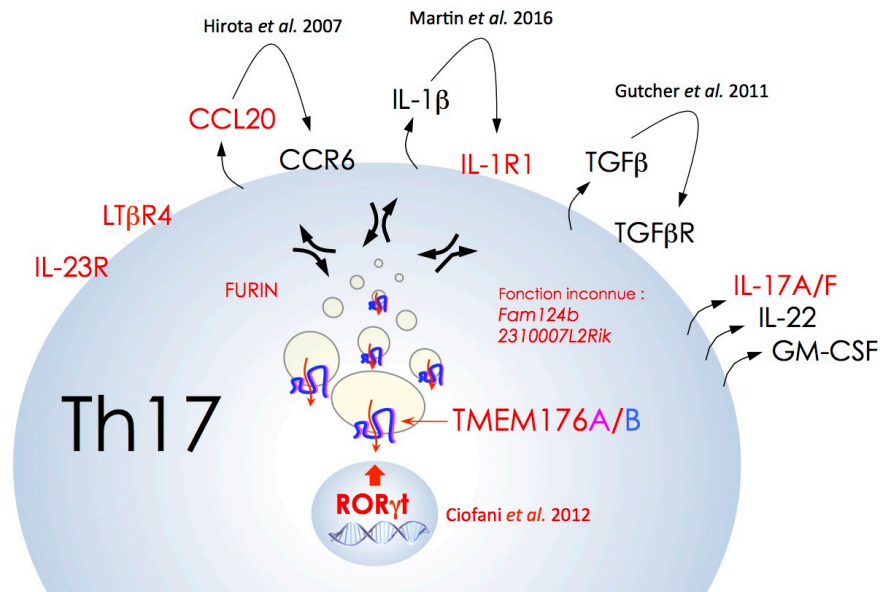


Figure 28 Principaux acteurs moléculaires associés à la biologie (différenciation, stabilité, migration, fonction) des cellules Th17.

Les cibles directes de ROR $\gamma$ t sont indiquées en rouge. La dynamique de localisation des canaux ioniques TMEM176A et B à partir du réseau *trans*-Golgien vers le système endosomal (et possiblement sécrétoire/recyclage) suggère qu'ils jouent un rôle dans la régulation de processus intracellulaires spécifiques et encore inconnus dans les cellules Th17. En ce sens, il est intéressant de remarquer que les cellules Th17 sont capables d'exprimer à la fois des récepteurs clés (CCR6, IL-1R1, TGF $\beta$ R) et leur ligand (CCL20, IL-1 $\beta$ , TGF $\beta$ ) de façon autocrine. Nous posons l'hypothèse que l'ensemble ou une partie de ces processus post-traductionnels requiert la présence de TMEM176A et B à travers leur activité ionique qui reste à élucider dans ces cellules.

Au niveau moléculaire, il est intéressant de mettre en parallèle la fonction d'équilibrage du pH phagosomal (dans les DCs) de *Tmem176b* (Segovia et al., 2014) avec le rôle de GPHR, le seul canal ionique ( $\text{Cl}^-$ ) résident du Golgi, dans l'établissement d'un gradient de pH entre le RE et à travers tout l'appareil de Golgi (Maeda et al., 2008). Il est alors tentant de suggérer que TMEM176A et B participent directement aux réglages précis du pH dans les différents compartiments post-Golgiens, des vésicules de sécrétion aux lysosomes. Cette fonction serait alors préférentiellement développée dans certaines cellules telles que les cellules myéloïdes immatures mais aussi dans les cellules ROR $\gamma$ t+ pour des raisons encore largement incompréhensibles mais dont l'élucidation pourrait lever le voile sur de nouveaux mécanismes de régulation du système immunitaire.

# ANNEXES

- A. Annexe I : Article publié dans *PLOS ONE*, « Evaluation of the therapeutic potential of Bone Marrow-Derived Myeloid Suppressor Cell (MDSC) adoptive transfer in mouse models of autoimmunity and allograft rejection » (Drujont et al. 2014)**



# Evaluation of the Therapeutic Potential of Bone Marrow-Derived Myeloid Suppressor Cell (MDSC) Adoptive Transfer in Mouse Models of Autoimmunity and Allograft Rejection

Lucile Drujont<sup>1,9</sup>, Laura Carretero-Iglesia<sup>1,9</sup>, Laurence Bouchet-Delbos<sup>1</sup>, Gaelle Beriou<sup>1</sup>, Emmanuel Merieau<sup>1</sup>, Marcelo Hill<sup>1,11</sup>, Yves Delneste<sup>2</sup>, Maria Cristina Cuturi<sup>1</sup>, Cedric Louvet<sup>1\*</sup>

**1** ITUN, Inserm UMR\_S 1064, Center for Research in Transplantation and Immunology, Nantes, France, **2** UMR Inserm 892 CNRS 6299, Université d'Angers, CHU Angers, Laboratoire d'Immunologie et Allergologie, Angers, France

## Abstract

Therapeutic use of immunoregulatory cells represents a promising approach for the treatment of uncontrolled immunity. During the last decade, myeloid-derived suppressor cells (MDSC) have emerged as novel key regulatory players in the context of tumor growth, inflammation, transplantation or autoimmunity. Recently, MDSC have been successfully generated in vitro from naive mouse bone marrow cells or healthy human PBMCs using minimal cytokine combinations. In this study, we aimed to evaluate the potential of adoptive transfer of such cells to control auto- and allo-immunity in the mouse. Culture of bone marrow cells with GM-CSF and IL-6 consistently yielded a majority of CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>hi/lo</sup> cells exhibiting strong inhibition of CD8<sup>+</sup> T cell proliferation in vitro. However, adoptive transfer of these cells failed to alter antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cell proliferation and cytotoxicity in vivo. Furthermore, MDSC could not prevent the development of autoimmunity in a stringent model of type 1 diabetes. Rather, loading the cells prior to injection with a pancreatic neo-antigen peptide accelerated the development of the disease. Contrastingly, in a model of skin transplantation, repeated injection of MDSC or single injection of LPS-activated MDSC resulted in a significant prolongation of allograft survival. The beneficial effect of MDSC infusions on skin graft survival was paradoxically not explained by a decrease of donor-specific T cell response but associated with a systemic over-activation of T cells and antigen presenting cells, prominently in the spleen. Taken together, our results indicate that in vitro generated MDSC bear therapeutic potential but will require additional in vitro factors or adjunct immunosuppressive treatments to achieve safe and more robust immunomodulation upon adoptive transfer.

**Citation:** Drujont L, Carretero-Iglesia L, Bouchet-Delbos L, Beriou G, Merieau E, et al. (2014) Evaluation of the Therapeutic Potential of Bone Marrow-Derived Myeloid Suppressor Cell (MDSC) Adoptive Transfer in Mouse Models of Autoimmunity and Allograft Rejection. PLoS ONE 9(6): e100013. doi:10.1371/journal.pone.0100013

**Editor:** Ryan M. Teague, Saint Louis University School of Medicine, United States of America

**Received:** December 6, 2013; **Accepted:** May 21, 2014; **Published:** June 13, 2014

**Copyright:** © 2014 Drujont et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work has been carried out thanks to the support of the Labex IGO project (n° ANR-11-LABX-0016-01) funded by the «Investissements d'Avenir» French Government program, managed by the French National Research Agency (ANR). This work was also supported by funds from IHU-Cesti (Investissement d'Avenir ANR-10-IBHU-005, région Pays de la Loire et Nantes Métropole). LD was supported by an Inserm-Région Pays de la Loire fellowship. CL was supported by an Inserm "young researcher" CDD. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: cedric.louvet@univ-nantes.fr

☞ These authors contributed equally to this work.

☞ Current address: Laboratorio de Inmunorregulación e inflamación, Institut Pasteur de Montevideo, Departamento de Inmunobiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

## Introduction

Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) comprise a heterogeneous population of myeloid cells at various stages of differentiation accumulating during pathological situations, such as tumor development or inflammation, and with the ability to suppress T-cell responses [1,2,3]. In mice, MDSC are broadly defined as CD11b<sup>+</sup> Gr1<sup>+</sup> cells and have been shown to exhibit a variety of suppressor mechanisms [4,5].

Growing evidence indicate a central role of MDSC in diverse models of autoimmune diseases [6] including type 1 diabetes [7,8], arthritis [9], colitis [10], alopecia areata [11], myocarditis [12] or experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) [13,14,15]. A protective role of MDSC has also been documented in the context

of allogenic transplantation [4,16,17,18,19,20,21]. Interestingly, a recent report linked the accumulation of MDSC with FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells (Tregs) in kidney-transplanted patients [22].

Thus, similarly to Tregs [23], MDSC represent a novel regulatory cell type that could be manipulated to achieve immune tolerance in the context of autoimmunity or transplantation. Although injections of G-CSF [24], LPS [18] or IL-33 [25] have been shown to favor the generation of endogenous MDSC in allograft recipient mice, a promising and clinically applicable approach would consist in the adoptive transfer of in vitro-generated MDSC. In this regard, the study by Rossner et al. initially paved the way towards MDSC generation from bone marrow (BM) cells using GM-CSF [26]. Alternatively, Zhou et al. demonstrated the development of MDSC from mouse stem cells

[27]. Other studies reported that BM cells co-cultured with hepatic stellate cells could lead to the production of MDSC effectively preventing murine islet allograft rejection [28] or colitis [29]. Generally, GM-CSF, in conjunction with tumor cells conditioned culture medium, appeared as a pivotal cytokine for the generation of MDSC [30,31]. IL-6 has subsequently been identified as a potent complement to GM-CSF for the generation of both mouse and human MDSC [32,33]. Importantly, Marigo et al. showed that mouse bone marrow-derived MDSC generated with GM-CSF and IL-6 exhibit a stronger immunosuppressive activity *in vivo* and could induce long-term survival of pancreatic islet allograft upon repeated adoptive transfer [32]. This latter study opened an avenue to the generation of these cells in great numbers and in a controlled manner for their use in cellular immunotherapy.

In the current study, we investigated and compared the suppressive potential of BM-derived MDSC generated *in vitro* with GM-CSF and IL-6, without combination treatment, in different mouse models of auto- and allo-immunity.

## Results

Based on the method described by Marigo et al. [32], we cultured BM cells from naive mice with GM-CSF and IL-6 and examined their phenotype after 4 days. We routinely obtained > 90% of CD11b<sup>+</sup> cells that could be subdivided in Gr1<sup>hi</sup> and Gr1<sup>low</sup> cells (Figure 1A and B). Gr1<sup>low</sup> cells, which contain the majority of CD11c<sup>+</sup> cells (Figure 1C), were shown to exhibit the highest suppressive activity [32]. Attributing the term MDSC to immature myeloid cells requires the demonstration of an immunosuppressive function, at least *in vitro*. As shown in Figure 2A and B, BM cells cultured with GM-CSF and IL-6 efficiently prevented CD8<sup>+</sup> T cell proliferation in a dose-dependent manner, reaching >80% inhibition at a ratio of 2:1 (MDSC:T cells).

We then examined the suppressive potential of these MDSC *in vivo*. In order to best reproduce a T cell response triggered by a cellular antigen, we immunized mice with COS cells transfected with a plasmid encoding a non-secreted fusion protein linking the ovalbumin peptide SIINFEKL (OVA<sub>257-264</sub>) to GFP. In this system, the OVA peptide is presented to CD8<sup>+</sup> T cells by recipient APCs on their MHC class I molecules through the processes of phagocytosis and antigen cross-presentation. The injection of CD8<sup>+</sup> T cells from TCR-transgenic OT-1 mice then allows the monitoring of an antigen-specific T cell response *in vivo*, as depicted in Figure 3A and C. Immunization with OVA-expressing COS cells resulted in a strong CD8<sup>+</sup> T cell proliferation while control COS cells did not. Concomitant adoptive transfer of MDSC and immunization did not prevent this proliferation (Figure 3B). We then hypothesized that, rather than significantly altering proliferation, MDSC could influence their differentiation into CTLs. However, as shown in Figure 3D, MDSC failed to impact antigen-specific T cell cytotoxicity.

To assess the effect of MDSC adoptive transfer in a more physiological context, we made use of a model of type 1 diabetes [34,35] in which autoimmunity is induced by the injection of CD8<sup>+</sup> OT-1 T cells in conjunction with a polyclonal anti-OVA antibody (Ab) into RIP-mOVA transgenic mice (membrane OVA is expressed as a neo-antigen by the pancreatic beta cells under the rat insulin promoter). In our hands, and as previously established [34], virtually all mice become diabetic within 5 to 12 days. Single adoptive transfer of MDSC on the day of OT-1 and Ab injection did not prevent diabetes development (Figure 4A). We reasoned that MDSC might benefit from an inflammatory milieu to stably exert their suppressive function on T cells. However, neither two

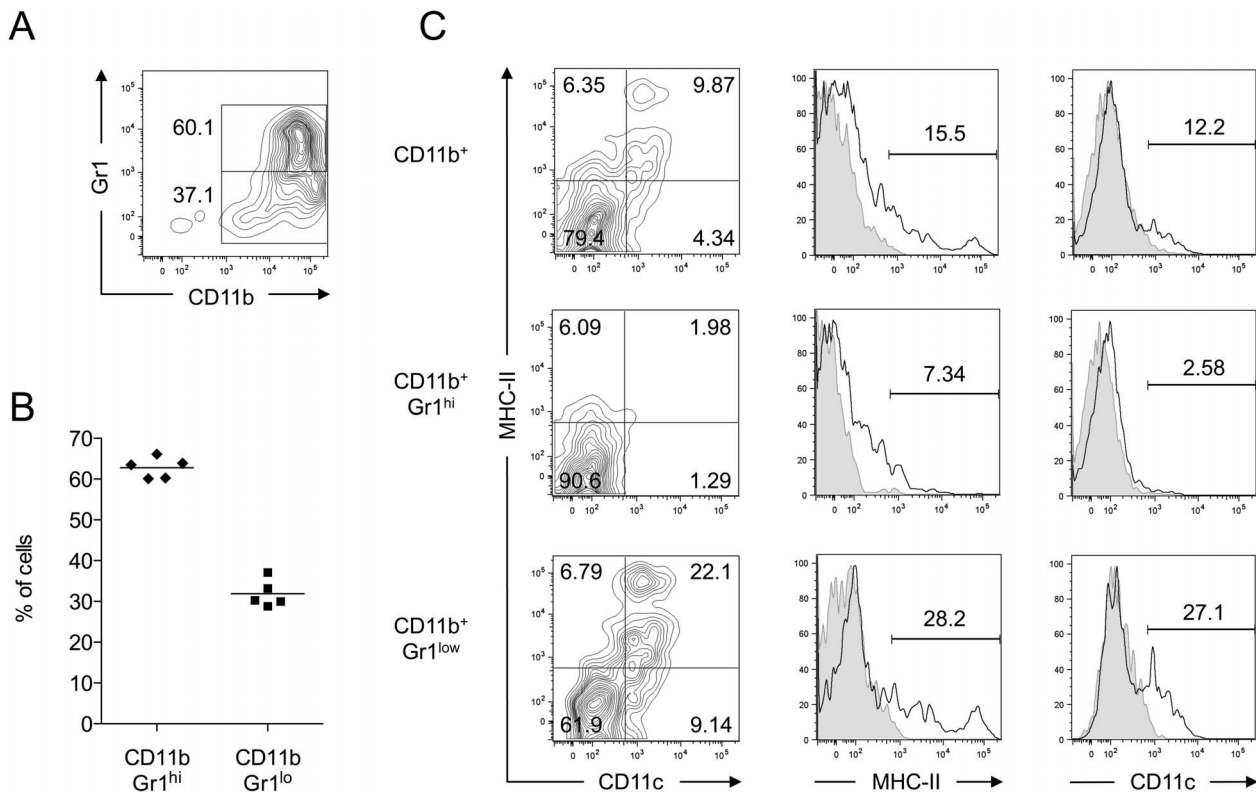
consecutive adoptive transfers of MDSC, 2 and 5 days after OT-1 and Ab injection (Figure 4B), nor a single injection at day 5 using twice as much cells (data not shown) significantly impinged on the progression of the disease. Finally, we tested whether the loading of MDSC with the antigenic peptide before injection could potentiate the suppression by promoting their interaction with the diabetogenic T cells. Strikingly, this approach seemed to rather exacerbate the development of the disease, since treated mice developed accelerated diabetes compared to control mice (Figure 4C).

Next, we tested whether adoptive transfer of MDSC could modulate a polyclonal response in the context of allograft rejection. As shown in Figure 5A, while male skin grafts transplanted onto female recipients were rejected within 19 to 28 days, two injections of syngenic (female) MDSC, the day before transplantation and at day 6 post-transplantation, were sufficient to prolong graft survival. A single injection of LPS-activated MDSC (LPS was added to the MDSC culture for the last 5 hours) on the day of transplantation similarly achieved a significant outcome (Figure 5B). However, this effect was markedly and reproducibly enhanced with five weekly consecutive injections, leading to graft survival up to 40 days (Figure 5C).

To understand the beneficial effect of MDSC adoptive transfers on skin graft survival, we investigated the immune cell composition directly in the graft as well as in the draining lymph nodes and in the spleen, two weeks post-transplantation (after three weekly injections of MDSC). Few or no injected MDSC were detected (using the congenic marker Ly5.1) suggesting that these cells are rapidly eliminated or preferentially home to a distinct location than the skin graft, the draining lymph nodes or the spleen. Surprisingly, we found that skin grafts from both untreated and MDSC-treated mice showed similar numbers of total infiltrated leucocytes (data not shown). In fact, the proportion of CD4<sup>+</sup> T cells was even increased in MDSC-treated mice (Figure 6A) whereas no difference was observed for CD8<sup>+</sup> T cells (Figure 6B). In addition, donor-specific CD8<sup>+</sup> T cells were found in similar numbers both in skin grafts (Figure 6C) and in the periphery (Figure 7A). The proportions of CD19<sup>+</sup> B cells, CD3<sup>-</sup> NK1.1<sup>+</sup> NK cells, CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> or CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells were not altered by MDSC adoptive transfers (data not shown). FoxP3<sup>+</sup> cell numbers among CD4<sup>+</sup> T cells were increased in skin-grafted mice compared to naive mice but no significant differences were observed between untreated and MDSC-treated mice (Figure 7B). As expected, increased numbers of CD25<sup>+</sup> and CD69<sup>+</sup> T cells were detected mostly in the draining lymph nodes of skin graft recipients compared to naive mice (Figure 7C and D). However, MDSC adoptive transfers did not prevent this activation phenotype. On the contrary, we observed a dramatic increase of CD25<sup>+</sup> and CD69<sup>+</sup> T cell numbers in MDSC-treated mice, almost exclusively in the spleen (Figure 7C and D), a phenomenon that was also associated with increased numbers of MHC II<sup>+</sup> and CD86<sup>+</sup> cells (Figure 8A and B). Thus, MDSC adoptive transfers, rather than specifically suppressing the allogeneic immune response, appears to induce a state of systemic activation that correlates with prolongation of skin graft survival.

## Discussion

Compelling evidence from animal models suggest a great potential of MDSC adoptive transfer for preventing graft rejection or treating autoimmune disorders. For example, MDSC from tumor-bearing mice have been shown to prevent the onset of type 1 diabetes when co-transferred with diabetogenic CD4<sup>+</sup> T cells [7]. Similarly, MDSC purified from LPS-treated mice are capable



**Figure 1. Phenotype of BM-derived MDSC.** (A) BM cells from naive mice were cultured in the presence of GM-CSF and IL-6 for 4 days. Surface expression of CD11b and Gr1 was measured by flow cytometry. (B) Quantification of the relative proportions of CD11b<sup>+</sup> Gr1<sup>hi</sup> and CD11b<sup>+</sup> Gr1<sup>low</sup> populations in independent preparations. (C) Expression of CD11c and MHC II on total CD11b<sup>+</sup> cells or in Gr1<sup>hi</sup> and Gr1<sup>low</sup> populations. Gray areas represent fluorescence minus one (FMO) controls. Data show representative results from at least four independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0100013.g001

of prolonging skin allograft survival [18]. These findings prompted us to embark on a study to assess their therapeutic potential in mouse models of autoimmunity and transplant rejection. A translational view implicates the development of a clinically acceptable method for the production of these cells. Marigo et al. provided convincing data highlighting the high suppressive activity of MDSC generated from BM cells using GM-CSF supplemented with IL-6, for the *in vivo* inhibition of T cell responses as well as the prevention of allogeneic islet rejection [32].

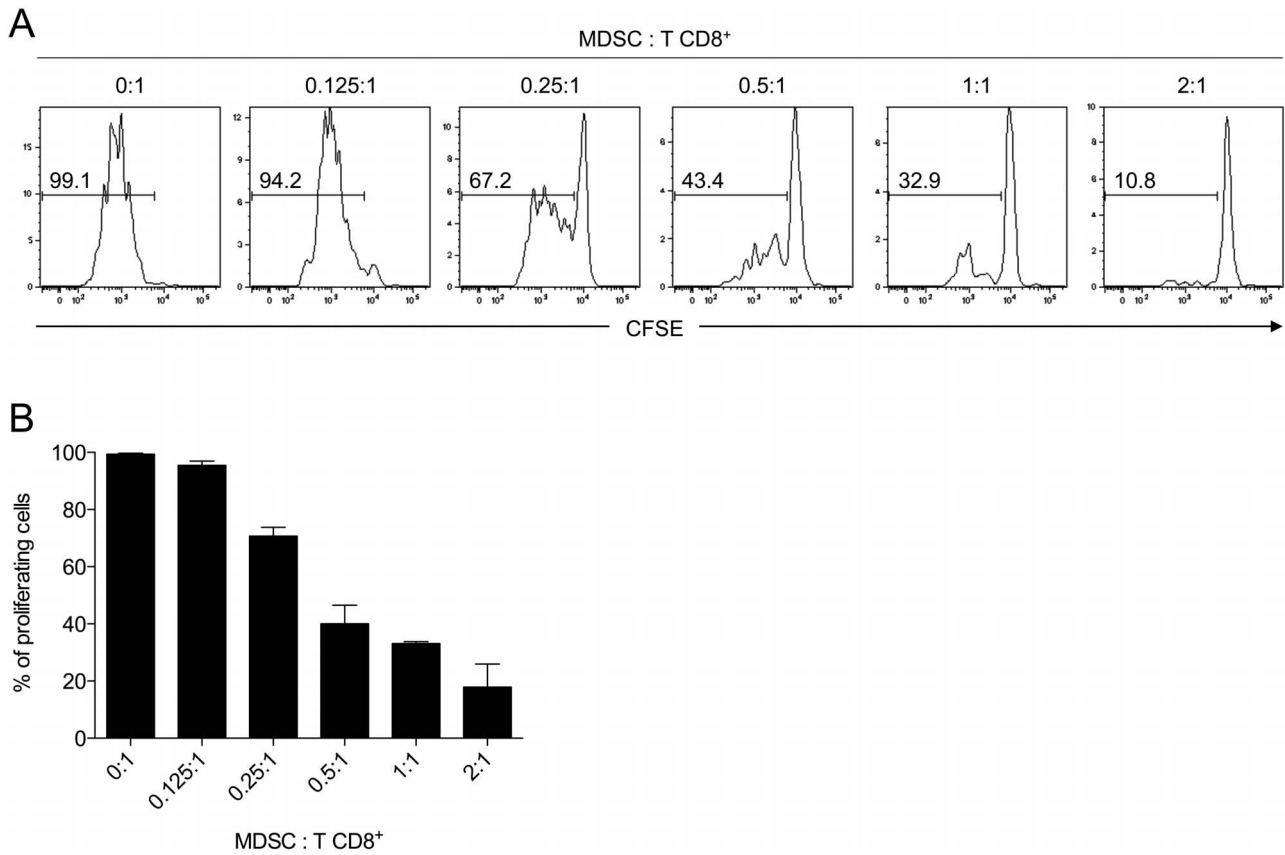
While we succeeded in producing *in vitro* suppressive CD11b<sup>+</sup> cells using this approach, we did not observe any alteration of *in vivo* antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cell responses or autoimmune diabetes development after adoptive transfer of these cells. It is important to note that this stringent *in vivo* experimental procedure involves a high number of strongly reactive monoclonal (OT-1 TCR transgenic) T cells. Furthermore, the expansion of diabetogenic CD8<sup>+</sup> T cells is not the result of homeostatic proliferation since RIP-mOVA mice are non-irradiated lymphosufficient hosts, but strictly depends on robust Fc receptor-mediated OVA cross-presentation by DCs [34].

Surprisingly, we found that loading MDSC with the neo-antigen OVA peptide rather exacerbated than dampened the development of the disease. This observation was reproduced using *in vivo* cytotoxicity assay (data not shown). The culture of whole BM cells with GM-CSF and IL-6 results in a heterogeneous mixture of myeloid cells, a fraction of them likely bearing the potential to differentiate into highly immunogenic DCs. Additional factors, such as PGE<sub>2</sub> [36] or subset separation before injection, may help to maintain a suppressive homogeneity. The

use of few markers expressed at the surface of MDSC obviously does not satisfy the requirement of a pure and stable suppressive population. In this regard, CD11b<sup>+</sup> Gr1<sup>+</sup> cells have also been described as immunostimulatory during tumor growth [37] or autoimmunity [38]. Taken together, these observations could raise doubts over the safety of BM-derived myeloid cell transfer, potentially detrimental in specific inflammatory situations.

The transplantation of male skin onto female recipients mounts a progressive expansion of low frequency polyclonal T cell clones leading to graft rejection. In this model, in contrast to type 1 diabetes, we found that multiple injections of MDSC significantly prolonged graft survival. It is tempting to speculate that a continuous treatment could result in long-term acceptance of the graft, as shown by Marigo et al. in pancreatic islet transplantation [32]. Of note, two injections of MDSC were not sufficient to prevent or delay rejection of complete mismatch skin grafts (Balb/c onto C57BL/6 mice, data not shown) pointing to the limit of these *in vitro* generated MDSC to impinge, by themselves, on a strong allogeneic response, yet in the same manner as *in vitro* expanded Tregs, alone, failed to provide significant graft prolongation in a complete mismatch setting, in lymphosufficient mice [39].

These results also emphasize the need for identifying strategies to increase and preserve the suppressive ability of MDSC after transfer in order to reduce the frequency of injections. Indeed, MDSC have been shown to rapidly differentiate into mature myeloid cells in the absence of tumor-derived factors or sustained inflammation [40,41]. In this regard, Greifengberg et al. originally demonstrated that LPS + IFN- $\gamma$  combination considerably



**Figure 2. BM-derived MDSC efficiently inhibit T cell proliferation *in vitro*.** CD8<sup>+</sup> T cells were purified from OT-1 transgenic mice and labeled with CFSE before anti-CD3/CD28 bead stimulation. MDSC generated *in vitro* with GM-CSF and IL-6 were added to T cells at different ratios. After three days of culture, the percentage of proliferating cells (CFSE<sup>low</sup>) in CD8<sup>+</sup> cells was assessed by flow cytometry. Representative histograms of CFSE dilution (A) and quantification of triplicates for each condition are shown (B). Data are representative of three independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0100013.g002

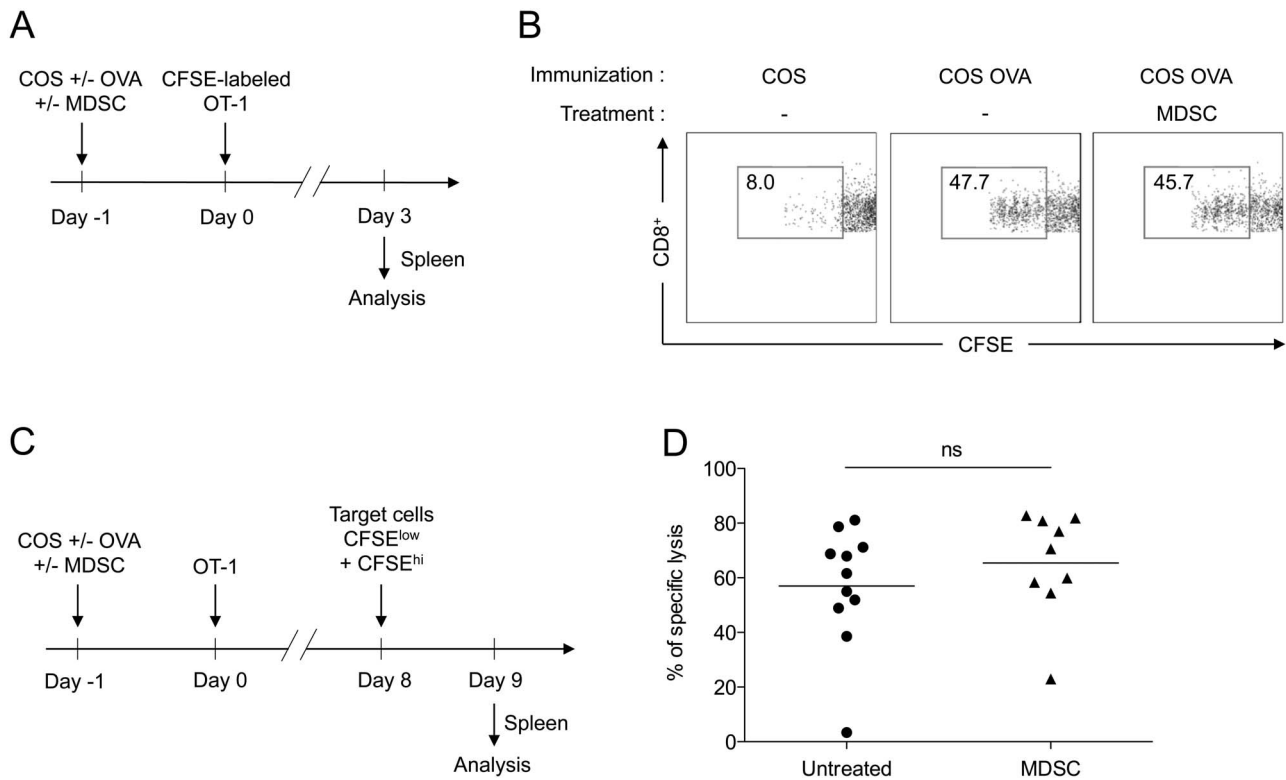
augmented the suppressive capacity of MDSC by impairing DC differentiation [42]. Similarly, Highfill et al. showed that addition of IL-13 in BM cells cultured with GM-CSF and G-CSF resulted in the production of potently suppressive MDSC that efficiently inhibited graft-versus-host disease [43]. Thus, amongst other strategies that have been reported to promote MDSC activation/expansion [5], our results support the relevance of this approach since a single injection of LPS-activated MDSC was sufficient to induce a significant prolongation of graft survival. It remains to be evaluated whether additional injections of these activated cells will reinforce this beneficial effect and if the addition of IFN- $\gamma$  (or other cytokines) could further boost their suppressive function *in vivo*.

Mechanistically, we have found that the beneficial effect of MDSC infusions on skin graft survival was paradoxically not explained by a decrease of donor-specific T cell response but rather associated with an over-activation of T cells and antigen presenting cells. The fact that this observation was prominently made in the spleen suggests that MDSC transfers could create a window of systemic exhaustion in the immune system allowing the allogeneic graft to survive, a phenomenon that would terminate immediately after cessation of the therapy, then excluding any mechanism of long term tolerance. Thus, while this effect is associated with delayed graft rejection in the setting of transplantation, it appears inefficient or rather detrimental during the development of a fast and potent autoimmune response. These differential outcomes stress the need to carefully evaluate MDSC

adoptive transfer therapies, or any other approaches, by using carefully chosen models in relation with the clinical aim.

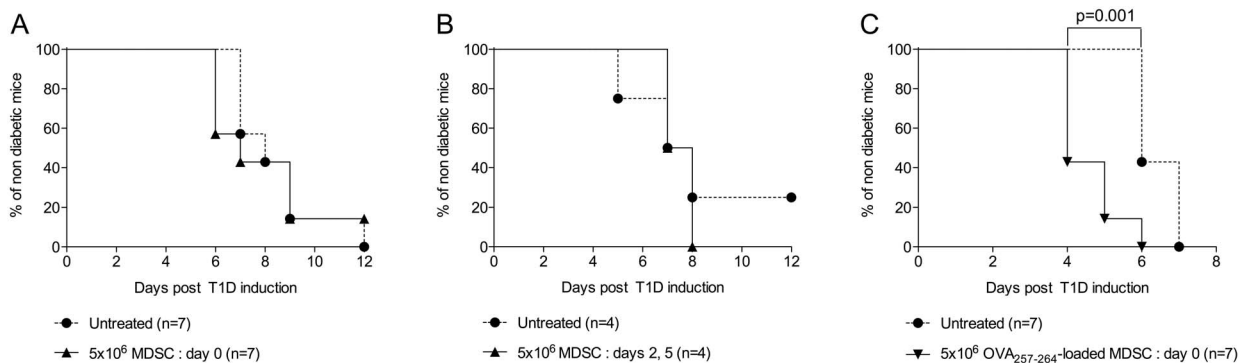
Interestingly, Treg therapy alone in lymphosufficient hosts, even in an antigen-specific fashion, similarly fails to induce a long-term protection from allograft rejection [39,44]. The combination of MDSC and Treg cell therapies could result in a synergistic effect. Indeed, numerous reports have shown that MDSC promote the development and homeostasis of Tregs over CD4<sup>+</sup> T effector cells [45], notably in the context of type 1 diabetes [7,8]. Moreover, MDSC can capture and present exogenous antigens to their MHC class II molecules which can be drastically upregulated upon IFN- $\gamma$  stimulation [46]. Treg accumulation has also been attributed to monocytic suppressive cells [19]. Thus, in spite of a recent study that challenged this view concerning granulocytic MDSC [47], these results generally argue for a beneficial interplay between Tregs and MDSC that could be relevant in the context of cellular therapy. Although similar levels of FoxP3<sup>+</sup> Treg were found in the draining lymph nodes or spleen of MDSC-treated mice, the detection of a potential beneficial effect of MDSC on these cells in the periphery will probably require the examination of the (donor) antigenic specificity. Moreover, it will be interesting to determine whether the increase of CD4<sup>+</sup> T cells that we observed in the skin grafts of MDSC-treated mice could reflect an influx of Treg that would be mostly specific for the donor antigens.

In summary, in the present study, we have compared the potential of *in vitro* generated MDSC adoptive transfer in relevant and distinct *in vivo* models of immune response. Our data



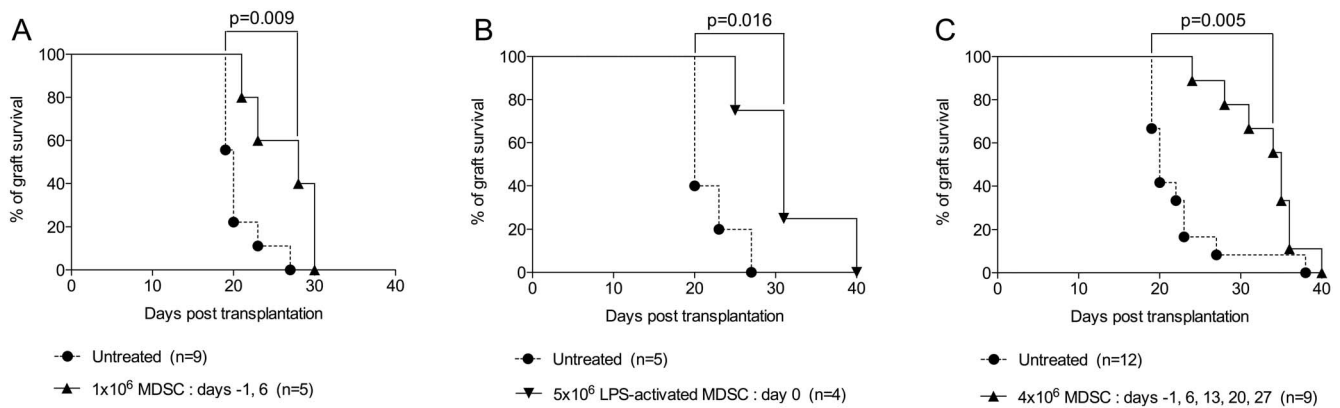
**Figure 3. Adoptive transfer of BM-derived MDSC does not alter antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cell responses.** (A–B) In vivo proliferation assay: COS cells transfected with a plasmid coding for GFP fused to the OVA<sub>257–264</sub> peptide (COS OVA) or GFP alone (COS) were injected i.v. into mice with or without MDSC generated in vitro with GM-CSF and IL-6. Responder CD8<sup>+</sup> T cells purified from OT-1 TCR-transgenic mice were labeled with CFSE and injected i.v. the following day. After 3 days, spleens of recipient mice were harvested to assess CFSE dilution by flow cytometry. Data are representative of two experiments. (C–D) In vivo cytotoxicity assay: CD8<sup>+</sup> T cells purified from OT-1 TCR-transgenic mice (non labeled with CFSE) were injected in COS GFP/OVA-immunized mice as described above. After 8 days, CFSE-labeled CD45.1<sup>+</sup> target cells either loaded with OVA<sub>257–264</sub> (CFSE<sup>hi</sup>) or control (CFSE<sup>low</sup>) peptides were injected. Specific lysis was determined the next day by flow cytometry by measuring the relative proportion of each population in the spleen of MDSC-treated or untreated mice compared to non-immunized mice. Data show results from four independent experiments with 9 to 11 mice per group. doi:10.1371/journal.pone.0100013.g003

highlight the need to refine the in vitro generation of homogeneous, stable and strongly suppressive myeloid cells before considering a therapeutic approach, most likely with combination treatments.



**Figure 4. Adoptive transfer of BM-derived MDSC does not prevent the development of autoimmune diabetes.** Type 1 diabetes was induced in RIP-mOVA mice by injecting (i.v.) naive CD8<sup>+</sup> T cells from OT-1 TCR-transgenic mice together with an anti-OVA polyclonal antibody (i.p.). Blood glycemia was monitored every day during at least 12 days. Indicated numbers of MDSC generated in vitro with GM-CSF and IL-6 were adoptively transferred at day 0 (A) or at days 2 and 5 (B). Alternatively, MDSC were loaded with the OVA<sub>257–264</sub> peptide before injection at day 0 (C). In each experiment, MDSC-treated mice were compared to a group of untreated mice. doi:10.1371/journal.pone.0100013.g004





**Figure 5. Adoptive transfer of BM-derived MDSC prolongs skin allograft survival.** (A) Male skin grafts were transplanted onto females recipients treated or not at days  $-1$  and  $6$  post-transplantation, with one million autologous (female) MDSC generated in vitro with GM-CSF and IL-6. (B) Alternatively, LPS was added in vitro for the last 5 hours of the MDSC culture and five million cells were injected at day 0. (C) Male skin grafts were transplanted onto females recipients treated or not at days  $-1$ ,  $6$ ,  $13$ ,  $20$  and  $27$  post-transplantation, with four million autologous (female) MDSC generated in vitro with GM-CSF and IL-6. Graft survival was monitored every other day from day 7 post-transplantation. doi:10.1371/journal.pone.0100013.g005

## Materials and Methods

### Ethics Statement

This study was carried out in strict accordance with the protocol approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of Pays de la Loire (Ref: CEEA.2012.211 and CEEA.2013.9).

### Mice

C57BL/6 mice were purchased from Janvier (France). RIP-mOVA (C57BL/6-Tg(Ins2-TFRC/OVA)296Wehi/WehiJ) transgenic mice [48] were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). For this line, hemizygous mice were maintained in the laboratory by breeding transgenic mice, selected by PCR genotyping, with wild-type C57BL/6 mice. OT-1 TCR-transgenic mice (C57BL/6-Tg(Tcr $\alpha$ Tcr $\beta$ )1100Mjb/Crl) [49] and Ly5.1 congenic mice (B6.SJL-Ptpr<sup>c</sup> Pepc<sup>b</sup>/BoyCrl) were purchased from Charles Rivers (France).

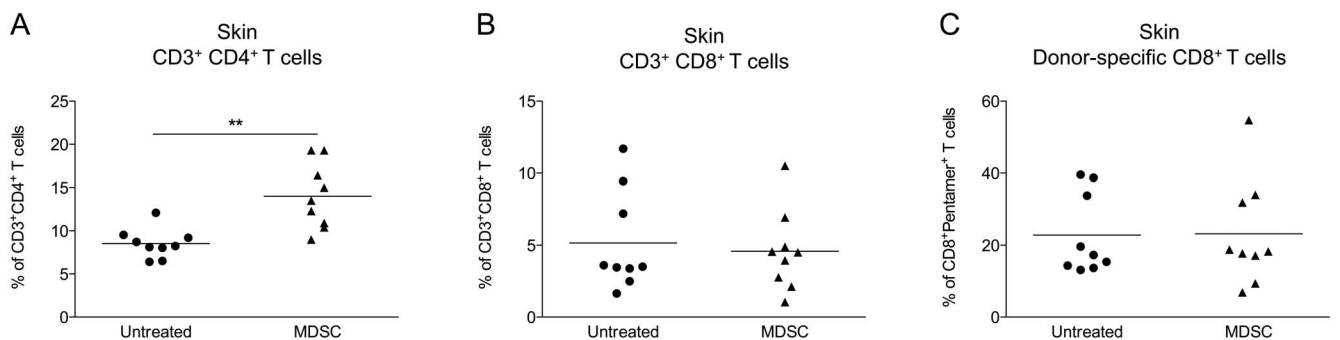
### Reagents

Murine GM-CSF was from Peprotech (Neuilly-sur-Seine, France). IL-6 and LPS were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). CFDA-SE (CFSE) was from Molecular Probes (Montluçon, France). OVA (SIINFEKL) and Smcy

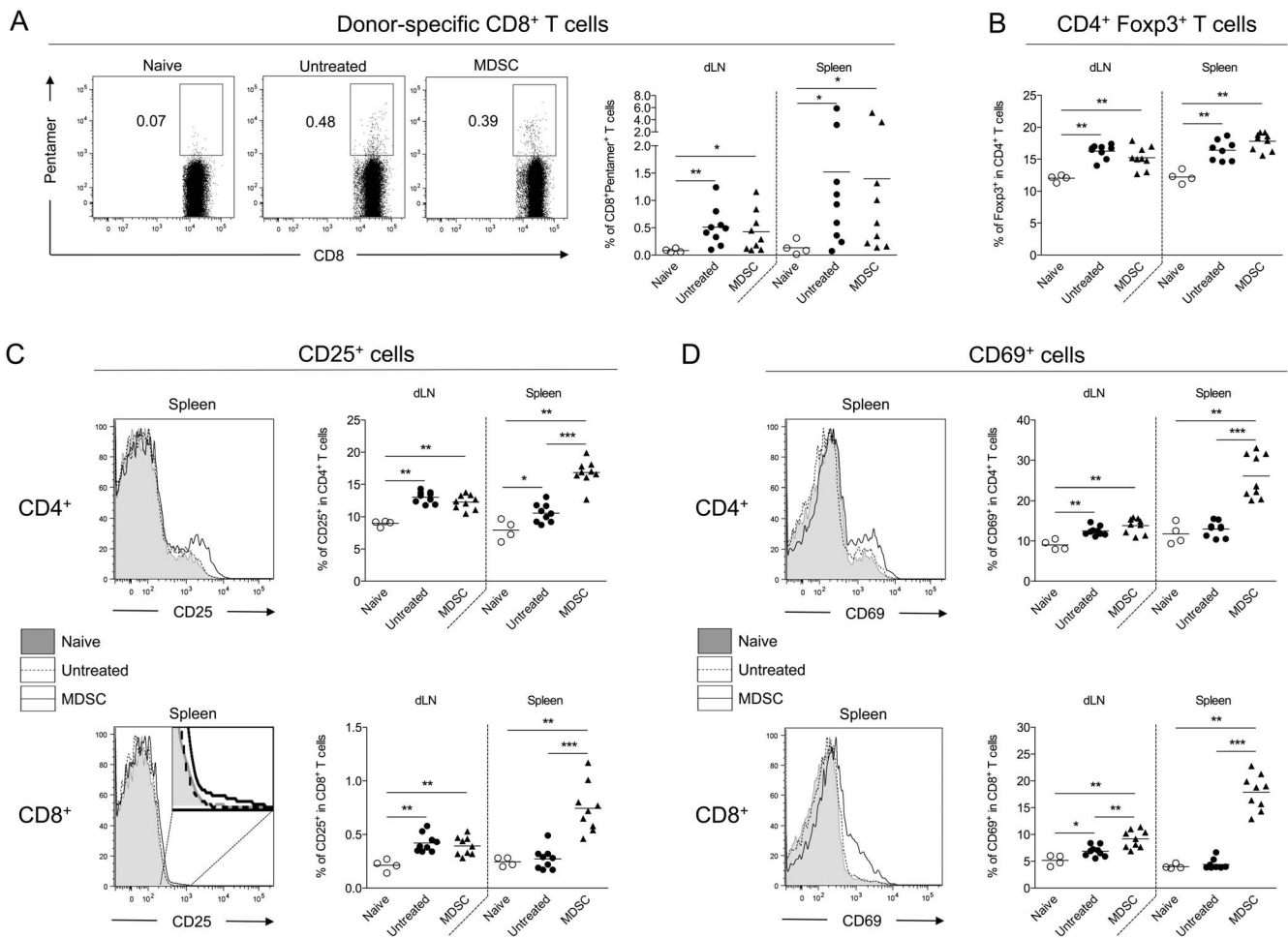
(KCSRNRQYL) peptides were from PolyPeptide (Strasbourg, France). Anti mouse CD11b biotin (M1/70) (used with streptavidin APC or streptavidin APC-Cy7), CD11b APC-Cy7 (M1/70), CD11c PE-Cy7 (HL3), I-A<sup>b</sup> FITC (AF6-120.1), Gr1 PE (Ly6C/G, RB6-8C5), CD45.1 APC (A20), CD45.2 APC-Cy7 (104), CD45.2 PerCP-Cy5.5 (104), CD19 APC (1D3), NK1.1 PE (PK136), CD3 $\epsilon$  PerCP-Cy5.5 (145-2C11), CD3 $\epsilon$  Pacific Blue (500A2), CD3 $\epsilon$  FITC (145-2C11), CD4 PE-Cy7 (RM4-5), CD8 $\alpha$  Pacific blue (53-6.7), CD8 $\alpha$  APC-Cy7 (53-6.7), CD8 $\alpha$  PerCP-Cy5.5 (53-6.7), FoxP3 Alexa Fluor647 (MF23), CD25 PE (704), CD69 FITC (H1.2F3), and CD86 FITC (B7.2, GL1) were from BD Pharmingen (Le Pont de Claix, France). Male antigen UTY-specific CD8<sup>+</sup> T cells were detected using a PE labelled Pro5 MHC Pentamer (H-2D<sup>b</sup>, WMHNMMDLI) (ProImmune Limited, Oxford, UK).

### Generation of BM-derived MDSC

MDSC were generated as previously described [32]. Tibias and femurs from C57BL/6 mice were removed and BM was flushed. Red blood cells (RBCs) were lysed with ammonium chloride. To obtain BM-derived MDSC,  $2.5 \times 10^6$  cells were plated into dishes with 100 mm diameter in 10 mL of complete medium, which consisted of 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Lonza, Levallois, France), nonessential amino acids, 1 mM sodium



**Figure 6. Adoptive transfer of BM-derived MDSC does not prevent lymphocyte infiltration in skin allografts.** Male skin grafts were transplanted onto females recipients treated or not at days  $-1$ ,  $6$  and  $13$  post-transplantation with four million autologous (female) MDSC generated in vitro with GM-CSF and IL-6. Skin grafts were harvested 14 days after transplantation and infiltrated leukocytes were analyzed by flow cytometry. Results are expressed in percentages of CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells (A), CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells (B) and donor-specific Pentamer<sup>+</sup> cells among CD8<sup>+</sup> T cells (C). Data show results from two independent experiments with 4 to 9 mice per group. \*\* $p < 0.01$ . doi:10.1371/journal.pone.0100013.g006



**Figure 7. Adoptive transfer of BM-derived MDSC is associated with increased numbers of CD25<sup>+</sup> and CD69<sup>+</sup> cells, mainly in the spleen.** Male skin grafts were transplanted onto female recipients treated or not at days -1, 6 and 13 post-transplantation with four million autologous (female) MDSC generated in vitro with GM-CSF and IL-6. Draining lymph nodes and spleen were harvested from skin-grafted mice 14 days after transplantation or from naive mice for flow cytometry analysis. (A) Representative staining and quantification of donor-specific Pentamer<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells in naive or skin-grafted mice. (B) Quantification of FoxP3<sup>+</sup> cells among CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells. (C, D) Representative stainings and quantifications of CD25<sup>+</sup> (C) and CD69<sup>+</sup> (D) among CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> or CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells. Data show results from two independent experiments with 4 to 9 mice per group. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . doi:10.1371/journal.pone.0100013.g007

pyruvate, 10 mM HEPES (all from Gibco, Saint Aubin, France), 2 mM glutamine and 50  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol (both from Sigma-Aldrich) in DMEM base (Gibco). Medium was supplemented with GM-CSF (40 ng/ml) and IL-6 (40 ng/ml) cytokines. Cells were maintained at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>-humidified atmosphere. After 4 days, cells were washed twice before flow cytometry analysis, in vitro culture or in vivo injection. In some experiments, LPS was added (1  $\mu$ g/mL final) for the last 5 hours of the culture.

#### *In vitro* Proliferation Assay

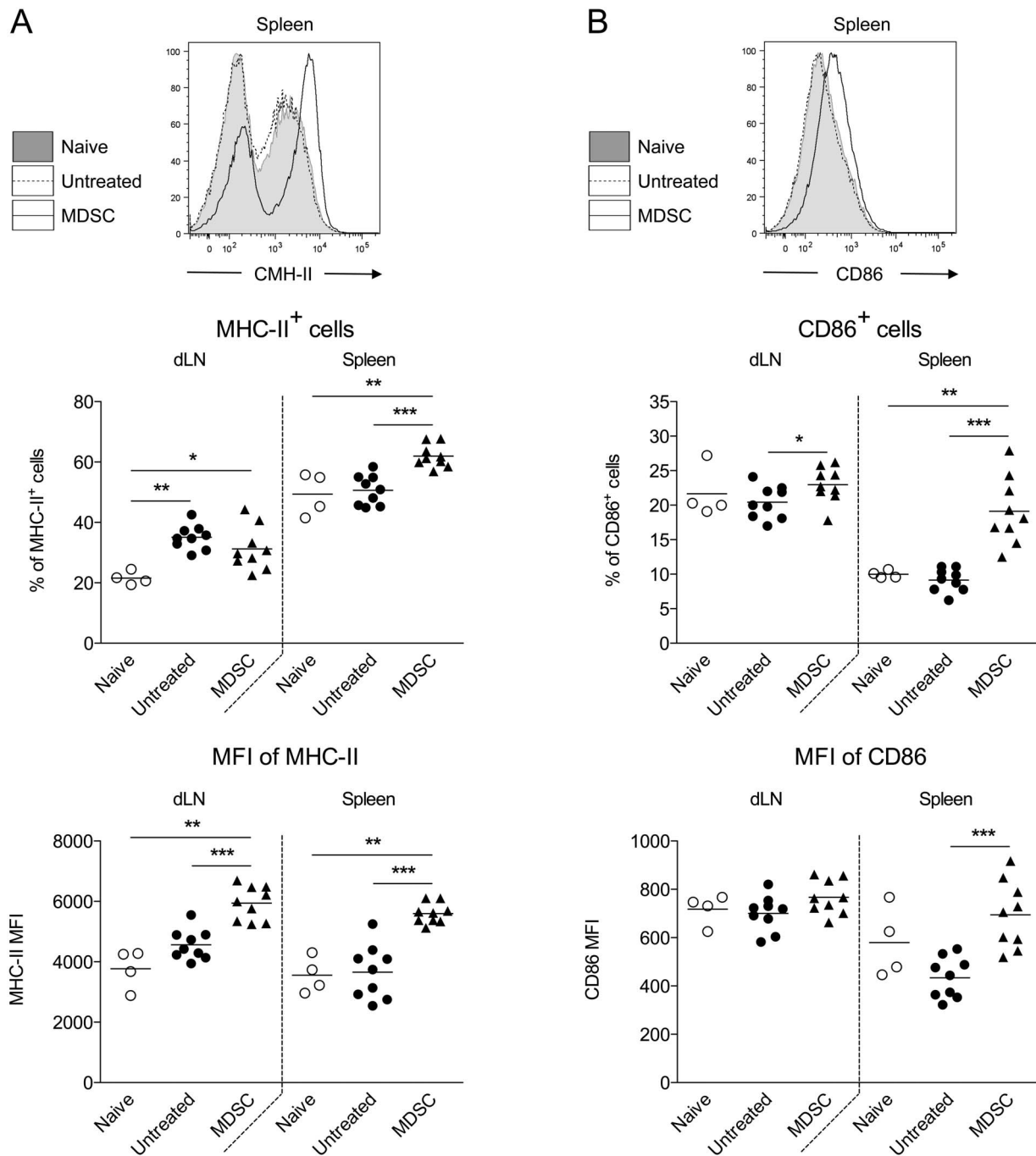
Responder CD8<sup>+</sup> T cells were purified (CD8a<sup>+</sup> T cell Isolation Kit II, Miltenyi Biotec, Paris, France) from spleens of naive C57BL/6 mice, labeled with CFSE and plated at the concentration of  $2 \times 10^4$  cells/mL in 96-well round bottom plate in 200  $\mu$ L final of complete medium. Anti-CD3/28 microbeads (Life Technologies, Saint Aubin, France) were used at a 1:1 ratio and increased numbers of BM-derived MDSC were added. After 3 days, CFSE dilution in CD8<sup>+</sup> T cells was analyzed by flow cytometry.

#### Immunization with OVA-expressing COS Cells

COS cells were transfected (Lipofectamine Transfection Reagent, Life Technologies) with plasmids (pCI-neo backbone, Promega, Charbonnières-les-Bains, France) coding for GFP alone or GFP fused to OVA<sub>257-264</sub> sequence (SIINFEKL peptide) at N-terminal. After 48 hours, COS cells expressing GFP alone (control COS) or OVA<sub>257-264</sub>-GFP fusion protein (COS OVA) were trypsinized and washed in PBS before i.v. injection ( $1 \times 10^5$  cells). Transfection efficiency routinely reached 40–50% of GFP<sup>+</sup> cells.

#### *In vivo* Proliferation Assay

Experimental scheme is depicted in Figure 3A. C57BL/6 mice were immunized with control COS or COS OVA cells and co-injected (i.v.) or not with  $6.5 \times 10^6$  BM-derived MDSC. The next day,  $5 \times 10^6$  CD8<sup>+</sup> T cells purified (CD8a<sup>+</sup> T cell Isolation Kit II, Miltenyi Biotec) from pooled spleens and lymph nodes of OT-1 TCR-transgenic mice were labeled with CFSE and injected (i.v.). After 3 days, spleens were harvested and CFSE dilution in injected CD8<sup>+</sup> T cells was analyzed by flow cytometry.



**Figure 8. Adoptive transfer of BM-derived MDSC is associated with increased numbers of MHC II<sup>+</sup> and CD86<sup>+</sup> cells, mainly in the spleen.** Male skin grafts were transplanted onto female recipients treated or not at days -1, 6 and 13 post-transplantation with four million autologous (female) MDSC generated in vitro with GM-CSF and IL-6. Draining lymph nodes and spleen were harvested from skin-grafted mice 14 days after transplantation or from naive mice for flow cytometry analysis. Representative stainings and quantifications of MHC II<sup>+</sup> (A) and CD86<sup>+</sup> (B) cells in naive or skin-grafted mice. Data show results from two independent experiments with 4 to 9 mice per group. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . doi:10.1371/journal.pone.0100013.g008

### *In vivo* Cytotoxicity Assay

Experimental scheme is depicted in Figure 3C. C57BL/6 mice were immunized with control COS or COS OVA cells and co-injected (i.v.) or not with  $5 \times 10^6$  BM-derived MDSC. The next day,  $0.25 \times 10^6$  CD8<sup>+</sup> T cells purified (CD8a<sup>+</sup> T cell Isolation Kit II, Miltenyi Biotec) from pooled spleens and lymph nodes of OT-1 TCR-transgenic mice were injected (i.v.). After 8 days, spleens cells from Ly5.1 mice (CD45.1<sup>+</sup> cells) were labeled with 4  $\mu$ M or

0.2  $\mu$ M of CFSE to obtain CFSE<sup>hi</sup> and CFSE<sup>lo</sup> populations respectively loaded with control Smcy and OVA<sub>257-264</sub> peptides and were injected (i.v.) at a 1:1 ratio ( $1.6 \times 10^6$  cells for each population). The next day, spleens were harvested to measure the relative proportions of each population within CD45.1<sup>+</sup> cells by flow cytometry. Specific lysis was determined by calculating the percentage of decrease of the CFSE<sup>hi</sup> population in immunized mice compared to non-immunized mice.

## Induction of Autoimmune Diabetes

Diabetes was induced in RIP-mOVA mice as previously described [34]. Briefly, 6 to 8 week-old RIP-mOVA mice were injected intravenously with  $5 \times 10^6$  CD8<sup>+</sup> T cells purified (CD8a<sup>+</sup> T cell Isolation Kit II, Miltenyi Biotec) from pooled spleens and lymph nodes of OT-1 TCR-transgenic mice together with intraperitoneal administration of 1 mg anti-OVA IgG. Anti-OVA serum was obtained from ovalbumin (OVA)-hyperimmunized rabbits (Covalab, Villeurbanne, France) and IgG were purified by protein A affinity chromatography. Endotoxin-free OVA protein was from Profos (Regensburg, Germany). Blood glucose levels were measured with a StatStrip Xpress Glucose/Ketone Meter monitoring system (Nova Biomedical, Les Ulis, France). Mice were considered diabetic after two consecutive measurements  $>250$  mg/dL.

## Skin Transplantation

Mice were anesthetized with a mixture of 5% xylazine (Rompun) and 18% ketamine in PBS (170  $\mu$ L) injected intraperitoneally (8.5 mg/kg of xylazine and 76.5 mg/kg of ketamine per mouse). Square skin grafts (1 cm<sup>2</sup>) were prepared from the tail of male wild-type C57BL/6 donors and transplanted on the shaved left flank of C57BL/6 female recipients. The grafts were fixed to

the graft bed with 10–12 interrupted sutures and were covered with protective tape. The first inspection was carried out seven days later and graft survival was monitored every other day. Rejection was defined as complete sloughing or a dry scab.

## Analysis of Cellular Populations in Skin Graft Recipients

Fourteen days after skin transplant, mice were sacrificed and draining lymph nodes, spleen and skin graft were harvested. Skin grafts were processed using collagenase D (Sigma-Aldrich) for 45 min at 37°C. Cells were fluorescently labeled and cellular populations were analyzed by flow cytometry.

## Statistical Analysis

Statistical analyses were performed with Graphpad Prism 5.0 (La Jolla, CA, USA) using the Mann-Whitney test. Survival rates were compared using the Log-rank (Mantel-cox) test. Statistical significance was defined as  $p < 0.05$ .

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LD LCI GB MH YD MCC CL. Performed the experiments: LD LCI LBD GB EM CL. Analyzed the data: LD LCI GB MCC CL. Wrote the paper: LD YD CL.

## References

- Gabrilovich DI, Nagaraj S (2009) Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 9: 162–174.
- Peranzoni E, Zilio S, Marigo I, Dolcetti L, Zanovello P, et al. (2010) Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition. *Curr Opin Immunol* 22: 238–244.
- Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V (2012) Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol* 12: 253–268.
- Dilek N, Vuillefroy de Silly R, Blancho G, Vanhove B (2012) Myeloid-derived suppressor cells: mechanisms of action and recent advances in their role in transplant tolerance. *Front Immunol* 3: 208.
- Ochando JC, Chen SH (2012) Myeloid-derived suppressor cells in transplantation and cancer. *Immunol Res* 54: 275–285.
- Cripps JG, Gorham JD (2011) MDSC in autoimmunity. *Int Immunopharmacol* 11: 789–793.
- Yin B, Ma G, Yen CY, Zhou Z, Wang GX, et al. (2010) Myeloid-derived suppressor cells prevent type 1 diabetes in murine models. *J Immunol* 185: 5828–5834.
- Hu C, Du W, Zhang X, Wong FS, Wen L (2012) The role of Gr1+ cells after anti-CD20 treatment in type 1 diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 188: 294–301.
- Fujii W, Ashihara E, Hirai H, Nagahara H, Kajitani N, et al. (2013) Myeloid-derived suppressor cells play crucial roles in the regulation of mouse collagen-induced arthritis. *J Immunol* 191: 1073–1081.
- Haile LA, von Wasielewski R, Gamrekelashvili J, Kruger C, Bachmann O, et al. (2008) Myeloid-derived suppressor cells in inflammatory bowel disease: a new immunoregulatory pathway. *Gastroenterology* 135: 871–881, e871–875.
- Singh V, Mueller U, Freyschmidt-Paul P, Zoller M (2011) Delayed type hypersensitivity-induced myeloid-derived suppressor cells regulate autoreactive T cells. *Eur J Immunol* 41: 2871–2882.
- Valaperti A, Marty RR, Kania G, Germano D, Mauermann N, et al. (2008) CD11b+ monocytes abrogate Th17 CD4+ T cell-mediated experimental autoimmune myocarditis. *J Immunol* 180: 2686–2695.
- Zehntner SP, Brickman C, Bourbonniere L, Remington L, Caruso M, et al. (2005) Neutrophils that infiltrate the central nervous system regulate T cell responses. *J Immunol* 174: 5124–5131.
- Zhu B, Bando Y, Xiao S, Yang K, Anderson AC, et al. (2007) CD11b+Ly-6C(hi) suppressive monocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 179: 5228–5237.
- Ioannou M, Alissafi T, Lazaridis I, Deraos G, Matsoukas J, et al. (2012) Crucial role of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in the regulation of central nervous system autoimmune disease. *J Immunol* 188: 1136–1146.
- Zhang W, Liang S, Wu J, Horuzko A (2008) Human inhibitory receptor immunoglobulin-like transcript 2 amplifies CD11b+Gr1+ myeloid-derived suppressor cells that promote long-term survival of allografts. *Transplantation* 86: 1125–1134.
- Dugast AS, Haudebourg T, Coulon F, Heslan M, Haspot F, et al. (2008) Myeloid-derived suppressor cells accumulate in kidney allograft tolerance and specifically suppress effector T cell expansion. *J Immunol* 180: 7898–7906.
- De Wilde V, Van Rompaey N, Hill M, Lebrun JF, Lemaitre P, et al. (2009) Endotoxin-induced myeloid-derived suppressor cells inhibit alloimmune responses via heme oxygenase-1. *Am J Transplant* 9: 2034–2047.
- Garcia MR, Ledgerwood L, Yang Y, Xu J, Lal G, et al. (2010) Monocytic suppressive cells mediate cardiovascular transplantation tolerance in mice. *J Clin Invest* 120: 2486–2496.
- Dilek N, Poirier N, Usal C, Martinet B, Blancho G, et al. (2012) Control of transplant tolerance and intragraft regulatory T cell localization by myeloid-derived suppressor cells and CCL5. *J Immunol* 188: 4209–4216.
- Wu T, Sun C, Chen Z, Zhen Y, Peng J, et al. (2012) Smad3-deficient CD11b(+)/Gr1(+) myeloid-derived suppressor cells prevent allograft rejection via the nitric oxide pathway. *J Immunol* 189: 4989–5000.
- Luan Y, Mosheir E, Menon MC, Wilson D, Woytovich C, et al. (2013) Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Accumulate in Renal Transplant Patients and Mediate CD4(+) Foxp3(+) Treg Expansion. *Am J Transplant* 13: 3123–3131.
- Leslie M (2011) Immunology. Regulatory T cells get their chance to shine. *Science* 332: 1020–1021.
- Adegebe D, Serafini P, Bronte V, Zoso A, Ricordi C, et al. (2011) In vivo induction of myeloid suppressor cells and CD4(+)Foxp3(+) T regulatory cells prolongs skin allograft survival in mice. *Cell Transplant* 20: 941–954.
- Turnquist HR, Zhao Z, Rosborough BR, Liu Q, Castellana A, et al. (2011) IL-33 expands suppressive CD11b+ Gr-1(int) and regulatory T cells, including ST2L+ Foxp3+ cells, and mediates regulatory T cell-dependent promotion of cardiac allograft survival. *J Immunol* 187: 4598–4610.
- Rossner S, Voigtlander C, Wiethe C, Hanig J, Scifarth C, et al. (2005) Myeloid dendritic cell precursors generated from bone marrow suppress T cell responses via cell contact and nitric oxide production in vitro. *Eur J Immunol* 35: 3533–3544.
- Zhou Z, French DL, Ma G, Eisenstein S, Chen Y, et al. (2010) Development and function of myeloid-derived suppressor cells generated from mouse embryonic and hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 28: 620–632.
- Chou HS, Hsieh CC, Charles R, Wang L, Wagner T, et al. (2011) Myeloid-Derived Suppressor Cells Protect Islet Transplants By B7-H1 Mediated Enhancement of T Regulatory Cells. *Transplantation*.
- Guan Q, Moreno S, Qing G, Weiss CR, Lu L, et al. (2013) The role and potential therapeutic application of myeloid-derived suppressor cells in TNBS-induced colitis. *J Leukoc Biol* 94: 803–811.
- Nefedova Y, Huang M, Kusmartsev S, Bhattacharya R, Cheng P, et al. (2004) Hyperactivation of STAT3 is involved in abnormal differentiation of dendritic cells in cancer. *J Immunol* 172: 464–474.
- Eruslanov E, Daurkin I, Ortiz J, Vieweg J, Kusmartsev S (2010) Pivotal Advance: Tumor-mediated induction of myeloid-derived suppressor cells and M2-polarized macrophages by altering intracellular PGE(2) catabolism in myeloid cells. *J Leukoc Biol* 88: 839–848.
- Marigo I, Bosio E, Solito S, Mesa C, Fernandez A, et al. (2010) Tumor-induced tolerance and immune suppression depend on the C/EBPbeta transcription factor. *Immunity* 32: 790–802.

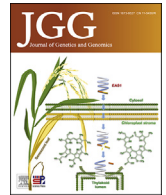
33. Lechner MG, Liebertz DJ, Epstein AL (2010) Characterization of cytokine-induced myeloid-derived suppressor cells from normal human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol* 185: 2273–2284.
34. Harbers SO, Crocker A, Catalano G, D'Agati V, Jung S, et al. (2007) Antibody-enhanced cross-presentation of self antigen breaks T cell tolerance. *J Clin Invest* 117: 1361–1369.
35. Colonna L, Catalano G, Chew C, D'Agati V, Thomas JW, et al. (2011) Therapeutic targeting of Syk in autoimmune diabetes. *J Immunol* 185: 1532–1543.
36. Obermajer N, Muthuswamy R, Lesnock J, Edwards RP, Kalinski P (2011) Positive feedback between PGE2 and COX2 redirects the differentiation of human dendritic cells toward stable myeloid-derived suppressor cells. *Blood* 118: 5498–5505.
37. Tomihara K, Guo M, Shin T, Sun X, Ludwig SM, et al. (2010) Antigen-specific immunity and cross-priming by epithelial ovarian carcinoma-induced CD11b(+)Gr-1(+) cells. *J Immunol* 184: 6151–6160.
38. Yi H, Guo C, Yu X, Zuo D, Wang XY (2012) Mouse CD11b+Gr-1+ myeloid cells can promote Th17 cell differentiation and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 189: 4295–4304.
39. Brennan TV, Tang Q, Liu FC, Hoang V, Bi M, et al. (2011) Requirements for prolongation of allograft survival with regulatory T cell infusion in lymphosufficient hosts. *J Surg Res* 169: e69–75.
40. Schmidt K, Zilio S, Schmollinger JC, Bronte V, Blankenstein T, et al. (2013) Differently immunogenic cancers in mice induce immature myeloid cells that suppress CTL in vitro but not in vivo following transfer. *Blood* 121: 1740–1748.
41. Sade-Feldman M, Kanterman J, Ish-Shalom E, Elnekave M, Horwitz E, et al. (2013) Tumor necrosis factor-alpha blocks differentiation and enhances suppressive activity of immature myeloid cells during chronic inflammation. *Immunity* 38: 541–554.
42. Ribechini E, Greifenberg V, Sandwick S, Lutz MB (2009) Subsets, expansion and activation of myeloid-derived suppressor cells. *Med Microbiol Immunol* 199: 273–281.
43. Highfill SL, Rodriguez PC, Zhou Q, Goetz CA, Koehn BH, et al. (2010) Bone marrow myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) inhibit graft-versus-host disease (GVHD) via an arginase-1-dependent mechanism that is up-regulated by interleukin-13. *Blood* 116: 5738–5747.
44. Tang Q, Bluestone JA, Kang SM (2011) CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cell therapy in transplantation. *J Mol Cell Biol* 4: 11–21.
45. Nagaraj S, Youn JL, Gabrilovich DI (2013) Reciprocal relationship between myeloid-derived suppressor cells and T cells. *J Immunol* 191: 17–23.
46. Pan PY, Ma G, Weber KJ, Ozao-Choy J, Wang G, et al. (2010) Immune stimulatory receptor CD40 is required for T-cell suppression and T regulatory cell activation mediated by myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Cancer Res* 70: 99–108.
47. Centuori SM, Trad M, LaCasse CJ, Alizadeh D, Larmonier CB, et al. (2012) Myeloid-derived suppressor cells from tumor-bearing mice impair TGF-beta-induced differentiation of CD4+CD25+FoxP3+ Tregs from CD4+CD25–FoxP3– T cells. *J Leukoc Biol* 92: 987–997.
48. Kurts C, Heath WR, Carbone FR, Allison J, Miller JF, et al. (1996) Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo. *J Exp Med* 184: 923–930.
49. Hogquist KA, Jameson SC, Heath WR, Howard JL, Bevan MJ, et al. (1994) T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76: 17–27.

- B. Annexe II : Article accepté (sous la forme de « proof » avant publication) dans *Journal of Genetics and Genomics*, « Generation of a double KO mouse by simultaneous targeting of neighboring genes using CRISPR/ Cas9 : a simple guide from design to genotyping » (Lemoine et al. 2016)**



Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Genetics and Genomics

journal homepage: [www.journals.elsevier.com/journal-of-genetics-and-genomics/](http://www.journals.elsevier.com/journal-of-genetics-and-genomics/)

## Method

# Generation of a double KO mouse by simultaneous targeting of the neighboring genes *Tmem176a* and *Tmem176b* using CRISPR/Cas9: Key steps from design to genotyping

Q5

Q4 Aurélie Lemoine<sup>a</sup>, Gaëlle Chauveau-Le Fric<sup>b</sup>, Francina Langa<sup>b</sup>, Cédric Louvet<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> INSERM UMR 1064, Center for Research in Transplantation and Immunology, Université de Nantes, CHU Nantes, Institut de Transplantation Urologie Néphrologie (ITUN), 44093 Nantes, France<sup>b</sup> Institut Pasteur, Plate-Forme Technologique Centre d'Ingénierie Génétique Murine, 25-28 rue du Dr. Roux, Paris 75724, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 5 January 2016

Received in revised form

26 March 2016

Accepted 4 April 2016

Available online xxx

## Keywords:

CRISPR/Cas9

C57BL/6

Double KO

Genotyping

NHEJ

Deletion

Inversion

Off-targets

Mosaicism

## ABSTRACT

The CRISPR/Cas9 system has been tailored to a revolutionary genetic tool because of its remarkable simplicity and efficacy. While complex genome editing in the mouse since the 1990's has been dominated by the use of embryonic stem (ES) cells, CRISPR/Cas9 now offers a versatile and fast approach to precisely modify virtually any DNA regions directly in mouse zygotes. Yet, this relative simplicity does not preclude a conscientious preparatory work that is often neglected when initiating a project. Here we describe the key steps leading to successful generation of a double knockout mouse by simultaneously targeting two homolog genes, *Tmem176a* and *Tmem176b*, which are located in the same genomic locus. Additionally, we show that similar efficiency can be obtained in a mixed genetic background or directly in the C57BL/6 inbred strain. Thus, presented as a detailed case study that should be helpful to the non-specialists, we focus on the genotyping strategy to anticipate the various possibilities.

Copyright © 2016, The Society of Chinese Scholars on Exercise Physiology and Fitness. Published by Elsevier (Singapore) Pte Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

The CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) system was discovered as a RNA-guided prokaryotic antiviral mechanism of adaptive immunity against viruses and plasmids that could be easily engineered (Jinek et al., 2012). The widely used and adapted type II CRISPR system involves a Cas9 nuclease from *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) that is guided by a 20-mer CRISPR RNA (crRNA) engineered in a chimeric single-guide RNA (sgRNA) (Jinek et al., 2012; Cong et al., 2013). Thus, the crRNA sequence simply needs to match a corresponding genomic DNA target sequence that lies next to the NGG protospacer adjacent motif (PAM). In other words, any region of interest can be theoretically targeted as far as two contiguous "G" are found. Additionally, new Cas9 orthologs are being identified and provide alternative PAMs (Ran et al., 2015), further extending the already

prodigious flexibility of this system. Whereas the 5' crRNA side of the sgRNA specifies the location of the cut, the 3' trans-activating crRNA (tracrRNA) side serves as a scaffold recruiting the Cas9 nuclease. The latter then induces a double-stranded break in DNA 3 bp upstream of the PAM. Point mutations, small deletions or insertions are generated through nonhomologous end-joining (NHEJ) mechanisms of repair and are often sufficient to disrupt open reading frames. Alternatively, codelivery of a donor DNA template can enable controlled sequence editing through homology-directed repair (HDR). Two simultaneous and proximal cuts add another layer of complexity regarding the possibilities of rearrangements as previously described (Wang et al., 2013; Xiao et al., 2013; Kraft et al., 2015; Wang et al., 2015; Zhang et al., 2015).

Here we aim to detail the key steps necessary to target two neighboring genes and successfully generate a double knock out (KO) mouse directly using the CRISPR/Cas9 system from 1-cell embryos. Besides sgRNA design and production, we particularly focus on the importance of anticipating the genotyping strategy. We targeted two homolog genes, *Tmem176a* and *Tmem176b*, which

Q1

\* Corresponding author.

E-mail address: [cedric.louvet@univ-nantes.fr](mailto:cedric.louvet@univ-nantes.fr) (C. Louvet).<http://dx.doi.org/10.1016/j.jgg.2016.04.004>

1673-8527/Copyright © 2016, The Society of Chinese Scholars on Exercise Physiology and Fitness. Published by Elsevier (Singapore) Pte Ltd. All rights reserved.

are located within the same genomic locus in an opposite direction (with the respective first coding exons only separated by 3.8 kb), probably arising from the duplication of a common ancestral gene (Louvét et al., 2005; Zuccolo et al., 2010). In addition to their structural similarities and amino-acid identities, they are tightly co-regulated in selected immune cells (Louvét et al., 2005; Condamine et al., 2010; Segovia et al., 2014) as well as in various non-hematopoietic tissues (Maeda et al., 2008; Ryu et al., 2010; Otsubo et al., 2014; Yano et al., 2014; Kang et al., 2015). Taken together, these findings strongly suggest that *Tmem176a* and *Tmem176b* could exhibit, at least partially, a redundant function. Thus, while single KO mice has been informative (Maeda et al., 2008; Segovia et al., 2014), it is likely that both genes should be simultaneously targeted to potentially reveal robust phenotypes. Traditional targeting in embryonic stem (ES) cells through two consecutive rounds of recombination would be complex and time-consuming. Contrastingly, the CRISPR/Cas9 system offers an attractive means to simultaneous targeting directly in mouse zygotes.

In our hands, from design to F<sub>0</sub> genotype screening, only 7–8 weeks, divided in three main phases, were necessary to obtain genetically modified mice carrying a germline with mutated allele of interest (Fig. 1). *In silico* search for potential crRNA target sequences within selected regions of interest were rapidly followed by *in vitro* validation and RNA production. CRISPR RNAs and Cas9 mRNA were then microinjected into mouse zygotes before implantation into pseudo-pregnant females. The last phase, genotyping, was determinant to unambiguously identify potential founders carrying one or more modified alleles. Whereas the second phase requires the competence of a transgenic mouse facility, the first and third phases can be easily achieved.

## 2. Results

### 2.1. Identification and validation of CRISPR target sequences

To simultaneously knock out *Tmem176a* and *Tmem176b*, we aimed to target the first coding exon of both genes (Fig. 2A). The selection of crRNA target sequences is obviously a crucial initial step that can be easily completed by choosing among numerous internet resources. We used the Zhang lab website (<http://crispr.mit.edu/>) and favored crRNA target sequences located in conserved regions between mouse and rat for the prospect of widening the possibilities of targeting multiple strains. Next, we separately cloned the crRNA sequences in a bicistronic plasmid allowing the expression of the respective chimeric sgRNAs along with the SpCas9 nuclease (Hsu et al., 2013; Ran et al., 2013). Efficiency of the specific

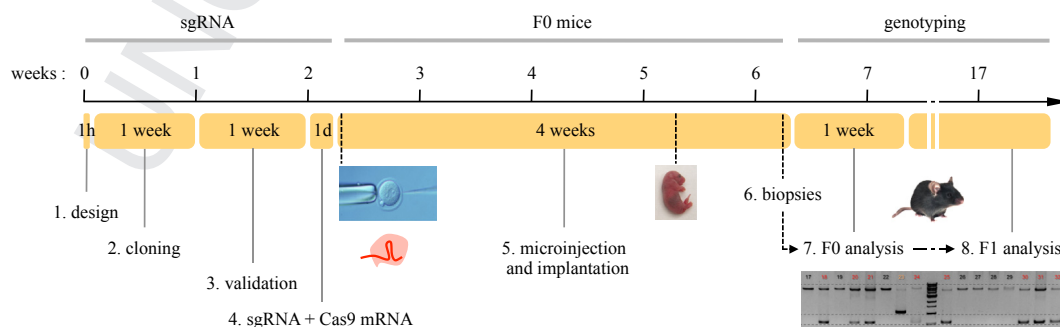
cleavages in transfected cells were then verified (data not shown) by using the T7 endonuclease I (T7E1) assay (explained in Fig. 3B). Validated 20-nt crRNA guide sequences are shown for *Tmem176b* and *Tmem176a* (Fig. 2B).

### 2.2. Production and optimization of sgRNAs

For *in vitro* production of sgRNA, T7 promoter was added by PCR amplification (Wang et al., 2013) to the crRNA target sequence followed by the scaffold (Fig. 2C). This product then served as a template for RNA transcription. Unexpectedly, contrary to *Tmem176a* sgRNA, we failed to produce *Tmem176b* sgRNA, probably because of a self-annealing potential formed over the T7 and *Tmem176b* crRNA target sequences (Fig. S1). Shorter crRNAs (<20 nt) have been shown to maintain their efficiency for genome editing while decreasing undesired off-target mutagenesis (Fu et al., 2014). Indeed, while 5'-end nucleotides are not crucial for full crRNA efficiency, they can compensate for mismatches at other positions thereby increasing undesired mutagenesis at some off-target sites. Truncated *Tmem176b* crRNA (Tru-crRNA) of 18 nt instead of 20 nt (Fig. 2B) eliminated the self-annealing problem and allowed the production of sgRNA. Alternatively, switching T7 by SP6 promoter along with a 19-nt crRNA target sequence was successful but relatively poor yields of sgRNA were recovered using this transcription system. A truncated version of *Tmem176a* crRNA (19 nt) was also produced using the T7 promoter. It is important to note that two additional guanine nucleotides at the 5' end are required for efficient transcription by T7 polymerase and, in fact, could even be beneficial to improve on-target specificity (Cho et al., 2014). Both 5' G were comprised in the *Tmem176a* target sequence whereas one of them remained unmatched for *Tmem176b* (Fig. 2C).

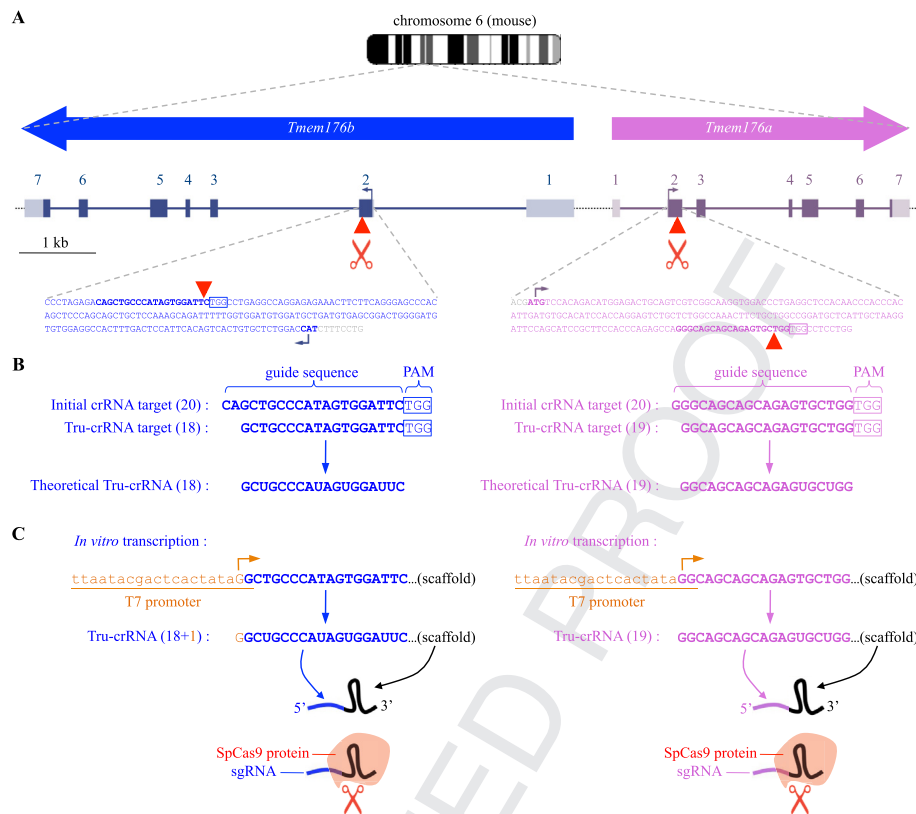
### 2.3. Microinjection of mouse embryos, implantation and genotyping

Along with purified *Tmem176a* and *Tmem176b* sgRNAs, we produced SpCas9 mRNA *in vitro* using the T7 promoter transcription system. These three components were microinjected together into one-cell mouse embryos (both pronuclear and cytoplasmic injections), at 10 ng/μL for each sgRNA and 20 ng/μL for SpCas9 mRNA. In order to maximize the number of mice to analyze, we first used B6D2 mixed genetic background embryos obtained from the intercross of B6D2F1 (DBA/2J × C57BL/6J) mice. Pseudo-pregnant females were implanted and a total of 81 (79 viable) newborns were obtained over 4 rounds of microinjections (providing 14, 18, 19 and 30 newborns, respectively). Genomic DNA samples were then prepared from the tails and genotyping of the *Tmem176a* and



**Fig. 1.** Timeline and key steps from design to genotyping for rapid generation of genetically modified mice using the CRISPR/Cas9 system. The process can be divided in three main phases: the generation of gene-specific sgRNA (steps 1–4), the microinjection of mouse zygotes and implantation into pseudo-pregnant females to obtain F<sub>0</sub> mice and biopsies (steps 5–6), and the identification of mice carrying mutated alleles of interest (steps 7–8). Importantly, F<sub>1</sub> mouse analysis (step 8) is the first stage where the genetic makeup of mutant animals can be unambiguously determined.





**Fig. 2.** Design and *in vitro* production of sgRNAs targeting *Tmem176a* and *Tmem176b* genes. **A:** Schematic representation of *Tmem176a/b* genomic locus in the mouse. For each gene, exons are shown (boxes) with untranslated (light) and coding (dark) regions. Arrow on exon 2 of each gene represents the start codon. The DNA sequences of the first coding exon are shown, including the respective selected guide sequences (bold) associated with the PAM (NGG, box). Red triangles indicate the positions of theoretical cuts. **B:** Initial 20-nt guide sequences and truncated (18 or 19 nt) versions (Tru-crRNAs) that are considered more sensitive to mismatches and thus more specific. **C:** *In vitro* transcription of the chimeric single guide RNA (sgRNA) including the Tru-gRNA sequence (specific to *Tmem176a* or *b*) followed by the scaffold RNA sequence (necessary for SpCas9 binding). A pair of guanines (GG) at the 5' end of the transcript is a constraint of the T7 promoter activity and could be fully (for *Tmem176a*) or partially (for *Tmem176b*) comprised in the specific guide sequence.

*Tmem176b* locus was performed for individual identification. The results of our genotype screening for 81 mice are detailed below. Analysis of “pure” C57BL/6N embryos was later performed using the same methodology and presented as a comparison in Table 1.

#### 2.4. Genotyping: NHEJ-mediated mutations

We designed primers allowing the amplification of the respective targeted sites for *Tmem176a* and *Tmem176b* (PCR A and PCR B) (Fig. 3A) and performed T7EI assay to detect mutations induced by NHEJ repair (principle explained in Fig. 3B). Of note, it is important to bear in mind that an absence of heteroduplex does not necessarily mean an absence of mutation, as illustrated in Fig. 3C. To overcome this limitation, we also performed this screening by adding wild type (WT) PCR product to the tested samples. Accordingly, we detected such “hidden” mutated alleles eventually representing a substantial fraction (18.5%) of the total number of mutated alleles. Remarkably, mutated *Tmem176a* (a\*, exemplified in Fig. 3D) or *Tmem176b* (b\*) alleles were detected in 63% of the mice, with a large majority of mice carrying both mutations (57% compared to 4% and 2% for a\*-only and b\*-only mutated mice, respectively) (Table 1).

Detection of mice carrying a\* and b\* mutations on the same chromosome (as represented in Fig. 3A) is important for subsequent transmission to the progeny. To this end, we designed primers spanning each CRISPR site (primers A\* and B\*). The

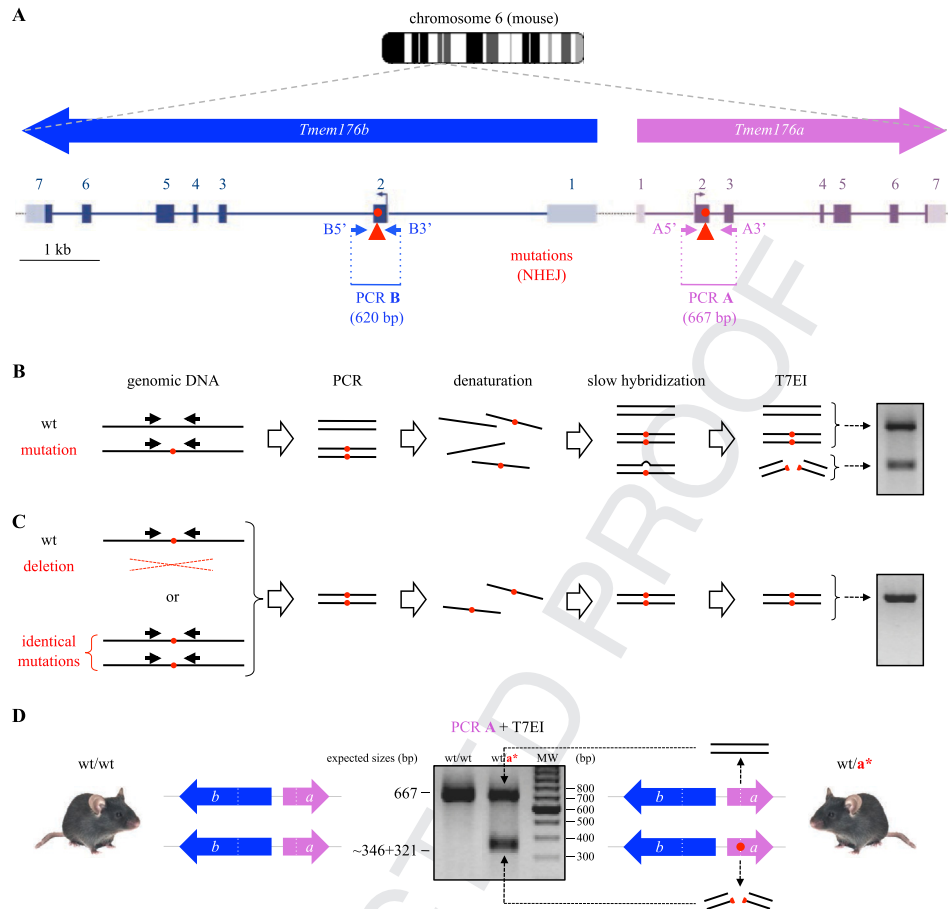
resulting PCR (PCR B\*A\*, not shown) is positive only if one chromosome is left intact for both genes while the other chromosome carries both a\* and b\* mutations. Although this strategy excludes mice with mutations on both chromosomes (for at least one allele), it could bypass the need and time necessary for backcrossing too many mice in order to spot potential “same-allele” founders. However, the most definitive approach remains to mate each mutant of interest with a WT mouse and screen the progeny for the transmission of both mutations.

Sequencing is required to identify mutations inducing open reading frame disruption and/or generating a premature stop codon. Unfortunately, among the selected mice that we analyzed, we only found 3-nt or 6-nt deletion events, resulting in the deletion of at least one amino acid and the possible alteration of adjacent amino acids but no further alteration of the open reading frame.

Thus, identification of mice carrying a desired mutated allele is complicated by the relatively painstaking genotyping analysis required to pinpoint a correct combination. In parallel, we turned our attention to two other possible modifications of the *Tmem176a/b* locus: deletion and inversion of the region between the two targeted sites.

#### 2.5. Genotyping: large deletion

Predictable deletion of a fragment between two targeted sites has been previously and repeatedly reported (Wang et al., 2013;



**Fig. 3.** Genotyping strategy to detect NHEJ-mediated mutations in *Tmem176a* and *Tmem176b* exons. **A:** PCR primers were designed to amplify the targeted sites on each gene. **B:** Schematic representation of the T7 endonuclease I (T7EI) assay performed on PCR A or B to detect heteroduplexes resulting from NHEJ-mediated mutation. **C:** T7EI assay will remain negative if only one allele (mutated or not) is amplified or if both alleles exhibit the exactly same mutation (which is the case for homozygous mice after intercrossing for example). Systematic addition of WT PCR product to the tested sample followed by a short step of denaturation/annealing before T7EI assay can bypass this limitation by revealing such “hidden” mutations. **D:** Typical genotyping results on a WT mouse and a mouse carrying a mutated *Tmem176a* allele (a\*). Likewise, the T7EI assay needs to be performed on PCR B to determine whether *Tmem176b* is also mutated (b\*) in the same mouse. MW: molecular weight marker.

**Table 1**  
Statistics of the generation of *Tmem176a/b* double knockout mice using the CRISPR/Cas9 system.

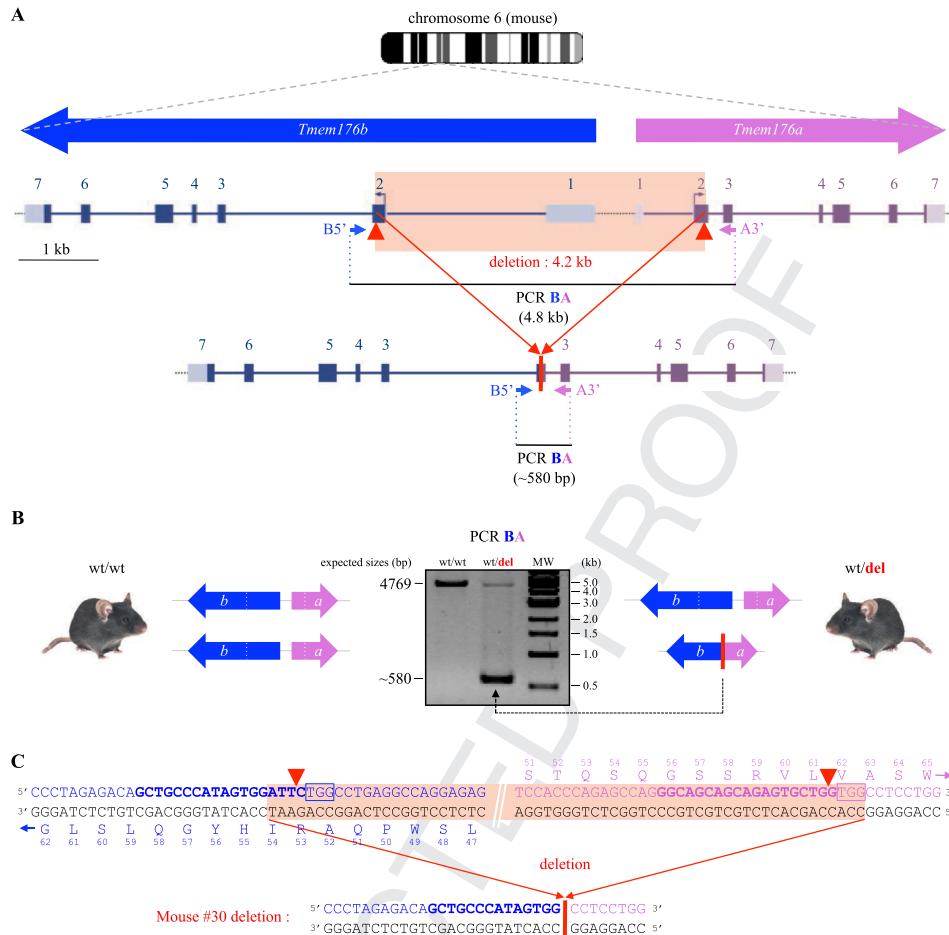
Genetic background	B6D2	C57BL/6N
Injected embryos	890 (100%)	690 (100%)
Implanted viable embryos	375 (42.1%)	346 (50.1%)
Newborns	81 (9.1%)	36 (5.2%)
Viable weaned pups	79 (8.9%)	32 (4.6%)
Analyzed pups	81 (100%)	36 (100%)
≥1 modified allele	60 (74%)	29 (81%)
a* only	3 (4%)	3 (8%)
b* only	2 (2%)	3 (8%)
a* and b*	46 (57%)	16 (44%)
del	33 (41%)	14 (39%)
inv	18 (22%)	7 (19%)
Detected mosaicism	34 (42%)	10 (33%)

Xiao et al., 2013; Kraft et al., 2015; Wang et al., 2015; Zhang et al., 2015). The two CRISPR target sites are separated by 4.2 kb. This region could be amplified by combining the forward primer of PCR B (primer B5') and the reverse primer of PCR A (primer A3'), resulting in a 4.8-kb product (PCR BA) (Fig. 4A). We anticipated that deletion of this region should lead to a drastically reduced product of ~580 bp for PCR BA (Fig. 4A). Strikingly, we detected this large deletion (exemplified in Fig. 4B) in 33 mice (41%) (Table 1).

Sequencing of the 0.6-kb PCR BA product confirmed that the exons 2 of *Tmem176a* and *Tmem176b* were joined, thereby excluding the start codon and the beginning of the protein sequence of each gene as well as the central intergenic region presumably important for the transcriptional activity of this locus. More precisely, we did not find nucleotide insertion in the junction. Rather, 3- to 9-nt deletions on *Tmem176b* side and no or 1- to 4-nt deletions on *Tmem176a* side were observed (deletion sizes were calculated from the theoretical cut which is located one base before the PAM in the CRISPR target sequence). Fig. 4C shows an example of sequencing analysis of the junction in a deleted allele. Smaller deletions were observed using PCR BA but only in 2 mice (2.5%). We also designed PCR primers to amplify a broader region from exon 3 of *Tmem176b* to exon 4 of *Tmem176a* (PCR “Big BA”, not shown in the figure, 7.6 kb on WT allele and 3.3 kb if deletion) that confirmed the deletions already detected by PCR BA but did not reveal larger deletion.

## 2.6. Genotyping: large inversion

We aimed to determine whether inversion rather than deletion of the region between the two target sites could occur. To this end, we combined either the forward primers (PCR FF: primers B5'+A5') or the reverse primers (PCR RR: primers B3'+A3') of PCR B and A (Fig. 5A). We detected this inversion (exemplified in Fig. 5B) in 18



**Fig. 4.** Genotyping strategy to detect deletion of the region between *Tmem176a* and *Tmem176b* target sites. **A:** The forward primer of PCR B and the reverse primer of PCR A were combined (PCR BA) to amplify a 4.8-kb amplicon from a wt allele. A PCR product of <0.6 kb reveals a deletion of the region between the two target sites (red box). **B:** Typical genotyping results on a WT mouse and a mouse carrying an allele with a deletion (del). MW: molecular weight marker. **C:** Theoretical sequence of the junction after deletion and actual sequence of deleted allele from mouse #30: 3 nt and 4 nt were deleted on *Tmem176b* and *Tmem176a* sides, respectively, from the theoretical cuts (red triangles).

mice (22%) (Table 1). In this configuration, the transcription of chimeric mRNAs (*Tmem176a–b* and *Tmem176b–a*) is possible but chimeric proteins will be produced only if the respective open reading frames are preserved over the junctions. Fig. 5C shows an example of sequencing analysis of the junctions in an inverted allele. In this case, the open reading frames are not compatible on both sides and may only lead to the translation of irrelevant amino acids following a short N-terminal portion of each protein encoded by *Tmem176a* and *Tmem176b*.

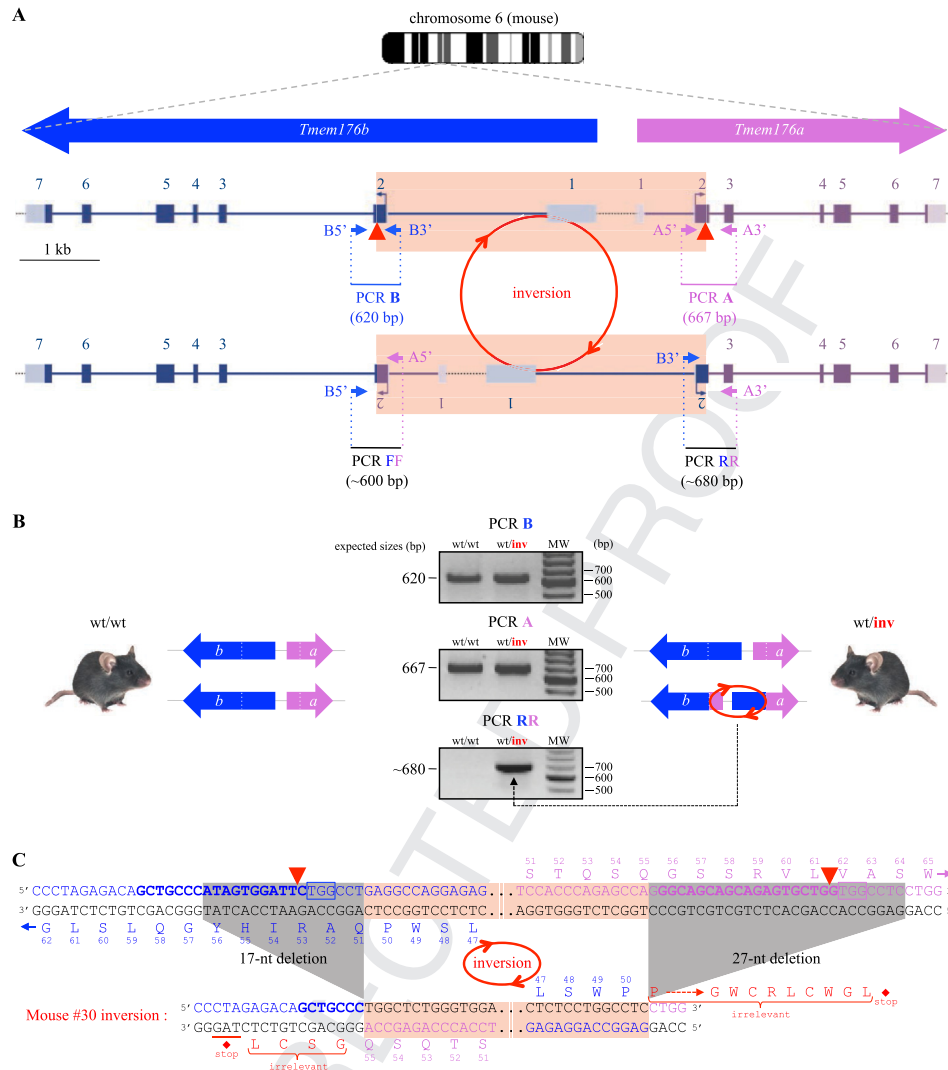
### 2.7. Genotyping: combining the possibilities

Thus, based on the results of four different PCRs ( $\pm$ T7E1 assay) we could establish a genotype for each of the 81 analyzed mice. A summary of the different mutation outcomes and the corresponding genotyping strategies is depicted in Fig. S2. Fig. 6 shows the results and interpretation of 11 representative mice. Fifteen mice (18.5%) exhibited only mutated alleles (i.e., a\* or/and b\* but no del or inv alleles) as illustrated by mice #44, #41, #40 and #51. Of note, among these four mice, only mouse #51 appeared to carry both mutations on the same chromosome. A substantial proportion of mice exhibited a deleted (41%, 30% with deletion and no inversion) or an inverted (22%, 11% with inversion and no deletion) allele and 11% of the mice displayed both alleles. It is interesting to note that some mice carrying a deleted allele along with an inverted

allele (mouse #63) or two deleted alleles (mouse #37) were also negative for PCR B and A and, thus, likely represented biallelic double KO mice. This strongly suggested that *Tmem176a* and *Tmem176b* double deficiency is not lethal.

Importantly, in the majority of mice carrying a deleted (mouse #65), an inverted allele (mouse #49) or both (mouse #30), the remaining “normal-appearing” alleles were confirmed to be WT by addition of WT PCR products (PCR A or B) before T7E1 assay. However, as stated before, a significant number of “hidden” mutated alleles were revealed following this approach. Thus, for mice apparently carrying non-mutated alleles, a second round of screening should be systematically performed by addition of WT PCR products before heteroduplex detection assay (Fig. S2). Furthermore, those “hidden” mutations can be easily confirmed by sequencing.

Finally, we detected 34 mosaic mice (42%) that clearly displayed three different allelic possibilities. For example, in mouse #45 that showed a deleted allele, we detected a\* and b\* mutations (without addition of WT DNA) thus implying the presence of a third non-mutated (or differently mutated) allele. Another example of obvious mosaicism is mouse #30 that showed both deleted and inverted alleles along with positive PCR A and B for which amplification is impossible from del or inv alleles, indicating the presence of a third “normal-appearing” (WT in this case) allele.



**Fig. 5.** Genotyping strategy to detect inversion of the region between *Tmem176a* and *Tmem176b* target sites. **A:** To reveal an inversion of the region between the two target sites, the reverse primers of PCR B and A were combined (PCR RR). Alternatively, the forward primers could also be combined (PCR FF). Both PCRs are negative in WT mice. **B:** Typical genotyping results on a WT mouse and a mouse carrying an allele with an inversion (inv). MW: molecular weight marker. **C:** Sequence of inverted allele from mouse #30 compared to WT sequence. For the sake of clarity, both DNA strands are shown. Inversion of the large 4.2 kb fragment (red box) was confirmed along with deletions (gray) of 17 and 27 nt on both sides. These deletions occurred in both directions from the theoretical cut (red triangles). In this allele, open reading frames are not compatible and only the first 55 (for *Tmem176a*) and 50 (for *Tmem176b*) amino acids remain potentially translated and are followed by 4–10 irrelevant amino acids and premature stop codons.

## 2.8. Founder selection

Given the relatively important number of detected mosaic mice, it was important to identify germline alleles of interest that could then be transmitted to the progeny. We decided to cross five  $F_0$  mice (four females and one male) with C57BL/6J mice. They all had at least the deleted allele which seemed the most promising in terms of KO potential. Two of these mice were mosaic, including mouse #30. Only three of these breeding rapidly produced viable pups (mice #8, #18 and #30). However, the deleted allele was transmitted from all those three  $F_0$  mice (Fig. S3). For the mosaic mice #8 and #30, an inverted allele and a WT allele were not transmitted, respectively. In fact, even if an animal does not appear mosaic, which is the case of mouse #18, it cannot be excluded and transmission of any allele of interest to the progeny must be certified. Thus,  $F_1$  mouse analysis constitutes an essential and final step (step 8 in Fig. 1) to definitively characterize a mutant line.

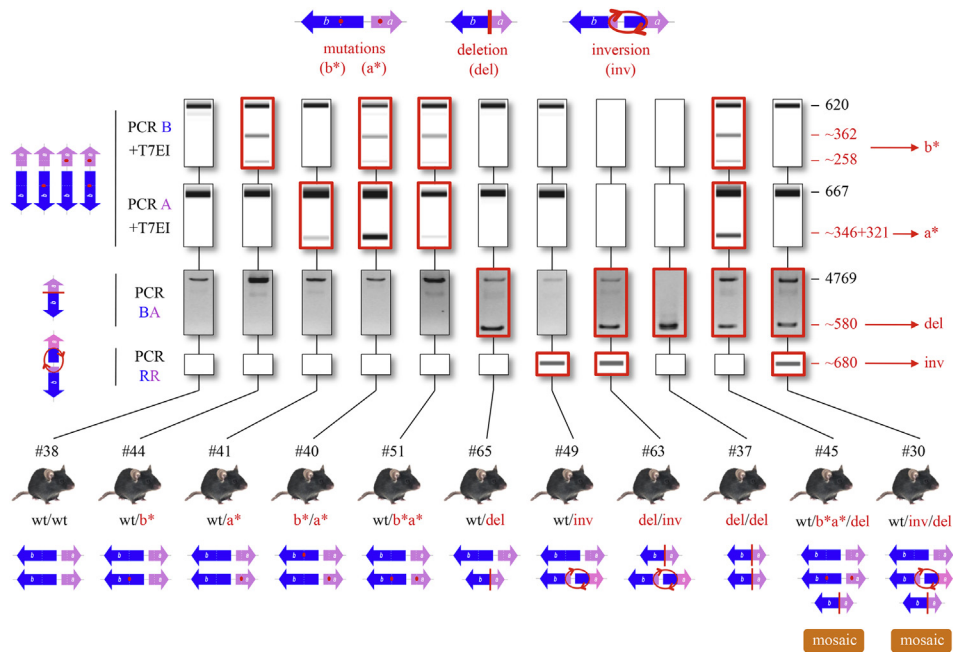
We chose to further investigate the deleted allele from mouse

#30 (del30). Further intercrossing allowed the generation of homozygous mice carrying the deletion. Importantly, *Tmem176a* and *Tmem176b* mRNA expression was not detected by RT-PCR in the blood of these mice (using primers targeting untouched exons 5/7 of each gene) whereas these PCRs were positive with WT blood cells (data not shown). *Gapdh* expression served as positive control for all cDNA samples.

Taken together, these results indicated that the allele del30 could be transmitted to the progeny and abolished the transcription of both *Tmem176a* and *Tmem176b*.

## 2.9. Generation of a *Tmem176a/b* double KO mouse directly in the C57BL/6 genetic background

The B6D2 (DBA/2J  $\times$  C57BL/6J) mixed genetic background onto which the del30 mouse was generated brings the problem of phenotypic variability that could hinder the elucidation of *Tmem176a* and *Tmem176b* function. Backcrossing onto the C57BL/6J



**Fig. 6.** Representative examples of mouse genotyping for the modifications of the *Tmem176a/b* genomic locus. Diverse combinations of modifications ( $b^*$ ,  $a^*$ , del or inv) from 11 mice are shown. Concomitant analysis of PCR BA and RR (or FF) as well as T7EI assays on PCR A and B allows to establish the genotype of each mouse for the *Tmem176a/b* locus. Mosaicism can be easily detected as exemplified by mice #45 and #75. However, other mice such as mice #41 and #51 can also be suspected of mosaicism with regard to the relatively lower intensity of the bands of the T7EI assay of PCR A. PCR B and A (+T7EI) as well as PCR RR were analyzed here by capillary electrophoresis.

inbred background would progressively allow a relative genetic homogeneity but is time-consuming and does not exclude potential passenger polymorphisms in the regions flanking *Tmem176a/b* locus (if del30 originates from the DBA/2 DNA strand). Thus, we decided to generate a double KO mouse directly in the C57BL/6N genetic background. As expected, substantially less viable pups were obtained and 36 mice were eventually analyzed. As shown in Table 1, very similar proportions of the distinct modified alleles were detected when compared with the B6D2 mixed genetic background. Notably, 14 mice (39%) exhibited the deleted allele.

### 2.10. Off-targets

The CRISPR/Cas9 system can lead to undesired off-target (OT) cleavage and inherent mutations. To identify potential OT sites, we used the CRISPR/Cas9 target online predictor (CCTop, <http://crispr.cos.uni-heidelberg.de>) that allows analysis of truncated crRNA target sequences (Stemmer et al., 2015). For each Tru-crRNA, we designed PCR primers for the four most likely predicted OTs. We decided to narrow down OT analysis to seven mice: the B6D2 mixed genetic background  $F_0$  mouse #30 ( $F_0$ #30), a mouse carrying the del30 allele (BC5.del30) from the mouse  $F_0$ #30 and resulting from 5 backcrosses onto the C57BL/6J background and five “pure” C57BL/6N  $F_0$  mice ( $F_0$ .B6#3,  $F_0$ .B6#4,  $F_0$ .B6#28,  $F_0$ .B6#30,  $F_0$ .B6#34), all carrying a deleted allele. The genotype analysis of these mice showed that only one  $F_0$  mouse appeared non-mosaic ( $F_0$ .B6#4) (Table 2). As shown in Fig. S4, T7EI assays were all negative for the tested *Tmem176a* OTs (A-OT1, 2, 3 and 4). In contrast, for *Tmem176b* OTs, while B-OT1, 2 and 3 were negative for all tested mice, we could detect the formation of heteroduplexes for B-OT4 in three “pure” C57BL/6N  $F_0$  mice ( $F_0$ .B6#3,  $F_0$ .B6#30 and  $F_0$ .B6#34). Because the genetic background is pure, these events cannot result from the presence of polymorphisms (that could occur in mixed genetic background) and can clearly be attributed to undesired OT

cleavages mediated by the *Tmem176a*-specific sgRNA. Thus, although we cannot exclude other potential OTs, these results suggest that the mice  $F_0$ .B6#4 and  $F_0$ .B6#34 should be preferentially used as founders, which provided that the alleles of interest (notably the deleted allele) are transmitted to the progeny.

### 3. Discussion

The CRISPR/Cas9 system will undoubtedly speed up the generation of genetically modified animal models that are central to elucidate gene functions. Compared to meganucleases, zinc-finger nucleases (ZFNs) or transcription activator-like effector nucleases (TALENs), this relatively simple RNA-guided system exhibits a remarkable versatility for complex editing and targeting of simultaneous loci. Within a few weeks, we could generate genetically modified mice carrying germline mutated alleles of interest by simultaneously targeting two neighboring genes, *Tmem176a* and *Tmem176b*. Given the high rate of modified alleles that can be obtained, the strain of interest (C57BL/6N here) should be directly used to avoid fastidious backcrossing.

We found that the large deletion of the fragment between the two sites represented a relatively easy event to detect and was associated with a complete KO of *Tmem176a* and *Tmem176b* expression (in homozygous mice). Of note, an inverted allele in which the open reading frames are not disrupted could also represent an interesting material to study the effect of the resulting “chimeric” structural change of the two proteins. Importantly, we could obtain a significant number of “pure” C57BL/6N  $F_0$  mice carrying a large deletion. However, the finding that a mutated OT (B-OT4) could be detected in several mice reinforces the issue of undesired genomic editions using the CRISPR/Cas9 system. Although this OT is located in an intergenic region, precautions will be taken for its elimination through backcrossing. Furthermore, we will examine more potential OTs, with particular emphasis on OTs



**Table 2**  
Detected alleles, mosaicism and off-targets of selected mice.

Mouse	T7EI assays <sup>a</sup>				PCR RR	PCR BA	Detected <sup>b</sup> alleles 1/2/3	Mosaic	Detected OT
	PCR B	+WT	PCR A	+WT					
WT	b	b	a	a	–	–	wt/wt	–	–
F <sub>0</sub> #30	b	b	a	a	inv	del	wt/inv/del	Mosaic	–
BC5.del30	b	b	a	a	–	del	wt/del	–	–
F <sub>0</sub> .B6#3	b*	b*	a*	a*	–	del	wt/b*a*/del	Mosaic	A-OT4
F <sub>0</sub> .B6#4	b	b	a	a	–	del	wt/del	–	–
F <sub>0</sub> .B6#28	b*	b*	a*	a*	–	del	wt/b*a*/del	Mosaic	–
F <sub>0</sub> .B6#30	b	b*	a	a*	inv	del	b*a*/inv/del	Mosaic	A-OT4
F <sub>0</sub> .B6#34	b	b*	a	a*	inv	del	b*a*/inv/del	Mosaic	A-OT4

<sup>a</sup> T7EI assay was performed directly first on PCR A and B products from indicated mice and then mixing each PCR with corresponding WT PCR (+WT).

<sup>b</sup> Allele detection results from the analysis of indicated PCRs and T7EI assays. Mutations (b\* and a\*) of mice F<sub>0</sub>.B6#30 and #34 could only be detected after addition of WT PCR products. For the sake of clarity, we state here that b\* and a\* mutations are located on the same chromosome in mosaic mice F<sub>0</sub>.B6#3 and #28, which is likely but remains to be determined by analyzing the progeny of these mice. WT: wild type, inv: large inversion, del: large deletion, OT: off-target.

relatively close to the on-target sites that would make segregation more difficult or impossible through backcrossing.

Based on our experience and the data presented here, we propose to briefly highlight four decisive points that should be considered when initiating a project aiming at generating genetically modified mice using the CRISPR/Cas9 system and avoid the main drawbacks, especially with two proximal cuts.

- I. **Working genomic region:** The region of interest should be well defined in terms of gene orientation, exon organization, isoforms or potential polymorphisms in order to increase the chances of optimal and complete genomic modification.
- II. **Genotyping strategy:** A limited set of PCRs around the targeted sites should be carefully designed and validated prior to genotyping F<sub>0</sub> mice, notably in the context of simultaneous targeting of two sites, to anticipate the main expected modifications (mutations, large deletions, inversions).
- III. **On/off targets:** Different crRNA target sequences should be selected and tested for their on-target but also OT potentials (ideally all with up to 3 mismatches) with special attention to OTs relatively close to the on-target site. However, this approach cannot strictly exclude the possibilities of unpredicted OTs. In this regard, unbiased methods for detecting OTs have been reported (Bolukbasi et al., 2015). Finally, to reduce off-target activity, truncated sgRNAs (Fu et al., 2014) but also the recently reported modified Cas9 proteins (Kleinstiver et al., 2016; Slaymaker et al., 2016) can be considered.
- IV. **Mosaicism:** F<sub>0</sub> mosaic mice are the rule rather than the exception, as previously reported with mouse zygotes (Yen et al., 2014). For any allele of interest, it is thus particularly important to confirm germline transmission to the progeny. Therefore, F<sub>1</sub> mouse analysis is the first stage where the genetic makeup of mutant animals can be unambiguously determined. Because of its short life time within cells, delivery of recombinant Cas9 protein, rather than mRNA or expression plasmid, may help reduce mosaicism (Kim et al., 2014; Ramakrishna et al., 2014; Menoret et al., 2015).

## 4. Materials and methods

### 4.1. Mice and zygote microinjection

B6D2F1 (DBA/2J × C57BL/6J), C57BL/6J and C57BL/6N mice were purchased from JANVIER LABS (France). B6D2 mixed genetic background embryos were obtained from the intercross of B6D2F1

mice. All animals were first hosted at the Institut Pasteur animal facility (Paris, France) and received human care according to the criteria outlined in the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”. Experimental procedures were carried out in accordance with French government regulations. One-cell stage mouse embryos from superovulated mice were microinjected by standard procedures (Behringer et al., 2014). Mice generated from CRISPR/Cas9-injected zygotes were genotyped and a selection of mice (20 with B6D2 mixed background and 12 with “pure” C57BL/6N background) were then transferred to the ITUN – INSERM 1064 animal facility (Nantes, France), kept under specific pathogen-free conditions and treated according to institutional guidelines for animal care and use.

### 4.2. sgRNA constructions and Cas9 mRNA

A pair of oligonucleotides (Table S1) for each CRISPR site was annealed and ligated to the bicistronic expression vector PX330 digested with *Bbs* I for co-expression of Cas9 and sgRNA. PX330-U6-Chimeric\_BB-CBh-hSpCas9 was a gift from Feng Zhang (Addgene plasmid #42230). After validation in transfected cells (C6 cell line, Sigma, USA) using the T7EI assay as previously described (Menoret et al., 2015), T7 (or SP6) promoter was added to each sgRNA template by PCR amplification using the primers (Table S2). The T7-sgRNA PCR products were gel purified using RNeasy mini kit (Qiagen, Germany) and used as template for *in-vitro* transcription using MEGAscript T7 kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Alternatively, for SP6 template, we used SP6 mMACHINE mMACHINE SP6 kit (Thermo Fisher Scientific). A Pme I-digested Cas9 expression vector (Addgene plasmid #43861, provided by Keith Joung) was used as template for Cas9 mRNA transcription using mMACHINE mMACHINE T7 ULTRA kit (Thermo Fisher Scientific) as previously described (Menoret et al., 2015). After purification, sgRNAs (~100 bases) and Cas9 mRNA (>4.2 kb including poly-A tail) were quantitated using NanoDrop-1000 (Thermo Fisher Scientific), checked by agarose gel electrophoresis and then aliquoted and stored at –80 °C until use.

### 4.3. Mouse genotyping

Mouse genomic DNA was extracted from tail biopsy following treatment with proteinase K as previously described (Tesson et al., 2010). Genotyping of the *Tmem176a/b* locus was performed by PCR with a high-fidelity polymerase (Herculase II fusion polymerase, Agilent Technologies, USA) using a combination of primers listed in Table S3. NHEJ-mediated mutations were analyzed using the T7 endonuclease I (T7EI) assay as previously described (Menoret et al.,

2013) (and explained in Fig. 3B) on PCRs A and B and direct sequencing. PCR products were analyzed by agarose gel or capillary electrophoresis (Caliper LabChip GX, PerkinElmer, USA), the latter providing heteroduplex detection without the need for T7EI assay (Ansaï et al., 2014) (Chenouard et al., 2016).

#### 4.4. RT-PCR

Blood cells were collected by centrifugation and treated with ammonium chloride to remove erythrocytes. Total RNA from the remaining peripheral blood leukocytes was isolated using RNeasy Mini Kit following manufacturer's instructions (Qiagen). Reverse transcription was performed using M-MLV Reverse Transcriptase and random primers following manufacturer's instructions (Invitrogen). *Tmem176a*, *Tmem176b* or *Gapdh* gene expression was assessed by PCR using specific primers listed in Table S4, all designed over different exons to exclude amplification of genomic DNA.

#### 4.5. Off-target analysis

Potential OTs of the selected truncated CRISPR RNAs were identified (Table S5) using the CRISPR/Cas9 target online predictor (CCTop, <http://crispr.cos.uni-heidelberg.de>) and then analyzed using specific PCR primers (Table S6).

#### Acknowledgments

This work was supported by the Labex IGO project (n° ANR-11-LABX-0016-01) funded by the "Investissements d'Avenir" French Government program, managed by the French National Research Agency (ANR). This work was realized in the context of the IHU-Cesti project which received French government financial support managed by the National Research Agency via the "Investment Into The Future program" ANR-10-IBHU-005. The IHU-Cesti project was also supported by Nantes Métropole and région Pays de la Loire. CL was supported by Fondation Progrefe. We would like to thank Ilta Lafosse and Carine Mogneu (CIGM, Institut Pasteur) for technical assistance in CRISPR microinjection experiments and animal husbandry; Claire Usal, Emmanuel Merieau and Chad Lemee for mouse housing; Laurent Tesson, Vanessa Chenouard and Lucas Brusselle for their assistance and expertise on capillary electrophoresis; Ignacio Anegon for helpful discussions on this work.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgg.2016.04.004>.

#### References

- Ansaï, S., Inohaya, K., Yoshiura, Y., Schartl, M., Uemura, N., Takahashi, R., Kinoshita, M., 2014. Design, evaluation, and screening methods for efficient targeted mutagenesis with transcription activator-like effector nucleases in medaka. *Dev. Growth Differ.* 56, 98–107.
- Behringer, R., Gerstentein, M., Vintersten, K., Nagy, A., 2014. *Manipulating the Mouse Embryo: a Laboratory Manual*, fourth edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Bolukbasi, M.F., Gupta, A., Wolfe, S.A., 2015. Creating and evaluating accurate CRISPR-Cas9 scalpels for genomic surgery. *Nat. Methods* 13, 41–50.
- Chenouard, V., Brusselle, L., Heslan, J.-M., Remy, S., Ménoret, S., Usal, C., Ouisse, L.-H., Tuan, H.N., Ignacio, A., Tesson, L., 2016. A rapid and cost-effective method for genotyping genome-edited animals: a heteroduplex mobility assay using microfluidic capillary electrophoresis. *J. Genet. Genomics*.
- Cho, S.W., Kim, S., Kim, Y., Kweon, J., Kim, H.S., Bae, S., Kim, J.S., 2014. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res.* 24, 132–141.
- Condamine, T., Le Texier, L., Howie, D., Lavault, A., Hill, M., Halary, F., Cobbold, S., Waldmann, H., Cuturi, M.C., Chiffolleau, E., 2010. *Tmem176B* and *Tmem176A* are

- associated with the immature state of dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 88, 507–515.
- Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., Zhang, F., 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339, 819–823.
- Fu, Y., Sander, J.D., Reyon, D., Cascio, V.M., Joung, J.K., 2014. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat. Biotechnol.* 32, 279–284.
- Hsu, P.D., Scott, D.A., Weinstein, J.A., Ran, F.A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E.J., Wu, X., Shalem, O., Cradick, T.J., Marraffini, L.A., Bao, G., Zhang, F., 2013. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat. Biotechnol.* 31, 827–832.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., Charpentier, E., 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816–821.
- Kang, S., Tsai, L.T., Zhou, Y., Everetts, A., Xu, S., Griffin, M.J., Issner, R., Whitton, H.J., Garcia, B.A., Epstein, C.B., Mikkelsen, T.S., Rosen, E.D., 2015. Identification of nuclear hormone receptor pathways causing insulin resistance by transcriptional and epigenomic analysis. *Nat. Cell Biol.* 17, 44–56.
- Kim, S., Kim, D., Cho, S.W., Kim, J., Kim, J.S., 2014. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res.* 24, 1012–1019.
- Kleinstiver, B.P., Pattanayak, V., Prew, M.S., Tsai, S.Q., Nguyen, N.T., Zheng, Z., Joung, J.K., 2016. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature* 529, 490–495.
- Kraft, K., Geuer, S., Will, A.J., Chan, W.L., Paliou, C., Borschiwer, M., Harabula, I., Wittler, L., Franke, M., Ibrahim, D.M., Kragesteen, B.K., Spielmann, M., Mundlos, S., Lupianez, D.G., Andrey, G., 2015. Deletions, inversions, duplications: engineering of structural variants using CRISPR/Cas in mice. *Cell Rep.* 10, 833–839.
- Louvet, C., Chiffolleau, E., Heslan, M., Tesson, L., Heslan, J.M., Brion, R., Beriou, G., Guillonnet, C., Khalife, J., Anegon, I., Cuturi, M.C., 2005. Identification of a new member of the CD20/FcepsilonRIbeta family overexpressed in tolerated allografts. *Am. J. Transpl.* 5, 2143–2153.
- Maeda, Y., Ide, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kinoshita, T., 2008. GPHR is a novel anion channel critical for acidification and functions of the Golgi apparatus. *Nat. Cell Biol.* 10, 1135–1145.
- Menoret, S., De Cian, A., Tesson, L., Remy, S., Usal, C., Boule, J.B., Boix, C., Fontaniere, S., Creneugy, A., Nguyen, T.H., Brusselle, L., Thinard, R., Gauguier, D., Concordet, J.P., Cherifi, Y., Fraichard, A., Giovannangeli, C., Anegon, I., 2015. Homology-directed repair in rodent zygotes using Cas9 and TALEN engineered proteins. *Sci. Rep.* 5, 14410.
- Menoret, S., Fontaniere, S., Jantz, D., Tesson, L., Thinard, R., Remy, S., Usal, C., Ouisse, L.H., Fraichard, A., Anegon, I., 2013. Generation of Rag1-knockout immunodeficient rats and mice using engineered meganucleases. *FASEB J.* 27, 703–711.
- Otsubo, T., Hida, Y., Ohga, N., Sato, H., Kai, T., Matsuki, Y., Takasu, H., Akiyama, K., Maishi, N., Kawamoto, T., Shinohara, N., Nonomura, K., Hida, K., 2014. Identification of novel targets for antiangiogenic therapy by comparing the gene expressions of tumor and normal endothelial cells. *Cancer Sci.* 105, 560–567.
- Ramakrishna, S., Kwaku Dad, A.B., Beloor, J., Gopalappa, R., Lee, S.K., Kim, H., 2014. Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA. *Genome Res.* 24, 1020–1027.
- Ran, F.A., Cong, L., Yan, W.X., Scott, D.A., Gootenberg, J.S., Kriz, A.J., Zetsche, B., Shalem, O., Wu, X., Makarova, K.S., Koonin, E.V., Sharp, P.A., Zhang, F., 2015. *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature* 520, 186–191.
- Ran, F.A., Hsu, P.D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D.A., Zhang, F., 2013. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* 8, 2281–2308.
- Ryu, S.H., Kim, K.H., Kim, H.B., Kim, M.H., Kim, N.H., Kang, Y., Hyun, J.W., Seo, H.J., Jun, J.Y., You, H.J., 2010. Oncogenic Ras-mediated downregulation of *Clst1/LR8* is involved in Ras-mediated neoplastic transformation and tumorigenesis in NIH3T3 cells. *Cancer Sci.* 101, 1990–1996.
- Segovia, M., Louvet, C., Charnet, P., Savina, A., Tilly, G., Gautreau, L., Carretero-Iglesia, L., Beriou, G., Cebrian, I., Cens, T., Hepburn, L., Chiffolleau, E., Floto, R.A., Anegon, I., Amigorena, S., Hill, M., Cuturi, M.C., 2014. Autologous dendritic cells prolong allograft survival through *Tmem176b*-dependent antigen cross-presentation. *Am. J. Transpl.* 14, 1021–1031.
- Slymaker, I.M., Gao, L., Zetsche, B., Scott, D.A., Yan, W.X., Zhang, F., 2016. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science* 351, 84–88.
- Stemmer, M., Thumberger, T., Del Sol Keyer, M., Wittbrodt, J., Mateo, J.L., 2015. CCTop: an intuitive, flexible and reliable CRISPR/Cas9 target prediction tool. *PLoS One* 10, e0124633.
- Tesson, L., Remy, S., Menoret, S., Usal, C., Anegon, I., 2010. Analysis by quantitative PCR of zygosity in genetically modified organisms. *Methods Mol. Biol.* 597, 277–285.
- Wang, H., Yang, H., Shivaila, C.S., Dawlaty, M.M., Cheng, A.W., Zhang, F., Jaenisch, R., 2013. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 153, 910–918.
- Wang, L., Shao, Y., Guan, Y., Li, L., Wu, L., Chen, F., Liu, M., Chen, H., Ma, Y., Ma, X., Liu, M., Li, D., 2015. Large genomic fragment deletion and functional gene cassette knock-in via Cas9 protein mediated genome editing in one-cell rodent embryos. *Sci. Rep.* 5, 17517.
- Xiao, A., Wang, Z., Hu, Y., Wu, Y., Luo, Z., Yang, Z., Zu, Y., Li, W., Huang, P., Tong, X., Zhu, Z., Lin, S., Zhang, B., 2013. Chromosomal deletions and inversions mediated by TALENs and CRISPR/Cas in zebrafish. *Nucleic Acids Res.* 41, e141.
- Yano, M., Kawao, N., Tamura, Y., Okada, K., Kaji, H., 2014. A novel factor, *Tmem176b*,

- induced by activin-like kinase 2 signal promotes the differentiation of myoblasts into osteoblasts. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 122, 7–14.
- Yen, S.T., Zhang, M., Deng, J.M., Usman, S.J., Smith, C.N., Parker-Thornburg, J., Swinton, P.G., Martin, J.F., Behringer, R.R., 2014. Somatic mosaicism and allele complexity induced by CRISPR/Cas9 RNA injections in mouse zygotes. *Dev. Biol.* 393, 3–9.
- Zhang, L., Jia, R., Palange, N.J., Satheka, A.C., Togo, J., An, Y., Humphrey, M., Ban, L., Ji, Y., Jin, H., Feng, X., Zheng, Y., 2015. Large genomic fragment deletions and insertions in mouse using CRISPR/Cas9. *PLoS One* 10, e0120396.
- Zuccolo, J., Bau, J., Childs, S.J., Goss, G.G., Sensen, C.W., Deans, J.P., 2010. Phylogenetic analysis of the MS4A and TMEM176 gene families. *PLoS One* 5, e9369.

UNCORRECTED PROOF



## Supplementary data

Figure S1. Hypothesis to explain the failure to produce the initial *Tmem176b* sgRNA and solution.

Figure S2. Summary of the different mutation outcomes and the corresponding genotyping strategies.

Figure S3. Analysis of allele transmission from three F<sub>0</sub> mice to their progeny.

Figure S4. Off-target (OT) analysis on selected mice.

Table S1. List of cloning oligonucleotides for *Tmem176a* and *Tmem176b*-specific sgRNA expression in transfected cells.

Table S2. List of oligonucleotides used for making *Tmem176a* and *Tmem176b*-specific sgRNA templates by PCR for *in vitro* transcription.

Table S3. List of oligonucleotides used for genotyping the mouse *Tmem176a/b* genomic locus.

Table S4. List of oligonucleotides used for mouse gene RT-PCR analysis.

Table S5. List of the most likely off-targets for each crRNA target sequence predicted by CCTop.

Table S6. List of oligonucleotides used for off-target analysis.

Fig. S1. Hypothesis to explain the failure to produce the initial *Tmem176b* sgRNA and solution.

**A:** For *in vitro* production of sgRNA, *T7* promoter was added by PCR amplification to the crRNA target sequence followed by the scaffold. The double-stranded DNA template for *Tmem176b* sgRNA is represented. Several attempts to produce detectable sgRNA using this template all failed. Potentially detrimental self-annealings of sense or antisense strands over a region spanning the *T7* promoter and the crRNA target sequence are shown below. **B:** Truncated sgRNA template (with 18-nt instead of 20-nt crRNA target sequence) resulted in the elimination of a significant stretch of predicted pairings (in red in **A**) and was associated with successful transcription. **C:** Alternatively, early transcription inhibition could be explained by the annealing of newly produced sgRNA molecules with the sense strand of DNA template. **D:** This inhibition would be less likely to occur with truncated sgRNA.

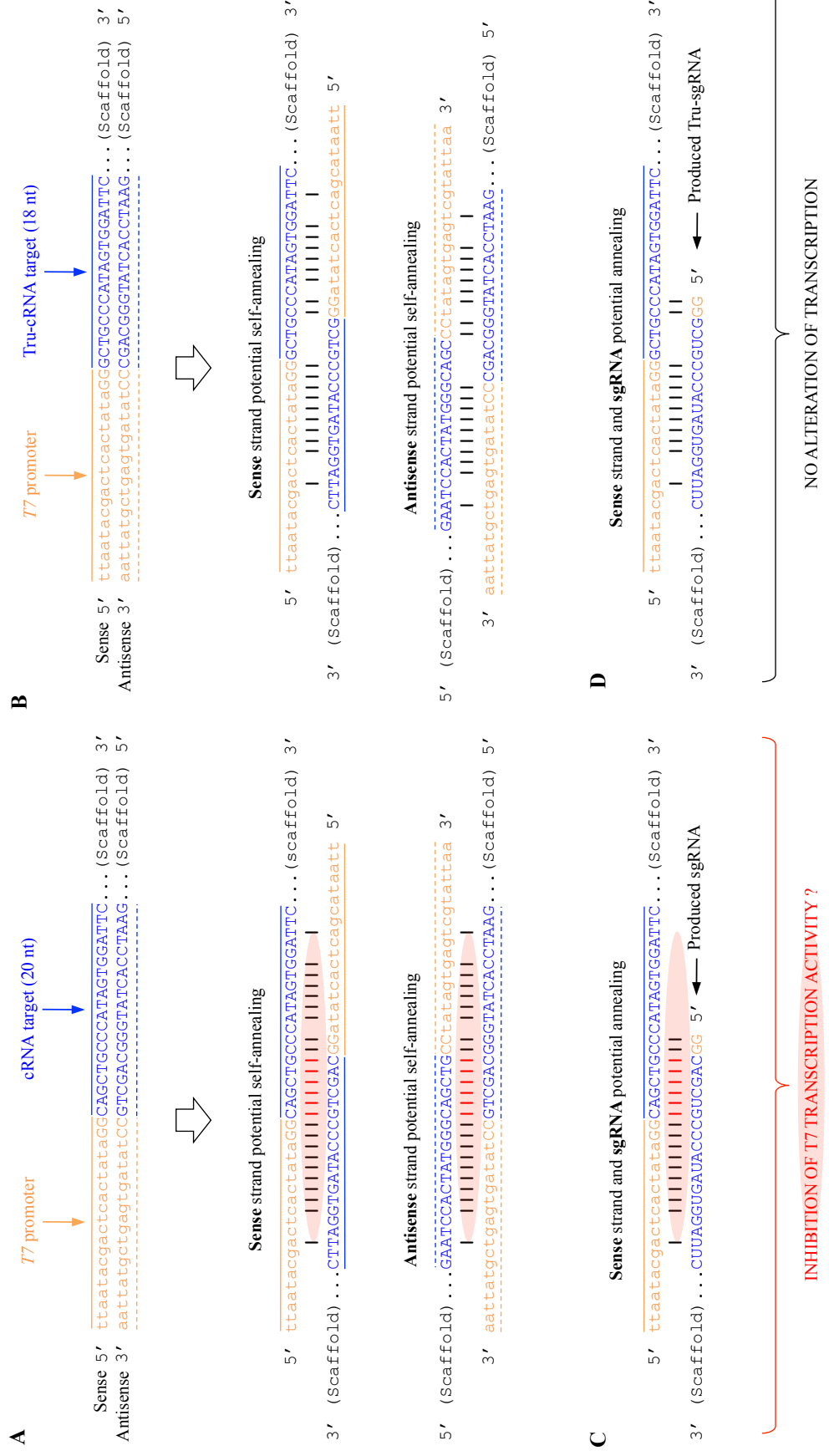


Fig. S2. Summary of the different mutation outcomes and the corresponding genotyping strategies.

To detect NHEJ-induced mutations in *Tmem176b* ( $b^*$ ) and *Tmem176a* ( $a^*$ ) genes, PCRs A and B are performed followed by T7EI assays (see Fig. 3) with and without addition of corresponding WT PCR. Both of these T7EI assays (“self” and “+WT DNA”) should be systematically completed to reveal all mutated alleles. Direct sequencing of the PCR products can then be performed to confirm mutations and identify potential frameshift events. It is important to note that asynchronous chromatograms are generally obtained in this case due to simultaneous amplification of mutated and WT (or differentially mutated) alleles, thus making sequence analysis fastidious. This analysis is obviously facilitated when a NHEJ-induced mutated allele is associated with a deleted ( $del$ ) or inverted ( $inv$ ) allele since the latter no longer offer appropriate templates for PCRs A and B. To detect alleles with a large deletion ( $del$ ) between the two CRISPR sites, PCR BA that combines B forward ( $B5'$ ) and A reverse ( $A3'$ ) primers is performed. While a WT allele is associated with a  $\sim 0.6$  kb band (see Fig. 4). To detect alleles with an inversion ( $inv$ ) of the region between the two CRISPR sites, PCRs FF and RR that combine both forward primers or both reverse primers are performed (see Fig. 5). For both  $del$  and  $inv$  alleles, direct sequencing of the PCR products can then be performed to precisely characterize each junction.

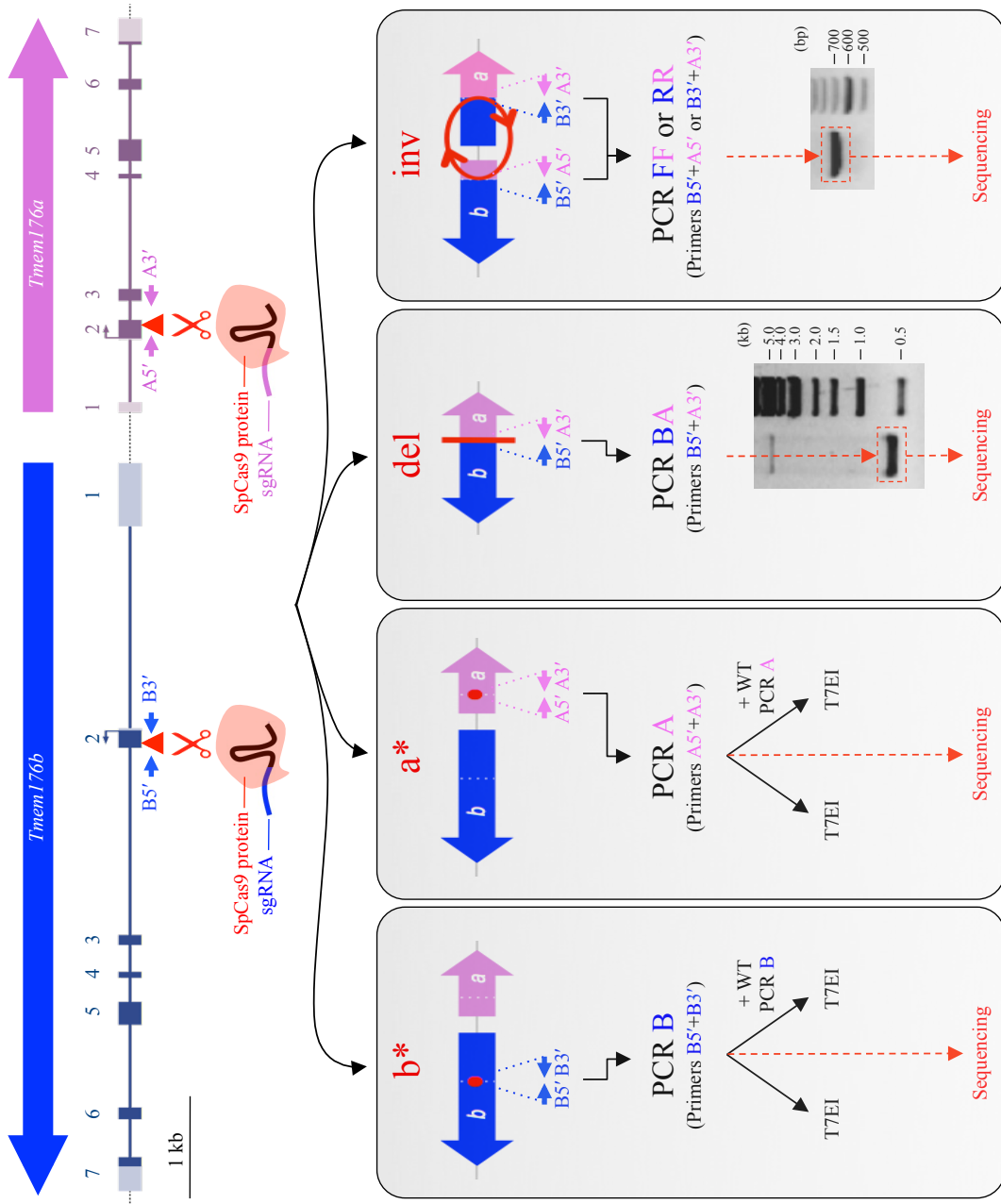


Fig. S3. Analysis of allele transmission from three F<sub>0</sub> mice to their progeny.

F<sub>0</sub> mice #8, #18 and #30 were mated with C57BL/6J mice and their progeny (F<sub>1</sub> mice) were genotyped to identify transmitted (germline) alleles. For mouse #8 and #30, the two detected alleles were transmitted. For the mosaic mouse #18, an inverted allele and a WT allele were not transmitted, respectively.

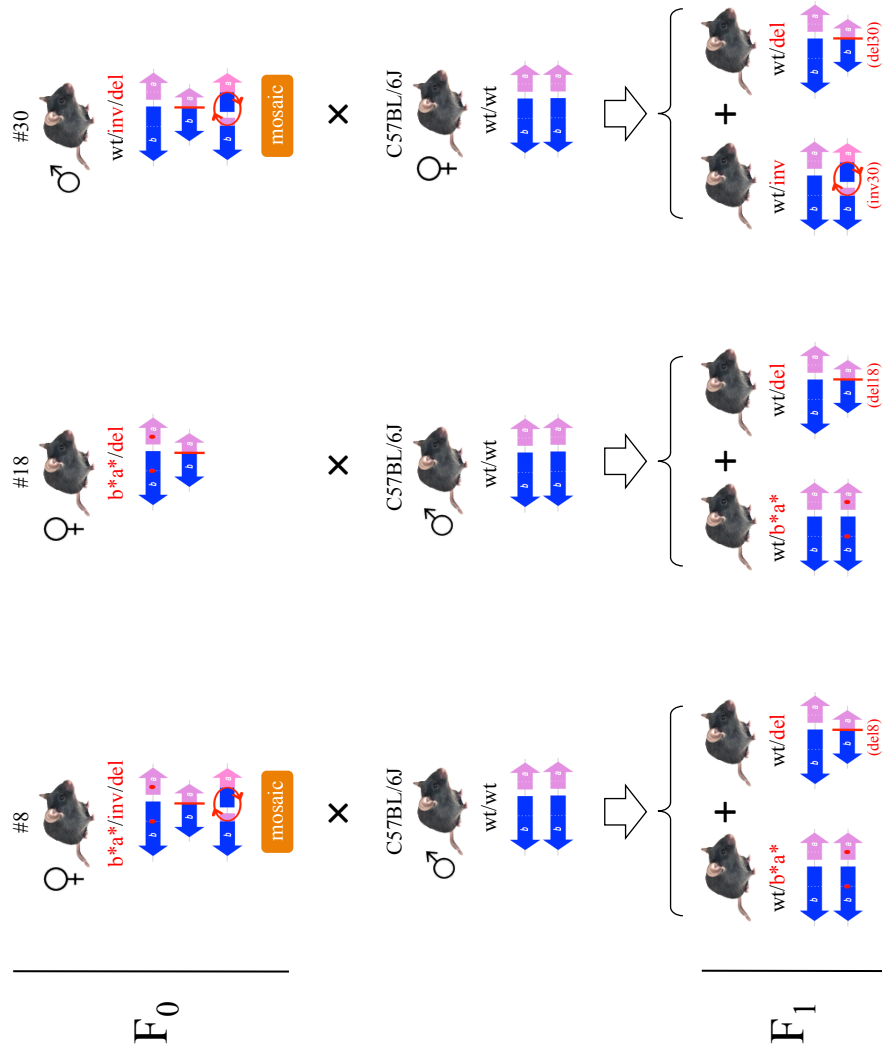


Fig. S4. Off-target (OT) analysis on selected mice.

Indicated PCRs were performed for each selected mice. The mouse F<sub>0</sub>#30 was generated from B6D2 mixed genetic background embryos. The mouse BC5.del30 (carrying the del30 allele from the F<sub>0</sub>#30) results onto the C57BL/6J background. The mice F<sub>0</sub>.B6#3, #4, #30 and #34 mice were generated from “pure” C57BL/6N embryos. The left pannel shows T7EI assays for PCR A and the PCRs of 4 predicted OTs for *Tmem176a*-specific Tru-sgRNA. The right pannel shows T7EI assays for PCR B and the PCRs of 4 predicted OTs for *Tmem176b*-specific Tru-sgRNA. Briefly, following confirmation of each PCR, corresponding WT PCR product was added and T7EI assay was performed and analyzed (here by capillary electrophoresis). Expected a\* and b\* mutations were detected for mice F<sub>0</sub>.B6#3, #28, #30 and #34 (downward red arrows). Among tested OTs, mutations were detected only for B-OT4 in mice F<sub>0</sub>.B6#3, #30 and #34 (upward red arrows). MW : Molecular weight marker.

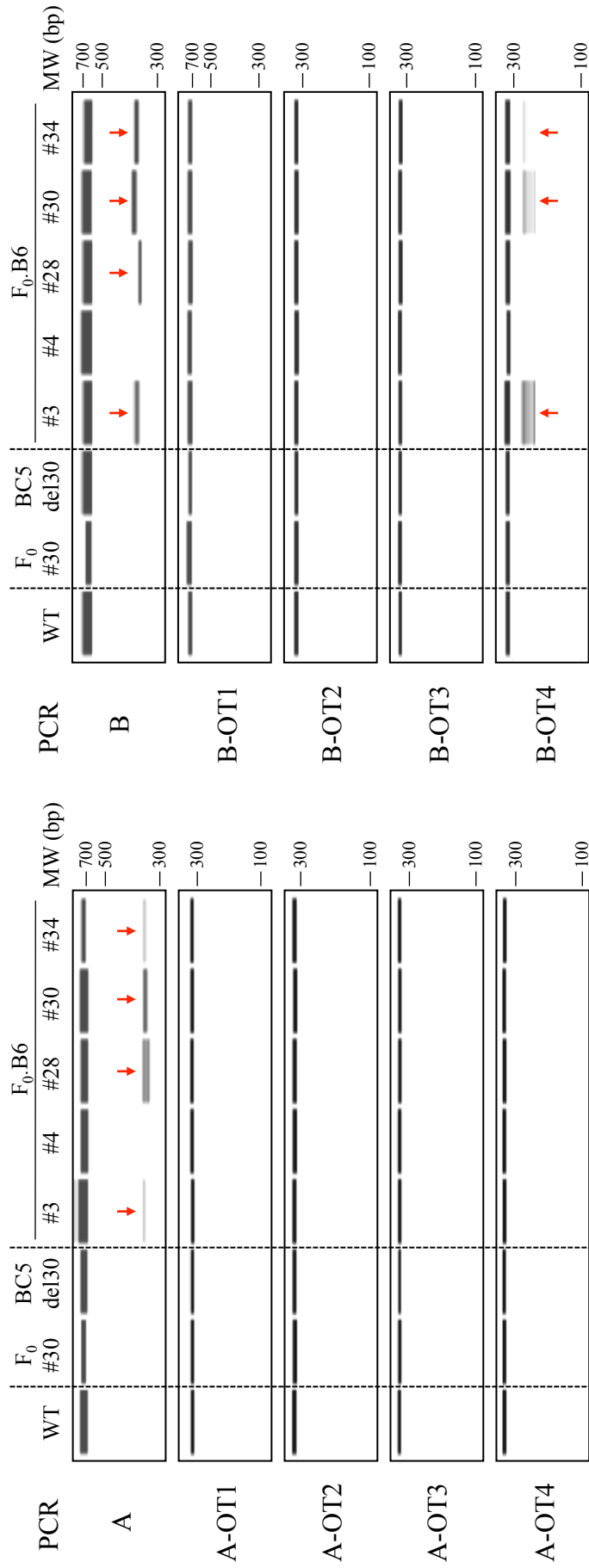


Table S1. List of cloning oligonucleotides for *Tmem176a* and *Tmem176b*-specific sgRNA expression in transfected cells.

Oligonucleotide name <sup>a</sup>	Sequence (5' to 3')
a(20)_BbsI_F	CACCC <b>GGGCAGCAGCAGAGTCTGG</b> <sup>b</sup>
a(20)_BbsI_R	AAAC <b>CCAGCACTCTGCTGCTGCC</b>
b(20)_BbsI_F	CACCCGGC <b>AGCTGCCCATAGTGGATTC</b>
b(20)_BbsI_R	AAAC <b>GAA</b> TCCACTATGGGCAGCTGCC

<sup>a</sup> For each gene, the forward (F) oligonucleotide was annealed with the reverse (R) oligonucleotide before cloning into the PX330 plasmid using Bbs I. <sup>b</sup> Bold letters show the 20-nt CRISPR target sequences whereas the other letters represent added bases required for the cloning.

Table S2. List of oligonucleotides used for making *Tmem176a* and *Tmem176b*-specific sgRNA templates by PCR for *in vitro* transcription.

Oligonucleotide name	Sequence (5' to 3')
T7_a(20)	ttaatacgactcactata <b>GGGCAGCAGCAGAGTGCTGG</b>
T7_b(20)	ttaatacgactcactata <b>GGCAGCTGCCCATAGTGGATTC</b>
T7_Truc-a(19)	ttaatacgactcactata <b>GGCAGCAGCAGAGTGCTGG</b>
T7_Truc-b(18)	ttaatacgactcactata <b>GGCTGCCCATAGTGGATTC</b>
SP6_Truc-b(19)	attaggtgacactata <b>GAGCTGCCCATAGTGGATTC</b>
Scaffold reverse primer	AAAAGCACCGACTCGGTGCC
Complete T7 template	ttaatacgactcactata <b>GEN<sub>1,7-20</sub></b> GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGTCTTTT
Size	<b>117–120 bp</b> (T7 promoter [without last GG] = 18 + GG = 2 + N = 17–20 + scaffold = 80)
Produced sgRNA	<b>GEN<sub>1,7-20</sub></b> GUUUUAGAGCCUAGAAAUAAGCAAGUUUUAAAAUAAGGCCUAGUCCGUUAUCAACUUUGAAAAAAGUGGCACCGAGUCCGGUGCUUUU
Size	<b>99–102 bases</b> (GG = 2 + N = 17–20 + scaffold = 80)

Table S3. List of oligonucleotides used for genotyping the mouse *Tmem176a/b* genomic locus.

PCR name	Primer name and sequence			Amplicon size (bp)		
	Forward primer	Reverse primer	WT	deletion	inversion	
<b>A</b>	<b>A5'</b> : CAGCATCAGGCTTCCCTGAC	<b>A3'</b> : GCCACACTCACCACGATCCC	667	-	-	
<b>B</b>	<b>B5'</b> : TGAAACTCTTCTCCTGTCACCCA	<b>B3'</b> : TAATCCCTTGGGGAGGGGCC	620	-	-	
<b>BA</b>	<b>B5'</b> : TGAAACTCTTCTCCTGTCACCCA	<b>A3'</b> : GCCACACTCACCACGATCCC	4769	~ 580	~ 4769	
"Big BA"	<b>Bbig5'</b> : GTCCAAGGCCCGAAGTAGAG	<b>Abig3'</b> : CAGGTACCACCCCGTTTCTT	7568	~ 3378	~ 7568	
<b>FF</b>	<b>B5'</b> : TGAAACTCTTCTCCTGTCACCCA	<b>A5'</b> : CAGCATCAGGCTTCCCTGAC	-	-	~ 600	
<b>RR</b>	<b>B3'</b> : TAATCCCTTGGGGAGGGGCC	<b>A3'</b> : GCCACACTCACCACGATCCC	-	-	~ 680	
<b>B*A*</b>	<b>B*5'</b> : CAGCTGCCCATAGTGGATTCT	<b>A*3'</b> : AGGCCACCAGCACTCTGC	4216	-	-	



Table S4. List of oligonucleotides used for mouse gene RT-PCR analysis.

Gene name	Forward primer	Reverse primer	Amplicon size (bp)
<i>Tmem176a</i>	AGAACCACCTCCAGTTCCCGA	TGCACCCAGCAGTTTCTTCT	210
<i>Tmem176b</i>	TCAGACTGGAAGACACAGAGAGGT	CTGGATGCCCAATCAAGAAGC	211
<i>Gapdh</i>	GGTGAAGGTCGGTGTGAACCGG	TCGCTCCTGGAAGATGGTGAT	232

Table S5. List of the most likely off-targets for each crRNA target sequence predicted by CCTop<sup>a</sup>.

On/off targets	Chr	Start	End	Strand	MM	Target sequence	PAM	Position
<i>Tmem176a</i>	Chr6	48842372	48842393	+	0	GGCAGCAGCAGAGTGCTGG	TGG	Exonic
A-OT1	Chr13	46993315	46993336	+	2	GCAGCAGGAGAGTGCTGG	GGG	Intergenic
A-OT2	Chr4	67901430	67901451	-	4	TCCAAGAGCAGAGTGCTGG	AGG	Intergenic
A-OT3	Chr2	73479318	73479339	-	4	GTTGGAAGCAGAGTGCTGG	AGG	Intronic
A-OT4	Chr18	80268428	80268449	-	4	AGTTGCTGCAGAGTGCTGG	AGG	Intronic
<i>Tmem176b</i>	Chr6	48838183	48838203	+	0	GCTGCCCATAGTGGATTTC	TGG	Exonic
B-OT1	Chr9	117836471	117836491	+	1	GCTGCCCAAGAGTGGATTTC	TGG	Intergenic
B-OT2	Chr2	11636201	11636221	+	3	TTTGCCATAGTGGATTTC	TGG	Intergenic
B-OT3	Chr11	54070759	54070779	+	3	GCACCTCATAGTGGATTTC	TGG	Intergenic
B-OT4	Chr15	115232806	115232826	-	3	ACTGCCGATAGTGGATTTC	GGG	Intergenic

<sup>a</sup> <http://crispr.cos.uni-heidelberg.de>

Chr : chromosome number; Start/End : genomic coordinates; Strand : orientation of the (off-) target site; MM : number of mismatches; Target sequence : (off-) target sequence with highlighted mismatches in red; PAM : endogenous PAM of the (off-) target site; Position : genomic location of the (off-) target sequence.

Table S6. List of oligonucleotides used for off-target analysis.

Off-target name	Forward primer	Reverse primer	Amplicon size (bp)
A_OT1	AATTTGGGGCTGAGGGTAGG	GCGCCATCCCTTCA TGAAAATC	316
A_OT2	GTTGAAAAGGACAAATCTCTTGCC	GCTCAAAACAGGTTGGAGAACCA	324
A_OT3	GCATCTCCCTCCCTCTCTCT	GGTGATGCCCGTGAGAAAGAT	340
A_OT4	TCGCCGTGTGTTGCTCAGTAG	ACATCGGTGTCCTGAAAAGCC	350
B_OT1	CTTGTGCTTTCTCTCTCCCT	GCATAGCCGTGTCCACAGACAC	582
B_OT2	ACAAGCTAGCATAAGCTGCAAA	GCGTTAAGAGAAGACAGCAGC	316
B_OT3	GGTTCAACCACCAACCACTG	AGGCCCTCCTCCAAGAAAGT	317
B_OT4	ATTTCTCTCCCCCAGAGGCAG	AGGCAAAGGGCTCAGGAGTAG	336

# BIBLIOGRAPHIE

- Abraham, C., and Cho, J.H. (2009). Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 361, 2066-2078.
- Accapezzato, D., Visco, V., Francavilla, V., Molette, C., Donato, T., Paroli, M., Mondelli, M.U., Doria, M., Torrissi, M.R., and Barnaba, V. (2005). Chloroquine enhances human CD8+ T cell responses against soluble antigens in vivo. *J Exp Med* 202, 817-828.
- Acosta-Rodriguez, E.V., Napolitani, G., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2007). Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* 8, 942-949.
- Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M.H., de Sauvage, F.J., and Gurney, A.L. (2003). Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* 278, 1910-1914.
- Alegre, M.L., Frauwirth, K.A., and Thompson, C.B. (2001). T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol* 1, 220-228.
- Amigorena, S., and Savina, A. (2010). Intracellular mechanisms of antigen cross presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 22, 109-117.
- Annunziato, F., Cosmi, L., Santarlasci, V., Maggi, L., Liotta, F., Mazzinghi, B., Parente, E., Fili, L., Ferri, S., Frosali, F., *et al.* (2007). Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* 204, 1849-1861.
- Annunziato, F., Romagnani, C., and Romagnani, S. (2015). The 3 major types of innate and adaptive cell-mediated effector immunity. *J Allergy Clin Immunol* 135, 626-635.
- Baas, M.C., Kuhn, C., Valette, F., Mangez, C., Duarte, M.S., Hill, M., Besancon, A., Chatenoud, L., Cuturi, M.C., and You, S. (2014). Combining autologous dendritic cell therapy with CD3 antibodies promotes regulatory T cells and permanent islet allograft acceptance. *J Immunol* 193, 4696-4703.
- Barros-Martins, J., Schmolka, N., Fontinha, D., Pires de Miranda, M., Simas, J.P., Brok, I., Ferreira, C., Veldhoen, M., Silva-Santos, B., and Serre, K. (2016). Effector gammadelta T Cell Differentiation Relies on Master but Not Auxiliary Th Cell Transcription Factors. *J Immunol*.
- Basu, R., Whitley, S.K., Bhaumik, S., Zindl, C.L., Schoeb, T.R., Benveniste, E.N., Pear, W.S., Hatton, R.D., and Weaver, C.T. (2015). IL-1 signaling modulates activation of STAT transcription factors to antagonize retinoic acid signaling and control the TH17 cell-iTreg cell balance. *Nat Immunol* 16, 286-295.
- Bauquet, A.T., Jin, H., Paterson, A.M., Mitsdoerffer, M., Ho, I.C., Sharpe, A.H., and Kuchroo, V.K. (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, 167-175.
- Becher, B., Durell, B.G., and Noelle, R.J. (2002). Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12. *J Clin Invest* 110, 493-497.
- Bennett, C.L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M.E., Ferguson, P.J., Whitesell, L., Kelly, T.E., Saulsbury, F.T., Chance, P.F., and Ochs, H.D. (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 27, 20-21.
- Berer, K., and Krishnamoorthy, G. (2014). Microbial view of central nervous system autoimmunity. *FEBS Lett* 588, 4207-4213.
- Beriou, G., Peche, H., Guillonnet, C., Merieau, E., and Cuturi, M.C. (2005). Donor-specific allograft tolerance by administration of recipient-derived immature dendritic cells and suboptimal immunosuppression. *Transplantation* 79, 969-972.
- Bernink, J.H., Peters, C.P., Munneke, M., te Velde, A.A., Meijer, S.L., Weijer, K., Hreggvidsdottir, H.S., Heinsbroek, S.E., Legrand, N., Buskens, C.J., *et al.* (2013). Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues. *Nat Immunol* 14, 221-229.
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., and Kuchroo, V.K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441, 235-238.
- 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.

- Bezie, S., Picarda, E., Ossart, J., Martinet, B., Anegon, I., and Guillonnet, C. (2015). Compensatory Regulatory Networks between CD8 T, B, and Myeloid Cells in Organ Transplantation Tolerance. *J Immunol* *195*, 5805-5815.
- Billerbeck, E., Kang, Y.H., Walker, L., Lockstone, H., Grafmueller, S., Fleming, V., Flint, J., Willberg, C.B., Bengsch, B., Seigel, B., *et al.* (2010). Analysis of CD161 expression on human CD8+ T cells defines a distinct functional subset with tissue-homing properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 3006-3011.
- Boe, A., Baiocchi, M., Carbonatto, M., Papoian, R., and Serlupi-Crescenzi, O. (1999). Interleukin 6 knock-out mice are resistant to antigen-induced experimental arthritis. *Cytokine* *11*, 1057-1064.
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., and Howard, J.C. (1997). Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* *15*, 749-795.
- Boncompain, G., Divoux, S., Gareil, N., de Forges, H., Lescure, A., Latreche, L., Mercanti, V., Jollivet, F., Raposo, G., and Perez, F. (2012). Synchronization of secretory protein traffic in populations of cells. *Nat Methods* *9*, 493-498.
- Bonneville, M., O'Brien, R.L., and Born, W.K. (2010). Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol* *10*, 467-478.
- Brustle, A., Heink, S., Huber, M., Rosenplanter, C., Stadelmann, C., Yu, P., Arpaia, E., Mak, T.W., Kamradt, T., and Lohoff, M. (2007). The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nat Immunol* *8*, 958-966.
- Cai, Y., Shen, X., Ding, C., Qi, C., Li, K., Li, X., Jala, V.R., Zhang, H.G., Wang, T., Zheng, J., *et al.* (2011). Pivotal role of dermal IL-17-producing gammadelta T cells in skin inflammation. *Immunity* *35*, 596-610.
- Carlberg, C., Hooft van Huijsduijnen, R., Staple, J.K., DeLamar, J.F., and Becker-Andre, M. (1994). RZR, a new family of retinoid-related orphan receptors that function as both monomers and homodimers. *Mol Endocrinol* *8*, 757-770.
- Carpenter, P.A., Pavlovic, S., Tso, J.Y., Press, O.W., Gooley, T., Yu, X.Z., and Anasetti, C. (2000). Non-Fc receptor-binding humanized anti-CD3 antibodies induce apoptosis of activated human T cells. *J Immunol* *165*, 6205-6213.
- Cella, M., Fuchs, A., Vermi, W., Facchetti, F., Otero, K., Lennerz, J.K., Doherty, J.M., Mills, J.C., and Colonna, M. (2009). A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature* *457*, 722-725.
- Chackerian, A.A., Chen, S.J., Brodie, S.J., Mattson, J.D., McClanahan, T.K., Kastelein, R.A., and Bowman, E.P. (2006). Neutralization or absence of the interleukin-23 pathway does not compromise immunity to mycobacterial infection. *Infect Immun* *74*, 6092-6099.
- Chatenoud, L., and Bluestone, J.A. (2007). CD3-specific antibodies: a portal to the treatment of autoimmunity. *Nat Rev Immunol* *7*, 622-632.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* *198*, 1875-1886.
- Cherrier, M. (2014). [Innate lymphoid cells: new players of the mucosal immune response]. *Med Sci (Paris)* *30*, 280-288.
- Cho, M.L., Kang, J.W., Moon, Y.M., Nam, H.J., Jhun, J.Y., Heo, S.B., Jin, H.T., Min, S.Y., Ju, J.H., Park, K.S., *et al.* (2006). STAT3 and NF-kappaB signal pathway is required for IL-23-mediated IL-17 production in spontaneous arthritis animal model IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *J Immunol* *176*, 5652-5661.
- Ciofani, M., Madar, A., Galan, C., Sellars, M., Mace, K., Pauli, F., Agarwal, A., Huang, W., Parkurst, C.N., Muratet, M., *et al.* (2012). A validated regulatory network for Th17 cell specification. *Cell* *151*, 289-303.
- Codarri, L., Gyulveszi, G., Tosevski, V., Hesse, L., Fontana, A., Magnenat, L., Suter, T., and Becher, B. (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*, 560-567.
- Coffman, R.L., Seymour, B.W., Hudak, S., Jackson, J., and Rennick, D. (1989). Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. *Science* *245*, 308-310.
- Collins, J.W., Keeney, K.M., Crepin, V.F., Rathinam, V.A., Fitzgerald, K.A., Finlay, B.B., and Frankel, G. (2014). *Citrobacter rodentium*: infection, inflammation and the microbiota. *Nat Rev Microbiol* *12*, 612-623.
- Comerford, I., Bunting, M., Fenix, K., Haylock-Jacobs, S., Litchfield, W., Harata-Lee, Y., Turvey, M., Brazzatti, J., Gregor, C., Nguyen, P., *et al.* (2010). An immune paradox: how can the same chemokine axis regulate both immune tolerance and

activation?: CCR6/CCL20: a chemokine axis balancing immunological tolerance and inflammation in autoimmune disease. *Bioessays* 32, 1067-1076.

Condamine, T., Le Texier, L., Howie, D., Lavault, A., Hill, M., Halary, F., Cobbold, S., Waldmann, H., Cuturi, M.C., and Chiffolleau, E. (2010). Tmem176B and Tmem176A are associated with the immature state of dendritic cells. *J Leukoc Biol* 88, 507-515.

Constantinides, M.G., McDonald, B.D., Verhoef, P.A., and Bendelac, A. (2014). A committed precursor to innate lymphoid cells. *Nature* 508, 397-401.

Conti, H.R., Shen, F., Nayyar, N., Stocum, E., Sun, J.N., Lindemann, M.J., Ho, A.W., Hai, J.H., Yu, J.J., Jung, J.W., *et al.* (2009). Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *J Exp Med* 206, 299-311.

Conti, H.R., Whibley, N., Coleman, B.M., Garg, A.V., Jaycox, J.R., and Gaffen, S.L. (2015). Signaling through IL-17C/IL-17RE is dispensable for immunity to systemic, oral and cutaneous candidiasis. *PLoS One* 10, e0122807.

Coquet, J.M., Chakravarti, S., Smyth, M.J., and Godfrey, D.I. (2008). Cutting edge: IL-21 is not essential for Th17 differentiation or experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 180, 7097-7101.

Cua, D.J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C.A., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L., To, W., Kwan, S., Churakova, T., *et al.* (2003). Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421, 744-748.

Cuajungco, M.P., Podevin, W., Valluri, V.K., Bui, Q., Nguyen, V.H., and Taylor, K. (2012). Abnormal accumulation of human transmembrane (TMEM)-176A and 176B proteins is associated with cancer pathology. *Acta Histochem* 114, 705-712.

Delamarre, L., Pack, M., Chang, H., Mellman, I., and Trombetta, E.S. (2005). Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science* 307, 1630-1634.

Dongari-Bagtzoglou, A., and Fidel, P.L., Jr. (2005). The host cytokine responses and protective immunity in oropharyngeal candidiasis. *J Dent Res* 84, 966-977.

Drujont, L., Carretero-Iglesia, L., Bouchet-Delbos, L., Beriou, G., Merieau, E., Hill, M., Delneste, Y., Cuturi, M.C., and Louvet, C. (2014). Evaluation of the therapeutic potential of bone marrow-derived myeloid suppressor cell (MDSC) adoptive transfer in mouse models of autoimmunity and allograft rejection. *PLoS One* 9, e100013.

Drujont, L., Lemoine, A., Moreau, A., Bienvenu, G., Lancien, M., Cens, T., Guillot, F., Beriou, G., Bouchet-Delbos, L., Fehling, H.J., *et al.* (2016). RORgammat(+) cells selectively express redundant cation channels linked to the Golgi apparatus. *Sci Rep* 6, 23682.

Duerr, R.H., Taylor, K.D., Brant, S.R., Rioux, J.D., Silverberg, M.S., Daly, M.J., Steinhart, A.H., Abraham, C., Regueiro, M., Griffiths, A., *et al.* (2006). A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 314, 1461-1463.

Dusseaux, M., Martin, E., Serriari, N., Peguillet, I., Premel, V., Louis, D., Milder, M., Le Bourhis, L., Soudais, C., Treiner, E., *et al.* (2011). Human MAIT cells are xenobiotic-resistant, tissue-targeted, CD161hi IL-17-secreting T cells. *Blood* 117, 1250-1259.

Eberl, G., Marmon, S., Sunshine, M.J., Rennert, P.D., Choi, Y., and Littman, D.R. (2004). An essential function for the nuclear receptor RORgamma(t) in the generation of fetal lymphoid tissue inducer cells. *Nat Immunol* 5, 64-73.

Eberl, G., and Sawa, S. (2010). Opening the crypt: current facts and hypotheses on the function of cryptopatches. *Trends Immunol* 31, 50-55.

El-Behi, M., Ciric, B., Dai, H., Yan, Y., Cullimore, M., Safavi, F., Zhang, G.X., Dittel, B.N., and Rostami, A. (2011). The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nat Immunol* 12, 568-575.

Elhofy, A., Depaolo, R.W., Lira, S.A., Lukacs, N.W., and Karpus, W.J. (2009). Mice deficient for CCR6 fail to control chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 213, 91-99.

Engel, I., Seumois, G., Chavez, L., Samaniego-Castruita, D., White, B., Chawla, A., Mock, D., Vijayanand, P., and Kronenberg, M. (2016). Innate-like functions of natural killer T cell subsets result from highly divergent gene programs. *Nat Immunol*.

Eon Kuek, L., Leffler, M., Mackay, G.A., and Hulett, M.D. (2016). The MS4A family: counting past 1, 2 and 3. *Immunol Cell Biol* 94, 11-23.

- Esplugues, E., Huber, S., Gagliani, N., Hauser, A.E., Town, T., Wan, Y.Y., O'Connor, W., Jr., Rongvaux, A., Van Rooijen, N., Haberman, A.M., *et al.* (2011). Control of TH17 cells occurs in the small intestine. *Nature* **475**, 514-518.
- Eugster, H.P., Frei, K., Kopf, M., Lassmann, H., and Fontana, A. (1998). IL-6-deficient mice resist myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* **28**, 2178-2187.
- Eyerich, K., Foerster, S., Rombold, S., Seidl, H.P., Behrendt, H., Hofmann, H., Ring, J., and Traidl-Hoffmann, C. (2008). Patients with chronic mucocutaneous candidiasis exhibit reduced production of Th17-associated cytokines IL-17 and IL-22. *J Invest Dermatol* **128**, 2640-2645.
- Fabre, J.W., and Morris, P.J. (1972). The effect of donor strain blood pretreatment on renal allograft rejection in rats. *Transplantation* **14**, 608-617.
- Fanti, P.A., Dika, E., Vaccari, S., Miscial, C., and Varotti, C. (2006). Generalized psoriasis induced by topical treatment of actinic keratosis with imiquimod. *Int J Dermatol* **45**, 1464-1465.
- Farah, C.S., Hu, Y., Riminton, S., and Ashman, R.B. (2006). Distinct roles for interleukin-12p40 and tumour necrosis factor in resistance to oral candidiasis defined by gene-targeting. *Oral Microbiol Immunol* **21**, 252-255.
- Feske, S., Wulff, H., and Skolnik, E.Y. (2015). Ion channels in innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* **33**, 291-353.
- Fiorentino, D.F., Bond, M.W., and Mosmann, T.R. (1989). Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* **170**, 2081-2095.
- Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Immunol* **4**, 330-336.
- Fort, M.M., Cheung, J., Yen, D., Li, J., Zurawski, S.M., Lo, S., Menon, S., Clifford, T., Hunte, B., Lesley, R., *et al.* (2001). IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity* **15**, 985-995.
- Gaboriau-Routhiau, V., Rakotobe, S., Lecuyer, E., Mulder, I., Lan, A., Bridonneau, C., Rochet, V., Pisi, A., De Paepe, M., Brandi, G., *et al.* (2009). The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity* **31**, 677-689.
- Gaffen, S.L., Jain, R., Garg, A.V., and Cua, D.J. (2014). The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nat Rev Immunol* **14**, 585-600.
- Gapin, L. (2016). Development of invariant natural killer T cells. *Curr Opin Immunol* **39**, 68-74.
- Gaublomme, J.T., Yosef, N., Lee, Y., Gertner, R.S., Yang, L.V., Wu, C., Pandolfi, P.P., Mak, T., Satija, R., Shalek, A.K., *et al.* (2015). Single-Cell Genomics Unveils Critical Regulators of Th17 Cell Pathogenicity. *Cell* **163**, 1400-1412.
- Gerart, S., Siberil, S., Martin, E., Lenoir, C., Aguilar, C., Picard, C., Lantz, O., Fischer, A., and Latour, S. (2013). Human iNKT and MAIT cells exhibit a PLZF-dependent proapoptotic propensity that is counterbalanced by XIAP. *Blood* **121**, 614-623.
- Geremia, A., Arancibia-Carcamo, C.V., Fleming, M.P., Rust, N., Singh, B., Mortensen, N.J., Travis, S.P., and Powrie, F. (2011). IL-23-responsive innate lymphoid cells are increased in inflammatory bowel disease. *J Exp Med* **208**, 1127-1133.
- Gershon, R.K., and Kondo, K. (1970). Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* **18**, 723-737.
- Ghoreschi, K., Laurence, A., Yang, X.P., Tato, C.M., McGeachy, M.J., Konkel, J.E., Ramos, H.L., Wei, L., Davidson, T.S., Bouladoux, N., *et al.* (2010). Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. *Nature* **467**, 967-971.
- Giguere, V., Tini, M., Flock, G., Ong, E., Evans, R.M., and Otulakowski, G. (1994). Isoform-specific amino-terminal domains dictate DNA-binding properties of ROR alpha, a novel family of orphan hormone nuclear receptors. *Genes Dev* **8**, 538-553.
- Gilliet, M., Conrad, C., Geiges, M., Cozzio, A., Thurlimann, W., Burg, G., Nestle, F.O., and Dummer, R. (2004). Psoriasis triggered by toll-like receptor 7 agonist imiquimod in the presence of dermal plasmacytoid dendritic cell precursors. *Arch Dermatol* **140**, 1490-1495.
- Gocke, A.R., Lebson, L.A., Grishkan, I.V., Hu, L., Nguyen, H.M., Whartenby, K.A., Chandy, K.G., and Calabresi, P.A. (2012). Kv1.3 deletion biases T cells toward an immunoregulatory phenotype and renders mice resistant to autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **188**, 5877-5886.



- Goto, Y., and Ivanov, I. (2013). Intestinal epithelial cells as mediators of the commensal-host immune crosstalk. *Immunol Cell Biol* *91*, 204-214.
- Goto, Y., Obata, T., Kunisawa, J., Sato, S., Ivanov, I., Lamichhane, A., Takeyama, N., Kamioka, M., Sakamoto, M., Matsuki, T., *et al.* (2014). Innate lymphoid cells regulate intestinal epithelial cell glycosylation. *Science* *345*, 1254009.
- Gran, B., Zhang, G.X., Yu, S., Li, J., Chen, X.H., Ventura, E.S., Kamoun, M., and Rostami, A. (2002). IL-12p35-deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for redundancy in the IL-12 system in the induction of central nervous system autoimmune demyelination. *J Immunol* *169*, 7104-7110.
- Gray, E.E., Ramirez-Valle, F., Xu, Y., Wu, S., Wu, Z., Karjalainen, K.E., and Cyster, J.G. (2013). Deficiency in IL-17-committed Vgamma4(+) gammadelta T cells in a spontaneous Sox13-mutant CD45.1(+) congenic mouse substrain provides protection from dermatitis. *Nat Immunol* *14*, 584-592.
- Gray, S.M., Kaech, S.M., and Staron, M.M. (2014). The interface between transcriptional and epigenetic control of effector and memory CD8(+) T-cell differentiation. *Immunol Rev* *261*, 157-168.
- Griffiths, C.E., Reich, K., Lebwohl, M., van de Kerkhof, P., Paul, C., Menter, A., Cameron, G.S., Erickson, J., Zhang, L., Secrest, R.J., *et al.* (2015). Comparison of ixekizumab with etanercept or placebo in moderate-to-severe psoriasis (UNCOVER-2 and UNCOVER-3): results from two phase 3 randomised trials. *Lancet* *386*, 541-551.
- Guillonnet, C., Hill, M., Hubert, F.X., Chiffolleau, E., Herve, C., Li, X.L., Heslan, M., Usal, C., Tesson, L., Menoret, S., *et al.* (2007). CD40lg treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN-gamma, and indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest* *117*, 1096-1106.
- Guo, J., Hawwari, A., Li, H., Sun, Z., Mahanta, S.K., Littman, D.R., Krangel, M.S., and He, Y.W. (2002). Regulation of the TCRalpha repertoire by the survival window of CD4(+)CD8(+) thymocytes. *Nat Immunol* *3*, 469-476.
- Guo, X., Liang, Y., Zhang, Y., Lasorella, A., Kee, B.L., and Fu, Y.X. (2015). Innate Lymphoid Cells Control Early Colonization Resistance against Intestinal Pathogens through ID2-Dependent Regulation of the Microbiota. *Immunity* *42*, 731-743.
- Haines, C.J., Chen, Y., Blumenschein, W.M., Jain, R., Chang, C., Joyce-Shaikh, B., Porth, K., Boniface, K., Mattson, J., Basham, B., *et al.* (2013). Autoimmune memory T helper 17 cell function and expansion are dependent on interleukin-23. *Cell Rep* *3*, 1378-1388.
- Hamada, H., Garcia-Hernandez Mde, L., Reome, J.B., Misra, S.K., Strutt, T.M., McKinstry, K.K., Cooper, A.M., Swain, S.L., and Dutton, R.W. (2009). Tc17, a unique subset of CD8 T cells that can protect against lethal influenza challenge. *J Immunol* *182*, 3469-3481.
- Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., and Weaver, C.T. (2005). Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* *6*, 1123-1132.
- Hartwig, T., Pantelyushin, S., Croxford, A.L., Kulig, P., and Becher, B. (2015). Dermal IL-17-producing gammadelta T cells establish long-lived memory in the skin. *Eur J Immunol* *45*, 3022-3033.
- He, Y.W., Deftos, M.L., Ojala, E.W., and Bevan, M.J. (1998). RORgamma t, a novel isoform of an orphan receptor, negatively regulates Fas ligand expression and IL-2 production in T cells. *Immunity* *9*, 797-806.
- Heinzel, F.P., Sadick, M.D., Holaday, B.J., Coffman, R.L., and Locksley, R.M. (1989). Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J Exp Med* *169*, 59-72.
- Hepworth, M.R., Fung, T.C., Masur, S.H., Kelsen, J.R., McConnell, F.M., Dubrot, J., Withers, D.R., Hugues, S., Farrar, M.A., Reith, W., *et al.* (2015). Immune tolerance. Group 3 innate lymphoid cells mediate intestinal selection of commensal bacteria-specific CD4(+) T cells. *Science* *348*, 1031-1035.
- Hepworth, M.R., Monticelli, L.A., Fung, T.C., Ziegler, C.G., Grunberg, S., Sinha, R., Mantegazza, A.R., Ma, H.L., Crawford, A., Angelosanto, J.M., *et al.* (2013). Innate lymphoid cells regulate CD4+ T-cell responses to intestinal commensal bacteria. *Nature* *498*, 113-117.
- Hill, M., and Cuturi, M.C. (2010). Negative vaccination by tolerogenic dendritic cells in organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* *15*, 738-743.

Hill, M., Thebault, P., Segovia, M., Louvet, C., Beriou, G., Tilly, G., Merieau, E., Anegon, I., Chiffolleau, E., and Cuturi, M.C. (2011). Cell therapy with autologous tolerogenic dendritic cells induces allograft tolerance through interferon-gamma and epstein-barr virus-induced gene 3. *Am J Transplant* *11*, 2036-2045.

Hirahara, K., Ghoreschi, K., Laurence, A., Yang, X.P., Kanno, Y., and O'Shea, J.J. (2010). Signal transduction pathways and transcriptional regulation in Th17 cell differentiation. *Cytokine Growth Factor Rev* *21*, 425-434.

Hirose, T., Smith, R.J., and Jetten, A.M. (1994). ROR gamma: the third member of ROR/RZR orphan receptor subfamily that is highly expressed in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* *205*, 1976-1983.

Hirota, K., Duarte, J.H., Veldhoen, M., Hornsby, E., Li, Y., Cua, D.J., Ahlfors, H., Wilhelm, C., Tolaini, M., Menzel, U., *et al.* (2011). Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat Immunol* *12*, 255-263.

Hirota, K., Turner, J.E., Villa, M., Duarte, J.H., Demengeot, J., Steinmetz, O.M., and Stockinger, B. (2013). Plasticity of Th17 cells in Peyer's patches is responsible for the induction of T cell-dependent IgA responses. *Nat Immunol* *14*, 372-379.

Holтта, V., Klemetti, P., Sipponen, T., Westerholm-Ormio, M., Kociubinski, G., Salo, H., Rasanen, L., Kolho, K.L., Farkkila, M., Savilahti, E., *et al.* (2008). IL-23/IL-17 immunity as a hallmark of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* *14*, 1175-1184.

Hrvatin, S., Deng, F., O'Donnell, C.W., Gifford, D.K., and Melton, D.A. (2014). MARIS: method for analyzing RNA following intracellular sorting. *PLoS One* *9*, e89459.

Hu, C.M., Jang, S.Y., Fanzo, J.C., and Pernis, A.B. (2002). Modulation of T cell cytokine production by interferon regulatory factor-4. *J Biol Chem* *277*, 49238-49246.

Hu, X., Wang, Y., Hao, L.Y., Liu, X., Lesch, C.A., Sanchez, B.M., Wendling, J.M., Morgan, R.W., Aicher, T.D., Carter, L.L., *et al.* (2015). Sterol metabolism controls T(H)17 differentiation by generating endogenous RORgamma agonists. *Nat Chem Biol* *11*, 141-147.

Huber, M., Heink, S., Grothe, H., Guralnik, A., Reinhard, K., Elflein, K., Hunig, T., Mittrucker, H.W., Brustle, A., Kamradt, T., *et al.* (2009). A Th17-like developmental process leads to CD8(+) Tc17 cells with reduced cytotoxic activity. *Eur J Immunol* *39*, 1716-1725.

Huber, M., Heink, S., Pagenstecher, A., Reinhard, K., Ritter, J., Visekruna, A., Guralnik, A., Bollig, N., Jeltsch, K., Heinemann, C., *et al.* (2013). IL-17A secretion by CD8+ T cells supports Th17-mediated autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* *123*, 247-260.

Hueber, W., Sands, B.E., Lewitzky, S., Vandemeulebroecke, M., Reinisch, W., Higgins, P.D., Wehkamp, J., Feagan, B.G., Yao, M.D., Karczewski, M., *et al.* (2012). Secukinumab, a human anti-IL-17A monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn's disease: unexpected results of a randomised, double-blind placebo-controlled trial. *Gut* *61*, 1693-1700.

Huh, J.R., Leung, M.W., Huang, P., Ryan, D.A., Krout, M.R., Malapaka, R.R., Chow, J., Manel, N., Ciofani, M., Kim, S.V., *et al.* (2011). Digoxin and its derivatives suppress TH17 cell differentiation by antagonizing RORgamma activity. *Nature* *472*, 486-490.

Hymowitz, S.G., Filvaroff, E.H., Yin, J.P., Lee, J., Cai, L., Risser, P., Maruoka, M., Mao, W., Foster, J., Kelley, R.F., *et al.* (2001). IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding. *EMBO J* *20*, 5332-5341.

Ikeda, S., Saijo, S., Murayama, M.A., Shimizu, K., Akitsu, A., and Iwakura, Y. (2014). Excess IL-1 signaling enhances the development of Th17 cells by downregulating TGF-beta-induced Foxp3 expression. *J Immunol* *192*, 1449-1458.

Infante-Duarte, C., Horton, H.F., Byrne, M.C., and Kamradt, T. (2000). Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol* *165*, 6107-6115.

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

Intlekofer, A.M., Takemoto, N., Wherry, E.J., Longworth, S.A., Northrup, J.T., Palanivel, V.R., Mullen, A.C., Gasink, C.R., Kaeck, S.M., Miller, J.D., *et al.* (2005). Effector and memory CD8+ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nat Immunol* *6*, 1236-1244.

Ishigame, H., Kakuta, S., Nagai, T., Kadoki, M., Nambu, A., Komiyama, Y., Fujikado, N., Tanahashi, Y., Akitsu, A., Kotaki, H., *et al.* (2009). Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucocutaneous bacterial infection and allergic responses. *Immunity* *30*, 108-119.

- Ivanov, II, Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E.L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K.C., Santee, C.A., Lynch, S.V., *et al.* (2009). Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* **139**, 485-498.
- Ivanov, II, Frutos Rde, L., Manel, N., Yoshinaga, K., Rifkin, D.B., Sartor, R.B., Finlay, B.B., and Littman, D.R. (2008). Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host Microbe* **4**, 337-349.
- Ivanov, II, McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J., and Littman, D.R. (2006). The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* **126**, 1121-1133.
- Jain, R., Chen, Y., Kanno, Y., Joyce-Shaikh, B., Vahedi, G., Hirahara, K., Blumenschein, W.M., Sukumar, S., Haines, C.J., Sadekova, S., *et al.* (2016). Interleukin-23-Induced Transcription Factor Blimp-1 Promotes Pathogenicity of T Helper 17 Cells. *Immunity* **44**, 131-142.
- Jancic, C., Savina, A., Wasmeier, C., Tolmachova, T., El-Benna, J., Dang, P.M., Pascolo, S., Gougerot-Pocidallo, M.A., Raposo, G., Seabra, M.C., *et al.* (2007). Rab27a regulates phagosomal pH and NADPH oxidase recruitment to dendritic cell phagosomes. *Nat Cell Biol* **9**, 367-378.
- Jiang, H., Zhang, S.I., and Pernis, B. (1992). Role of CD8+ T cells in murine experimental allergic encephalomyelitis. *Science* **256**, 1213-1215.
- Jin, L., Martynowski, D., Zheng, S., Wada, T., Xie, W., and Li, Y. (2010). Structural basis for hydroxycholesterols as natural ligands of orphan nuclear receptor ROR $\gamma$ . *Mol Endocrinol* **24**, 923-929.
- Joffre, O.P., Segura, E., Savina, A., and Amigorena, S. (2012). Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol* **12**, 557-569.
- Josien, R., Heslan, M., Brouard, S., Souillou, J.P., and Cuturi, M.C. (1998). Critical requirement for graft passenger leukocytes in allograft tolerance induced by donor blood transfusion. *Blood* **92**, 4539-4544.
- Kara, E.E., McKenzie, D.R., Bastow, C.R., Gregor, C.E., Fenix, K.A., Ogunniyi, A.D., Paton, J.C., Mack, M., Pombal, D.R., Seillet, C., *et al.* (2015). CCR2 defines in vivo development and homing of IL-23-driven GM-CSF-producing Th17 cells. *Nat Commun* **6**, 8644.
- Kaufmann, U., Shaw, P.J., Kozhaya, L., Subramanian, R., Gaida, K., Unutmaz, D., McBride, H.J., and Feske, S. (2016). Selective ORAI1 Inhibition Ameliorates Autoimmune Central Nervous System Inflammation by Suppressing Effector but Not Regulatory T Cell Function. *J Immunol* **196**, 573-585.
- Khader, S.A., Gaffen, S.L., and Kolls, J.K. (2009). Th17 cells at the crossroads of innate and adaptive immunity against infectious diseases at the mucosa. *Mucosal Immunol* **2**, 403-411.
- Kiessling, R., Klein, E., Pross, H., and Wigzell, H. (1975a). "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol* **5**, 117-121.
- Kiessling, R., Klein, E., and Wigzell, H. (1975b). "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol* **5**, 112-117.
- Kinugasa, T., Sakaguchi, T., Gu, X., and Reinecker, H.C. (2000). Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators. *Gastroenterology* **118**, 1001-1011.
- Kiss, E.A., Vonarbourg, C., Kopfmann, S., Hobeika, E., Finke, D., Esser, C., and Diefenbach, A. (2011). Natural aryl hydrocarbon receptor ligands control organogenesis of intestinal lymphoid follicles. *Science* **334**, 1561-1565.
- Kleinschek, M.A., Muller, U., Brodie, S.J., Stenzel, W., Kohler, G., Blumenschein, W.M., Straubinger, R.K., McClanahan, T., Kastelein, R.A., and Alber, G. (2006). IL-23 enhances the inflammatory cell response in *Cryptococcus neoformans* infection and induces a cytokine pattern distinct from IL-12. *J Immunol* **176**, 1098-1106.
- Klose, C.S., and Diefenbach, A. (2014). Transcription factors controlling innate lymphoid cell fate decisions. *Curr Top Microbiol Immunol* **381**, 215-255.
- Klose, C.S., Kiss, E.A., Schwierzeck, V., Ebert, K., Hoyler, T., d'Hargues, Y., Goppert, N., Croxford, A.L., Waisman, A., Tanriver, Y., *et al.* (2013). A T-bet gradient controls the fate and function of CCR6-ROR $\gamma$  innate lymphoid cells. *Nature* **494**, 261-265.
- Koh, D.R., Fung-Leung, W.P., Ho, A., Gray, D., Acha-Orbea, H., and Mak, T.W. (1992). Less mortality but more relapses in experimental allergic encephalomyelitis in CD8<sup>-/-</sup> mice. *Science* **256**, 1210-1213.

- Kolls, J.K., and Linden, A. (2004). Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* *21*, 467-476.
- Kondo, T., Takata, H., Matsuki, F., and Takiguchi, M. (2009). Cutting edge: Phenotypic characterization and differentiation of human CD8+ T cells producing IL-17. *J Immunol* *182*, 1794-1798.
- Korn, T., Anderson, A.C., Bettelli, E., and Oukka, M. (2007a). The dynamics of effector T cells and Foxp3+ regulatory T cells in the promotion and regulation of autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* *191*, 51-60.
- Korn, T., Bettelli, E., Gao, W., Awasthi, A., Jager, A., Strom, T.B., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. (2007b). IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* *448*, 484-487.
- Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* *27*, 485-517.
- Koslowski, M., Sahin, U., Dhaene, K., Huber, C., and Tureci, O. (2008). MS4A12 is a colon-selective store-operated calcium channel promoting malignant cell processes. *Cancer Res* *68*, 3458-3466.
- Kreymborg, K., Etzensperger, R., Dumoutier, L., Haak, S., Rebollo, A., Buch, T., Heppner, F.L., Renauld, J.C., and Becher, B. (2007). IL-22 is expressed by Th17 cells in an IL-23-dependent fashion, but not required for the development of autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* *179*, 8098-8104.
- Langley, R.G., Elewski, B.E., Lebwohl, M., Reich, K., Griffiths, C.E., Papp, K., Puig, L., Nakagawa, H., Spelman, L., Sigurgeirsson, B., *et al.* (2014). Secukinumab in plaque psoriasis--results of two phase 3 trials. *N Engl J Med* *371*, 326-338.
- Langrish, C.L., Chen, Y., Blumenschein, W.M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J.D., McClanahan, T., Kastelein, R.A., and Cua, D.J. (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* *201*, 233-240.
- Laudet, V. (1997). Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J Mol Endocrinol* *19*, 207-226.
- Laudet, V., and Adelmant, G. (1995). Nuclear receptors. Lonesome orphans. *Curr Biol* *5*, 124-127.
- Le Bourhis, L., Dusseaux, M., Bohineust, A., Bessoles, S., Martin, E., Premel, V., Core, M., Sleurs, D., Serriari, N.E., Treiner, E., *et al.* (2013). MAIT cells detect and efficiently lyse bacterially-infected epithelial cells. *PLoS Pathog* *9*, e1003681.
- Le Bourhis, L., Martin, E., Peguillet, I., Guihot, A., Froux, N., Core, M., Levy, E., Dusseaux, M., Meyssonier, V., Premel, V., *et al.* (2010). Antimicrobial activity of mucosal-associated invariant T cells. *Nat Immunol* *11*, 701-708.
- Le Gros, G., Ben-Sasson, S.Z., Seder, R., Finkelman, F.D., and Paul, W.E. (1990). Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *J Exp Med* *172*, 921-929.
- Lee, J.S., Cella, M., and Colonna, M. (2012a). AHR and the Transcriptional Regulation of Type-17/22 ILC. *Front Immunol* *3*, 10.
- Lee, J.S., Tato, C.M., Joyce-Shaikh, B., Gulen, M.F., Cayatte, C., Chen, Y., Blumenschein, W.M., Judo, M., Ayanoglu, G., McClanahan, T.K., *et al.* (2015a). Interleukin-23-Independent IL-17 Production Regulates Intestinal Epithelial Permeability. *Immunity* *43*, 727-738.
- Lee, Y., Awasthi, A., Yosef, N., Quintana, F.J., Xiao, S., Peters, A., Wu, C., Kleinewietfeld, M., Kunder, S., Hafler, D.A., *et al.* (2012b). Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nat Immunol* *13*, 991-999.
- Lee, Y., Mitsdoerffer, M., Xiao, S., Gu, G., Sobel, R.A., and Kuchroo, V.K. (2015b). IL-21R signaling is critical for induction of spontaneous experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* *125*, 4011-4020.
- Leonard, J.P., Waldburger, K.E., and Goldman, S.J. (1995). Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against interleukin 12. *J Exp Med* *181*, 381-386.
- Levine, S., and Sowers, R. (1973). Experimental allergic encephalomyelitis in inbred and outbred mice. *J Immunol* *110*, 139-143.
- Li, H., Chen, J., Huang, A., Stinson, J., Heldens, S., Foster, J., Dowd, P., Gurney, A.L., and Wood, W.I. (2000). Cloning and characterization of IL-17B and IL-17C, two new members of the IL-17 cytokine family. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 773-778.
- Li, M.O., Wan, Y.Y., and Flavell, R.A. (2007). T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity* *26*, 579-591.

- Liang, S.C., Tan, X.Y., Luxenberg, D.P., Karim, R., Dunussi-Joannopoulos, K., Collins, M., and Fouser, L.A. (2006). Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* **203**, 2271-2279.
- Lin, C.C., Bradstreet, T.R., Schwarzkopf, E.A., Jarjour, N.N., Chou, C., Archambault, A.S., Sim, J., Zinselmeyer, B.H., Carrero, J.A., Wu, G.F., *et al.* (2016). IL-1-induced Bhlhe40 identifies pathogenic T helper cells in a model of autoimmune neuroinflammation. *J Exp Med* **213**, 251-271.
- Littman, D.R., and Rudensky, A.Y. (2010). Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell* **140**, 845-858.
- Lo, W.L., Donermeyer, D.L., and Allen, P.M. (2012). A voltage-gated sodium channel is essential for the positive selection of CD4(+) T cells. *Nat Immunol* **13**, 880-887.
- Lochner, M., Peduto, L., Cherrier, M., Sawa, S., Langa, F., Varona, R., Riethmacher, D., Si-Tahar, M., Di Santo, J.P., and Eberl, G. (2008). In vivo equilibrium of proinflammatory IL-17+ and regulatory IL-10+ Foxp3+ RORgamma+ T cells. *J Exp Med* **205**, 1381-1393.
- Lohoff, M., Mittrucker, H.W., Prechtel, S., Bischof, S., Sommer, F., Kock, S., Ferrick, D.A., Duncan, G.S., Gessner, A., and Mak, T.W. (2002). Dysregulated T helper cell differentiation in the absence of interferon regulatory factor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11808-11812.
- Longphre, M., Li, D., Gallup, M., Drori, E., Ordonez, C.L., Redman, T., Wenzel, S., Bice, D.E., Fahy, J.V., and Basbaum, C. (1999). Allergen-induced IL-9 directly stimulates mucin transcription in respiratory epithelial cells. *J Clin Invest* **104**, 1375-1382.
- Louvet, C., Chiffolleau, E., Heslan, M., Tesson, L., Heslan, J.M., Brion, R., Beriou, G., Guillonnet, C., Khalife, J., Anegon, I., *et al.* (2005). Identification of a new member of the CD20/FcepsilonRIbeta family overexpressed in tolerated allografts. *Am J Transplant* **5**, 2143-2153.
- Luci, C., Reynders, A., Ivanov, I., Cognet, C., Chiche, L., Chasson, L., Hardwigsen, J., Anguiano, E., Banchereau, J., Chaussabel, D., *et al.* (2009). Influence of the transcription factor RORgamma on the development of NKp46+ cell populations in gut and skin. *Nat Immunol* **10**, 75-82.
- Lurton, J., Soto, H., Narayanan, A.S., and Raghu, G. (1999). Regulation of human lung fibroblast C1q-receptors by transforming growth factor-beta and tumor necrosis factor-alpha. *Exp Lung Res* **25**, 151-164.
- Mabuchi, T., Takekoshi, T., and Hwang, S.T. (2011). Epidermal CCR6+ gamma delta T cells are major producers of IL-22 and IL-17 in a murine model of psoriasisform dermatitis. *J Immunol* **187**, 5026-5031.
- Maeda, Y., Fujimura, L., J, O.W., Hatano, M., Sakamoto, A., Arima, M., Ebara, M., Ino, H., Yamashita, T., Saisho, H., *et al.* (2006). Role of *Clast1* in development of cerebellar granule cells. *Brain Res* **1104**, 18-26.
- Maeda, Y., Ide, T., Koike, M., Uchiyama, Y., and Kinoshita, T. (2008). GPHR is a novel anion channel critical for acidification and functions of the Golgi apparatus. *Nat Cell Biol* **10**, 1135-1145.
- Malfait, A.M., Butler, D.M., Presky, D.H., Maini, R.N., Brennan, F.M., and Feldmann, M. (1998). Blockade of IL-12 during the induction of collagen-induced arthritis (CIA) markedly attenuates the severity of the arthritis. *Clin Exp Immunol* **111**, 377-383.
- Manel, N., Unutmaz, D., and Littman, D.R. (2008). The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma. *Nat Immunol* **9**, 641-649.
- Mangan, P.R., Harrington, L.E., O'Quinn, D.B., Helms, W.S., Bullard, D.C., Elson, C.O., Hatton, R.D., Wahl, S.M., Schoeb, T.R., and Weaver, C.T. (2006). Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* **441**, 231-234.
- Mangelsdorf, D.J., and Evans, R.M. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* **83**, 841-850.
- Manichanh, C., Borruel, N., Casellas, F., and Guarner, F. (2012). The gut microbiota in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **9**, 599-608.
- Marigo, I., Bosio, E., Solito, S., Mesa, C., Fernandez, A., Dolcetti, L., Ugel, S., Sonda, N., Bicchato, S., Falisi, E., *et al.* (2010). Tumor-induced tolerance and immune suppression depend on the C/EBPbeta transcription factor. *Immunity* **32**, 790-802.
- McCullagh, P.J. (1970). The transfer of immunological competence to rats tolerant of sheep erythrocytes with lymphocytes from normal rats. *Aust J Exp Biol Med Sci* **48**, 351-367.

- McGeachy, M.J., Bak-Jensen, K.S., Chen, Y., Tato, C.M., Blumenschein, W., McClanahan, T., and Cua, D.J. (2007). TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol* **8**, 1390-1397.
- McGeachy, M.J., Chen, Y., Tato, C.M., Laurence, A., Joyce-Shaikh, B., Blumenschein, W.M., McClanahan, T.K., O'Shea, J.J., and Cua, D.J. (2009). The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nat Immunol* **10**, 314-324.
- 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.
- Mebius, R.E., Rennert, P., and Weissman, I.L. (1997). Developing lymph nodes collect CD4+CD3- LTbeta+ cells that can differentiate to APC, NK cells, and follicular cells but not T or B cells. *Immunity* **7**, 493-504.
- Mellman, I., and Steinman, R.M. (2001). Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* **106**, 255-258.
- Mendel, I., Katz, A., Kozak, N., Ben-Nun, A., and Revel, M. (1998). Interleukin-6 functions in autoimmune encephalomyelitis: a study in gene-targeted mice. *Eur J Immunol* **28**, 1727-1737.
- Merger, M., Viney, J.L., Borojevic, R., Steele-Norwood, D., Zhou, P., Clark, D.A., Riddell, R., Maric, R., Podack, E.R., and Croitoru, K. (2002). Defining the roles of perforin, Fas/FasL, and tumour necrosis factor alpha in T cell induced mucosal damage in the mouse intestine. *Gut* **51**, 155-163.
- Milner, J.D., Brenchley, J.M., Laurence, A., Freeman, A.F., Hill, B.J., Elias, K.M., Kanno, Y., Spalding, C., Elloumi, H.Z., Paulson, M.L., *et al.* (2008). Impaired T(H)17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-IgE syndrome. *Nature* **452**, 773-776.
- Mittrucker, H.W., Visekruna, A., and Huber, M. (2014). Heterogeneity in the differentiation and function of CD8(+) T cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **62**, 449-458.
- Moreau, A., Varey, E., Beriou, G., Hill, M., Bouchet-Delbos, L., Segovia, M., and Cuturi, M.C. (2012). Tolerogenic dendritic cells and negative vaccination in transplantation: from rodents to clinical trials. *Front Immunol* **3**, 218.
- Mortha, A., Chudnovskiy, A., Hashimoto, D., Bogunovic, M., Spencer, S.P., Belkaid, Y., and Merad, M. (2014). Microbiota-dependent crosstalk between macrophages and ILC3 promotes intestinal homeostasis. *Science* **343**, 1249288.
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., and Coffman, R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* **136**, 2348-2357.
- Mosmann, T.R., and Coffman, R.L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* **7**, 145-173.
- Mosmann, T.R., Sad, S., Krishnan, L., Wegmann, T.G., Guilbert, L.J., and Belosevic, M. (1995). Differentiation of subsets of CD4+ and CD8+ T cells. *Ciba Found Symp* **195**, 42-50; discussion 50-44.
- Najafian, N., Chitnis, T., Salama, A.D., Zhu, B., Benou, C., Yuan, X., Clarkson, M.R., Sayegh, M.H., and Khoury, S.J. (2003). Regulatory functions of CD8+CD28- T cells in an autoimmune disease model. *J Clin Invest* **112**, 1037-1048.
- Nakajima, H., Takenaka, M., Kaimori, J.Y., Nagasawa, Y., Kosugi, A., Kawamoto, S., Imai, E., Hori, M., and Okubo, K. (2002). Gene expression profile of renal proximal tubules regulated by proteinuria. *Kidney Int* **61**, 1577-1587.
- Nathan, C.F., Murray, H.W., Wiebe, M.E., and Rubin, B.Y. (1983). Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J Exp Med* **158**, 670-689.
- Nestle, F.O., Kaplan, D.H., and Barker, J. (2009). Psoriasis. *N Engl J Med* **361**, 496-509.
- Nicholson, L.B., Murtaza, A., Hafler, B.P., Sette, A., and Kuchroo, V.K. (1997). A T cell receptor antagonist peptide induces T cells that mediate bystander suppression and prevent autoimmune encephalomyelitis induced with multiple myelin antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9279-9284.
- Nurieva, R., Yang, X.O., Martinez, G., Zhang, Y., Panopoulos, A.D., Ma, L., Schluns, K., Tian, Q., Watowich, S.S., Jetten, A.M., *et al.* (2007). Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* **448**, 480-483.
- Ogawa, A., Andoh, A., Araki, Y., Bamba, T., and Fujiyama, Y. (2004). Neutralization of interleukin-17 aggravates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Clin Immunol* **110**, 55-62.

Ohnmacht, C., Marques, R., Presley, L., Sawa, S., Lochner, M., and Eberl, G. (2011). Intestinal microbiota, evolution of the immune system and the bad reputation of pro-inflammatory immunity. *Cell Microbiol* *13*, 653-659.

Okamoto, K., Iwai, Y., Oh-Hora, M., Yamamoto, M., Morio, T., Aoki, K., Ohya, K., Jetten, A.M., Akira, S., Muta, T., *et al.* (2010). I $\kappa$ B $\beta$  regulates T(H)17 development by cooperating with ROR nuclear receptors. *Nature* *464*, 1381-1385.

Okuda, Y., Sakoda, S., Bernard, C.C., Fujimura, H., Saeki, Y., Kishimoto, T., and Yanagihara, T. (1998). IL-6-deficient mice are resistant to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis provoked by myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Int Immunol* *10*, 703-708.

Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J.C., Xu, Y., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K., *et al.* (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*, 715-725.

Otsubo, T., Hida, Y., Ohga, N., Sato, H., Kai, T., Matsuki, Y., Takasu, H., Akiyama, K., Maishi, N., Kawamoto, T., *et al.* (2014). Identification of novel targets for antiangiogenic therapy by comparing the gene expressions of tumor and normal endothelial cells. *Cancer Sci* *105*, 560-567.

Panea, C., Farkas, A.M., Goto, Y., Abdollahi-Roodsaz, S., Lee, C., Koscsó, B., Gowda, K., Hohl, T.M., Bogunovic, M., and Ivanov, II (2015). Intestinal Monocyte-Derived Macrophages Control Commensal-Specific Th17 Responses. *Cell Rep* *12*, 1314-1324.

Pantelyushin, S., Haak, S., Ingold, B., Kulig, P., Heppner, F.L., Navarini, A.A., and Becher, B. (2012). Ror $\gamma$  innate lymphocytes and  $\gamma\delta$  T cells initiate psoriasiform plaque formation in mice. *J Clin Invest* *122*, 2252-2256.

Parisi, R., Symmons, D.P., Griffiths, C.E., Ashcroft, D.M., Identification, Management of, P., and Associated Comorbidity project, t. (2013). Global epidemiology of psoriasis: a systematic review of incidence and prevalence. *J Invest Dermatol* *133*, 377-385.

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

Paul, W.E., and Seder, R.A. (1994). Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* *76*, 241-251.

Pearce, E.L., Mullen, A.C., Martins, G.A., Krawczyk, C.M., Hutchins, A.S., Zediak, V.P., Banica, M., DiCioccio, C.B., Gross, D.A., Mao, C.A., *et al.* (2003). Control of effector CD8<sup>+</sup> T cell function by the transcription factor Eomesodermin. *Science* *302*, 1041-1043.

Pecche, H., Trinite, B., Martinet, B., and Cuturi, M.C. (2005). Prolongation of heart allograft survival by immature dendritic cells generated from recipient type bone marrow progenitors. *Am J Transplant* *5*, 255-267.

Perera, G.K., Di Meglio, P., and Nestle, F.O. (2012). Psoriasis. *Annu Rev Pathol* *7*, 385-422.

Perruche, S., Zhang, P., Liu, Y., Saas, P., Bluestone, J.A., and Chen, W. (2008). CD3-specific antibody-induced immune tolerance involves transforming growth factor- $\beta$  from phagocytes digesting apoptotic T cells. *Nat Med* *14*, 528-535.

Peters, A., Pitcher, L.A., Sullivan, J.M., Mitsdoerffer, M., Acton, S.E., Franz, B., Wucherpfennig, K., Turley, S., Carroll, M.C., Sobel, R.A., *et al.* (2011). Th17 cells induce ectopic lymphoid follicles in central nervous system tissue inflammation. *Immunity* *35*, 986-996.

Pham, T.A., Clare, S., Goulding, D., Arasteh, J.M., Stares, M.D., Browne, H.P., Keane, J.A., Page, A.J., Kumasaka, N., Kane, L., *et al.* (2014). Epithelial IL-22RA1-mediated fucosylation promotes intestinal colonization resistance to an opportunistic pathogen. *Cell Host Microbe* *16*, 504-516.

Pickard, J.M., Maurice, C.F., Kinnebrew, M.A., Abt, M.C., Schenten, D., Golovkina, T.V., Bogatyrev, S.R., Ismagilov, R.F., Pamer, E.G., Turnbaugh, P.J., *et al.* (2014). Rapid fucosylation of intestinal epithelium sustains host-commensal symbiosis in sickness. *Nature* *514*, 638-641.

Pickert, G., Neufert, C., Leppkes, M., Zheng, Y., Wittkopf, N., Warntjen, M., Lehr, H.A., Hirth, S., Weigmann, B., Wirtz, S., *et al.* (2009). STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *J Exp Med* *206*, 1465-1472.

Polyak, M.J., Li, H., Shariat, N., and Deans, J.P. (2008). CD20 homo-oligomers physically associate with the B cell antigen receptor. Dissociation upon receptor engagement and recruitment of phosphoproteins and calmodulin-binding proteins. *J Biol Chem* *283*, 18545-18552.

- 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.
- Powell, N., Lo, J.W., Biancheri, P., Vossenkamper, A., Pantazi, E., Walker, A.W., Stolarczyk, E., Ammoscato, F., Goldberg, R., Scott, P., *et al.* (2015). Interleukin 6 Increases Production of Cytokines by Colonic Innate Lymphoid Cells in Mice and Patients With Chronic Intestinal Inflammation. *Gastroenterology* *149*, 456-467 e415.
- Pross, H.F., and Jondal, M. (1975). Cytotoxic lymphocytes from normal donors. A functional marker of human non-T lymphocytes. *Clin Exp Immunol* *21*, 226-235.
- Qiu, J., Heller, J.J., Guo, X., Chen, Z.M., Fish, K., Fu, Y.X., and Zhou, L. (2012). The aryl hydrocarbon receptor regulates gut immunity through modulation of innate lymphoid cells. *Immunity* *36*, 92-104.
- Rahimpour, A., Koay, H.F., Enders, A., Clanchy, R., Eckle, S.B., Meehan, B., Chen, Z., Whittle, B., Liu, L., Fairlie, D.P., *et al.* (2015). Identification of phenotypically and functionally heterogeneous mouse mucosal-associated invariant T cells using MR1 tetramers. *J Exp Med* *212*, 1095-1108.
- Rengarajan, J., Mowen, K.A., McBride, K.D., Smith, E.D., Singh, H., and Glimcher, L.H. (2002). Interferon regulatory factor 4 (IRF4) interacts with NFATc2 to modulate interleukin 4 gene expression. *J Exp Med* *195*, 1003-1012.
- Ribot, J.C., deBarros, A., Pang, D.J., Neves, J.F., Peperzak, V., Roberts, S.J., Girardi, M., Borst, J., Hayday, A.C., Pennington, D.J., *et al.* (2009). CD27 is a thymic determinant of the balance between interferon-gamma- and interleukin 17-producing gammadelta T cell subsets. *Nat Immunol* *10*, 427-436.
- Robinette, M.L., Fuchs, A., Cortez, V.S., Lee, J.S., Wang, Y., Durum, S.K., Gilfillan, S., Colonna, M., and Immunological Genome, C. (2015). Transcriptional programs define molecular characteristics of innate lymphoid cell classes and subsets. *Nat Immunol* *16*, 306-317.
- Rouvier, E., Luciani, M.F., Mattei, M.G., Denizot, F., and Golstein, P. (1993). CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *J Immunol* *150*, 5445-5456.
- Ryu, S.H., Kim, K.H., Kim, H.B., Kim, M.H., Kim, N.H., Kang, Y., Hyun, J.W., Seo, H.J., Jun, J.Y., and You, H.J. (2010). Oncogenic Ras-mediated downregulation of Clast1/LR8 is involved in Ras-mediated neoplastic transformation and tumorigenesis in NIH3T3 cells. *Cancer Sci* *101*, 1990-1996.
- Sakaguchi, M., Kato, H., Nishiyori, A., Sagawa, K., and Itoh, K. (1995). Characterization of CD4+ T helper cells in patients with Kawasaki disease (KD): preferential production of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) by V beta 2- or V beta 8- CD4+ T helper cells. *Clin Exp Immunol* *99*, 276-282.
- Salio, M., Silk, J.D., Jones, E.Y., and Cerundolo, V. (2014). Biology of CD1- and MR1-restricted T cells. *Annu Rev Immunol* *32*, 323-366.
- Samoilova, E.B., Horton, J.L., Hilliard, B., Liu, T.S., and Chen, Y. (1998). IL-6-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: roles of IL-6 in the activation and differentiation of autoreactive T cells. *J Immunol* *161*, 6480-6486.
- Sandborn, W.J., Gasink, C., Gao, L.L., Blank, M.A., Johans, J., Guzzo, C., Sands, B.E., Hanauer, S.B., Targan, S., Rutgeerts, P., *et al.* (2012). Ustekinumab induction and maintenance therapy in refractory Crohn's disease. *N Engl J Med* *367*, 1519-1528.
- Sands, K., Jansen, R., Zaslau, S., and Greenwald, D. (2015). Review article: the safety of therapeutic drugs in male inflammatory bowel disease patients wishing to conceive. *Aliment Pharmacol Ther* *41*, 821-834.
- Sanos, S.L., Bui, V.L., Mortha, A., Oberle, K., Heners, C., Johner, C., and Diefenbach, A. (2009). RORgamma and commensal microflora are required for the differentiation of mucosal interleukin 22-producing NKp46+ cells. *Nat Immunol* *10*, 83-91.
- Satoh-Takayama, N., Vosschenrich, C.A., Lesjean-Pottier, S., Sawa, S., Lochner, M., Rattis, F., Mention, J.J., Thiam, K., Cerf-Bensussan, N., Mandelboim, O., *et al.* (2008). Microbial flora drives interleukin 22 production in intestinal NKp46+ cells that provide innate mucosal immune defense. *Immunity* *29*, 958-970.
- Savina, A., Jancic, C., Hugues, S., Guernonprez, P., Vargas, P., Moura, I.C., Lennon-Dumenil, A.M., Seabra, M.C., Raposo, G., and Amigorena, S. (2006). NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells. *Cell* *126*, 205-218.



- Sawa, S., Lochner, M., Satoh-Takayama, N., Dulauroy, S., Berard, M., Kleinschek, M., Cua, D., Di Santo, J.P., and Eberl, G. (2011). RORgammat+ innate lymphoid cells regulate intestinal homeostasis by integrating negative signals from the symbiotic microbiota. *Nat Immunol* *12*, 320-326.
- Schraml, B.U., Hildner, K., Ise, W., Lee, W.L., Smith, W.A., Solomon, B., Sahota, G., Sim, J., Mukasa, R., Cemerski, S., *et al.* (2009). The AP-1 transcription factor Batf controls T(H)17 differentiation. *Nature* *460*, 405-409.
- Segovia, M., Cuturi, M.C., and Hill, M. (2011). Preparation of mouse bone marrow-derived dendritic cells with immunoregulatory properties. *Methods Mol Biol* *677*, 161-168.
- Segovia, M., Louvet, C., Charnet, P., Savina, A., Tilly, G., Gautreau, L., Carretero-Iglesia, L., Beriou, G., Cebrian, I., Cens, T., *et al.* (2014). Autologous dendritic cells prolong allograft survival through Tmem176b-dependent antigen cross-presentation. *Am J Transplant* *14*, 1021-1031.
- Seo, S.K., Choi, J.H., Kim, Y.H., Kang, W.J., Park, H.Y., Suh, J.H., Choi, B.K., Vinay, D.S., and Kwon, B.S. (2004). 4-1BB-mediated immunotherapy of rheumatoid arthritis. *Nat Med* *10*, 1088-1094.
- Serafini, N., Klein Wolterink, R.G., Satoh-Takayama, N., Xu, W., Vossenrich, C.A., Hendriks, R.W., and Di Santo, J.P. (2014). Gata3 drives development of RORgammat+ group 3 innate lymphoid cells. *J Exp Med* *211*, 199-208.
- Shui, W., Sheu, L., Liu, J., Smart, B., Petzold, C.J., Hsieh, T.Y., Pitcher, A., Keasling, J.D., and Bertozzi, C.R. (2008). Membrane proteomics of phagosomes suggests a connection to autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 16952-16957.
- Sonderegger, I., Kisielow, J., Meier, R., King, C., and Kopf, M. (2008). IL-21 and IL-21R are not required for development of Th17 cells and autoimmunity in vivo. *Eur J Immunol* *38*, 1833-1838.
- Sonnenberg, G.F., and Artis, D. (2012). Innate lymphoid cell interactions with microbiota: implications for intestinal health and disease. *Immunity* *37*, 601-610.
- Sonnenberg, G.F., and Artis, D. (2015). Innate lymphoid cells in the initiation, regulation and resolution of inflammation. *Nat Med* *21*, 698-708.
- Sonnenberg, G.F., Monticelli, L.A., Alenghat, T., Fung, T.C., Hutnick, N.A., Kunisawa, J., Shibata, N., Grunberg, S., Sinha, R., Zahm, A.M., *et al.* (2012). Innate lymphoid cells promote anatomical containment of lymphoid-resident commensal bacteria. *Science* *336*, 1321-1325.
- Sonnenberg, G.F., Monticelli, L.A., Elloso, M.M., Fouser, L.A., and Artis, D. (2011). CD4(+) lymphoid tissue-inducer cells promote innate immunity in the gut. *Immunity* *34*, 122-134.
- Soroosh, P., Wu, J., Xue, X., Song, J., Sutton, S.W., Sablad, M., Yu, J., Nelen, M.I., Liu, X., Castro, G., *et al.* (2014). Oxysterols are agonist ligands of RORgammat and drive Th17 cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *111*, 12163-12168.
- Soulillou, J.P., Blandin, F., Gunther, E., and Lemoine, V. (1984). Genetics of the blood transfusion effect on heart allografts in rats. *Transplantation* *38*, 63-67.
- Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N., Mebius, R.E., *et al.* (2013). Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol* *13*, 145-149.
- Starnes, T., Broxmeyer, H.E., Robertson, M.J., and Hromas, R. (2002). Cutting edge: IL-17D, a novel member of the IL-17 family, stimulates cytokine production and inhibits hemopoiesis. *J Immunol* *169*, 642-646.
- Starnes, T., Robertson, M.J., Sledge, G., Kelich, S., Nakshatri, H., Broxmeyer, H.E., and Hromas, R. (2001). Cutting edge: IL-17F, a novel cytokine selectively expressed in activated T cells and monocytes, regulates angiogenesis and endothelial cell cytokine production. *J Immunol* *167*, 4137-4140.
- Stromnes, I.M., and Goverman, J.M. (2006). Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc* *1*, 1810-1819.
- Sugimoto, K., Ogawa, A., Mizoguchi, E., Shimomura, Y., Andoh, A., Bhan, A.K., Blumberg, R.S., Xavier, R.J., and Mizoguchi, A. (2008). IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J Clin Invest* *118*, 534-544.
- Sun, Z., Unutmaz, D., Zou, Y.R., Sunshine, M.J., Pierani, A., Brenner-Morton, S., Mebius, R.E., and Littman, D.R. (2000). Requirement for RORgamma in thymocyte survival and lymphoid organ development. *Science* *288*, 2369-2373.
- Sutton, C.E., Lalor, S.J., Sweeney, C.M., Brereton, C.F., Lavelle, E.C., and Mills, K.H. (2009). Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity* *31*, 331-341.

- Suzuki, Y., Orellana, M.A., Schreiber, R.D., and Remington, J.S. (1988). Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science* *240*, 516-518.
- Swain, S.L., Weinberg, A.D., English, M., and Huston, G. (1990). IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J Immunol* *145*, 3796-3806.
- 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.
- Tada, T., Takemori, T., Okumura, K., Nonaka, M., and Tokuhiya, T. (1978). Two distinct types of helper T cells involved in the secondary antibody response: independent and synergistic effects of Ia- and Ia+ helper T cells. *J Exp Med* *147*, 446-458.
- Takayama, T., Kamada, N., Chinen, H., Okamoto, S., Kitazume, M.T., Chang, J., Matuzaki, Y., Suzuki, S., Sugita, A., Koganei, K., *et al.* (2010). Imbalance of NKp44(+)NKp46(-) and NKp44(-)NKp46(+) natural killer cells in the intestinal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* *139*, 882-892, 892 e881-883.
- Talham, G.L., Jiang, H.Q., Bos, N.A., and Cebra, J.J. (1999). Segmented filamentous bacteria are potent stimuli of a physiologically normal state of the murine gut mucosal immune system. *Infect Immun* *67*, 1992-2000.
- Tesson, L., Usal, C., Menoret, S., Leung, E., Niles, B.J., Remy, S., Santiago, Y., Vincent, A.I., Meng, X., Zhang, L., *et al.* (2011). Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. *Nat Biotechnol* *29*, 695-696.
- Thaci, D., Blauvelt, A., Reich, K., Tsai, T.F., Vanaclocha, F., Kingo, K., Ziv, M., Pinter, A., Hugot, S., You, R., *et al.* (2015). Secukinumab is superior to ustekinumab in clearing skin of subjects with moderate to severe plaque psoriasis: CLEAR, a randomized controlled trial. *J Am Acad Dermatol* *73*, 400-409.
- Tilloy, F., Treiner, E., Park, S.H., Garcia, C., Lemonnier, F., de la Salle, H., Bendelac, A., Bonneville, M., and Lantz, O. (1999). An invariant T cell receptor alpha chain defines a novel TAP-independent major histocompatibility complex class Ib-restricted alpha/beta T cell subpopulation in mammals. *J Exp Med* *189*, 1907-1921.
- Tran, E.H., Prince, E.N., and Owens, T. (2000). IFN-gamma shapes immune invasion of the central nervous system via regulation of chemokines. *J Immunol* *164*, 2759-2768.
- Travis, M.A., Reizis, B., Melton, A.C., Masteller, E., Tang, Q., Proctor, J.M., Wang, Y., Bernstein, X., Huang, X., Reichardt, L.F., *et al.* (2007). Loss of integrin alpha(v)beta8 on dendritic cells causes autoimmunity and colitis in mice. *Nature* *449*, 361-365.
- Trombetta, E.S., Ebersold, M., Garrett, W., Pypaert, M., and Mellman, I. (2003). Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation. *Science* *299*, 1400-1403.
- Trost, M., English, L., Lemieux, S., Courcelles, M., Desjardins, M., and Thibault, P. (2009). The phagosomal proteome in interferon-gamma-activated macrophages. *Immunity* *30*, 143-154.
- Urban, J.F., Jr., Noben-Trauth, N., Donaldson, D.D., Madden, K.B., Morris, S.C., Collins, M., and Finkelman, F.D. (1998). IL-13, IL-4Ralpha, and Stat6 are required for the expulsion of the gastrointestinal nematode parasite *Nippostrongylus brasiliensis*. *Immunity* *8*, 255-264.
- Van Belle, A.B., de Heusch, M., Lemaire, M.M., Hendrickx, E., Warnier, G., Dunussi-Joannopoulos, K., Fouser, L.A., Renaud, J.C., and Dumoutier, L. (2012). IL-22 is required for imiquimod-induced psoriasiform skin inflammation in mice. *J Immunol* *188*, 462-469.
- van der Fits, L., Mourits, S., Voerman, J.S., Kant, M., Boon, L., Laman, J.D., Cornelissen, F., Mus, A.M., Floencia, E., Prens, E.P., *et al.* (2009). Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *J Immunol* *182*, 5836-5845.
- Veldhoen, M., Hirota, K., Westendorf, A.M., Buer, J., Dumoutier, L., Renaud, J.C., and Stockinger, B. (2008). The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* *453*, 106-109.
- Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J., Locksley, R.M., and Stockinger, B. (2006). TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* *24*, 179-189.
- Villares, R., Cadenas, V., Lozano, M., Almonacid, L., Zaballo, A., Martinez, A.C., and Varona, R. (2009). CCR6 regulates EAE pathogenesis by controlling regulatory CD4+ T-cell recruitment to target tissues. *Eur J Immunol* *39*, 1671-1681.
- Volpe, E., Servant, N., Zollinger, R., Bogiatzi, S.I., Hupe, P., Barillot, E., and Soumelis, V. (2008). A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat Immunol* *9*, 650-657.

- Vonarbourg, C., Mortha, A., Bui, V.L., Hernandez, P.P., Kiss, E.A., Hoyler, T., Flach, M., Bengsch, B., Thimme, R., Holscher, C., *et al.* (2010). Regulated expression of nuclear receptor ROR $\gamma$  confers distinct functional fates to NK cell receptor-expressing ROR $\gamma$ (+) innate lymphocytes. *Immunity* *33*, 736-751.
- Wagner, E.F., Schonhaler, H.B., Guinea-Viniegra, J., and Tschachler, E. (2010). Psoriasis: what we have learned from mouse models. *Nat Rev Rheumatol* *6*, 704-714.
- Walker, J.A., Barlow, J.L., and McKenzie, A.N. (2013). Innate lymphoid cells--how did we miss them? *Nat Rev Immunol* *13*, 75-87.
- Wan, C.K., Li, P., Spolski, R., Oh, J., Andraski, A.B., Du, N., Yu, Z.X., Dillon, C.P., Green, D.R., and Leonard, W.J. (2015). IL-21-mediated non-canonical pathway for IL-1 $\beta$  production in conventional dendritic cells. *Nat Commun* *6*, 7988.
- Wang, C., Yosef, N., Gaublot, J., Wu, C., Lee, Y., Clish, C.B., Kaminski, J., Xiao, S., Meyer Zu Horste, G., Pawlak, M., *et al.* (2015). CD5L/AIM Regulates Lipid Biosynthesis and Restrains Th17 Cell Pathogenicity. *Cell* *163*, 1413-1427.
- Wang, Y., Han, K.J., Pang, X.W., Vaughan, H.A., Qu, W., Dong, X.Y., Peng, J.R., Zhao, H.T., Rui, J.A., Leng, X.S., *et al.* (2002). Large scale identification of human hepatocellular carcinoma-associated antigens by autoantibodies. *J Immunol* *169*, 1102-1109.
- Wang, Y., Kumar, N., Crumbley, C., Griffin, P.R., and Burris, T.P. (2010). A second class of nuclear receptors for oxysterols: Regulation of ROR $\alpha$  and ROR $\gamma$  activity by 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol). *Biochim Biophys Acta* *1801*, 917-923.
- Wang, Z., Friedrich, C., Hagemann, S.C., Korte, W.H., Goharani, N., Cording, S., Eberl, G., Sparwasser, T., and Lochner, M. (2014). Regulatory T cells promote a protective Th17-associated immune response to intestinal bacterial infection with *C. rodentium*. *Mucosal Immunol* *7*, 1290-1301.
- Wilson, N.J., Boniface, K., Chan, J.R., McKenzie, B.S., Blumenschein, W.M., Mattson, J.D., Basham, B., Smith, K., Chen, T., Morel, F., *et al.* (2007). Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* *8*, 950-957.
- Wirtz, S., Neufert, C., Weigmann, B., and Neurath, M.F. (2007). Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protoc* *2*, 541-546.
- Withers, D.R., Hepworth, M.R., Wang, X., Mackley, E.C., Halford, E.E., Dutton, E.E., Marriott, C.L., Brucklacher-Waldert, V., Veldhoen, M., Kelsen, J., *et al.* (2016). Transient inhibition of ROR- $\gamma$  therapeutically limits intestinal inflammation by reducing TH17 cells and preserving group 3 innate lymphoid cells. *Nat Med* *22*, 319-323.
- Xavier, R.J., and Podolsky, D.K. (2007). Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* *448*, 427-434.
- Xu, T., Wang, X., Zhong, B., Nurieva, R.I., Ding, S., and Dong, C. (2011). Ursolic acid suppresses interleukin-17 (IL-17) production by selectively antagonizing the function of ROR $\gamma$  t protein. *J Biol Chem* *286*, 22707-22710.
- Yadav, M., Louvet, C., Davini, D., Gardner, J.M., Martinez-Llordella, M., Bailey-Bucktrout, S., Anthony, B.A., Sverdrup, F.M., Head, R., Kuster, D.J., *et al.* (2012). Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. *J Exp Med* *209*, 1713-1722, S1711-1719.
- Yagi, R., Zhong, C., Northrup, D.L., Yu, F., Bouladoux, N., Spencer, S., Hu, G., Barron, L., Sharma, S., Nakayama, T., *et al.* (2014). The transcription factor GATA3 is critical for the development of all IL-7R $\alpha$ -expressing innate lymphoid cells. *Immunity* *40*, 378-388.
- Yamazaki, T., Yang, X.O., Chung, Y., Fukunaga, A., Nurieva, R., Pappu, B., Martin-Orozco, N., Kang, H.S., Ma, L., Panopoulos, A.D., *et al.* (2008). CCR6 regulates the migration of inflammatory and regulatory T cells. *J Immunol* *181*, 8391-8401.
- Yang, X.O., Nurieva, R., Martinez, G.J., Kang, H.S., Chung, Y., Pappu, B.P., Shah, B., Chang, S.H., Schluns, K.S., Watowich, S.S., *et al.* (2008). Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity* *29*, 44-56.
- Yang, X.O., Panopoulos, A.D., Nurieva, R., Chang, S.H., Wang, D., Watowich, S.S., and Dong, C. (2007). STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J Biol Chem* *282*, 9358-9363.
- Yano, M., Kawao, N., Tamura, Y., Okada, K., and Kaji, H. (2014). A novel factor, Tmem176b, induced by activin-like kinase 2 signal promotes the differentiation of myoblasts into osteoblasts. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* *122*, 7-14.
- Yao, Z., Fanslow, W.C., Seldin, M.F., Rousseau, A.M., Painter, S.L., Comeau, M.R., Cohen, J.I., and Spriggs, M.K. (1995). Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity* *3*, 811-821.

- Yates, S.F., Paterson, A.M., Nolan, K.F., Cobbold, S.P., Saunders, N.J., Waldmann, H., and Fairchild, P.J. (2007). Induction of regulatory T cells and dominant tolerance by dendritic cells incapable of full activation. *J Immunol* *179*, 967-976.
- Yen, D., Cheung, J., Scheerens, H., Poulet, F., McClanahan, T., McKenzie, B., Kleinschek, M.A., Owyang, A., Mattson, J., Blumenschein, W., *et al.* (2006). IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest* *116*, 1310-1316.
- Yen, H.R., Harris, T.J., Wada, S., Grosso, J.F., Getnet, D., Goldberg, M.V., Liang, K.L., Bruno, T.C., Pyle, K.J., Chan, S.L., *et al.* (2009). Tc17 CD8 T cells: functional plasticity and subset diversity. *J Immunol* *183*, 7161-7168.
- Yoon, J.H., Sudo, K., Kuroda, M., Kato, M., Lee, I.K., Han, J.S., Nakae, S., Imamura, T., Kim, J., Ju, J.H., *et al.* (2015). Phosphorylation status determines the opposing functions of Smad2/Smad3 as STAT3 cofactors in TH17 differentiation. *Nat Commun* *6*, 7600.
- Zanvit, P., Konkell, J.E., Jiao, X., Kasagi, S., Zhang, D., Wu, R., Chia, C., Ajami, N.J., Smith, D.P., Petrosino, J.F., *et al.* (2015). Antibiotics in neonatal life increase murine susceptibility to experimental psoriasis. *Nat Commun* *6*, 8424.
- Zelante, T., De Luca, A., Bonifazi, P., Montagnoli, C., Bozza, S., Moretti, S., Belladonna, M.L., Vacca, C., Conte, C., Mosci, P., *et al.* (2007). IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance. *Eur J Immunol* *37*, 2695-2706.
- Zhang, F., Meng, G., and Strober, W. (2008). Interactions among the transcription factors Runx1, RORgammat and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol* *9*, 1297-1306.
- Zheng, W., and Flavell, R.A. (1997). The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* *89*, 587-596.
- Zheng, Y., Danilenko, D.M., Valdez, P., Kasman, I., Eastham-Anderson, J., Wu, J., and Ouyang, W. (2007). Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature* *445*, 648-651.
- Zheng, Y., Valdez, P.A., Danilenko, D.M., Hu, Y., Sa, S.M., Gong, Q., Abbas, A.R., Modrusan, Z., Ghilardi, N., de Sauvage, F.J., *et al.* (2008). Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat Med* *14*, 282-289.
- Zhou, L., Ivanov, I., Spolski, R., Min, R., Shenderov, K., Egawa, T., Levy, D.E., Leonard, W.J., and Littman, D.R. (2007). IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* *8*, 967-974.
- Zhou, L., Lopes, J.E., Chong, M.M., Ivanov, I., Min, R., Victora, G.D., Shen, Y., Du, J., Rubtsov, Y.P., Rudensky, A.Y., *et al.* (2008). TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function. *Nature* *453*, 236-240.
- Zhu, J., and Paul, W.E. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* *112*, 1557-1569.
- Zuccolo, J., Bau, J., Childs, S.J., Goss, G.G., Sensen, C.W., and Deans, J.P. (2010). Phylogenetic analysis of the MS4A and TMEM176 gene families. *PLoS One* *5*, e9369.
- Zuniga, L.A., Jain, R., Haines, C., and Cua, D.J. (2013). Th17 cell development: from the cradle to the grave. *Immunol Rev* *252*, 78-88.

# Thèse de Doctorat

Lucile DRUJONT

Etude de nouveaux acteurs de l'immunité de type 17 à travers l'exploration du rôle des canaux ioniques TMEM176A et B dans les cellules ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>

Study of new actors of type 17 immunity through the exploration of the role of the ion channels TMEM176A et B in ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> cells

## Résumé

Le récepteur nucléaire d'hormone ROR $\gamma$ t est un facteur de transcription clé qui orchestre la différenciation des cellules Th17 mais aussi définit les cellules T $\gamma$  $\delta$ 17 et les Cellules Lymphoïdes Innées du groupe 3 (ILC3s). Notre avons identifié TMEM176B, une protéine à quatre domaines transmembranaires qui interagit avec son homologue TMEM176A de structure identique. Des expériences d'électrophysiologie ont révélé que TMEM176A et B fonctionnent comme des canaux ioniques et peuvent s'hétérodimériser. Ces deux homologues font partie des rares cibles directes de ROR $\gamma$ t. Nous avons prouvé que ces deux gènes sont hautement exprimés dans les cellules Th17 murines générées in vitro en comparaison des Th1, Th2 ou iTregs. Cette observation s'applique aussi aux Th17 humains et corrèle avec leurs niveaux de *RORC* ou *IL17A*. Nous avons aussi démontré que *Tmem176a* et *b* sont fortement exprimés dans les ILC3s et les cellules T $\gamma$  $\delta$ 17, nous avons donc émis l'hypothèse que ces deux gènes pourraient jouer un rôle crucial dans le développement de pathologies autoimmunes dépendantes des cellules ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>. En effet, les souris déficientes en *Tmem176b* sont partiellement mais significativement protégées des lésions psoriasiformes. Ces résultats suggèrent que la délétion des deux gènes serait requise pour élucider clairement leur rôle. Nous avons généré avec succès une souris double KO et avons débuté l'étude de l'impact de cette double déficience en conditions non-pathologiques et sur des modèles d'inflammation. En parallèle, nous avons trouvé que les protéines TMEM176A et B sont fortement associées avec l'appareil de Golgi, mettant ainsi en évidence de nouveaux mécanismes potentiels de modifications post-traductionnelles ou du trafic intracellulaires dans lesquels ces canaux ioniques pourraient être impliqués. Nous pensons que l'étude de TMEM176A et B peut permettre la mise en lumière de nouvelles voies spécifiques de la biologie des cellules ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> qui pourraient être manipulées en thérapeutique.

## Mots clés :

TMEM176A, TMEM176B, ROR $\gamma$ t, Th17, ILC3, Flux ioniques, Autoimmunité, Immunité de type 17

## Abstract

The nuclear hormone receptor ROR $\gamma$ t is the key transcription factor that orchestrates the differentiation of Th17 cells but also defines  $\gamma$  $\delta$ T17 cells and group 3 Innate Lymphoid Cells (ILC3s). We identified TMEM176B, a four-span transmembrane protein that interacts with its structurally identical homolog protein TMEM176A. Electrophysiological experiments revealed that TMEM176A and B function as cation channels and can heteromerize to exert their function. Strikingly, these two homologs were found among the few direct targets of ROR $\gamma$ t. We show that both genes are highly expressed in vitro-generated mouse Th17 cells compared to Th1, Th2 or iTregs. We also observed that human Th17 cells strongly express *TMEM176A* and *B* mRNA, correlating with the level of *RORC* or *IL17A*. We further demonstrate that *Tmem176a* and *b* are highly expressed in ILC3s and  $\gamma$  $\delta$ T17 cells. We thus hypothesized that these genes could play a crucial role in the development of a variety of autoimmune diseases dependent on ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> cells. In this regard, *Tmem176b*-deficient mice were partially but significantly protected from psoriasis-like lesions when compared to control mice. These results suggest that the deletion of both genes may be required to clearly elucidate their role. We have successfully generated a double KO mouse and started to assess the impact of this double deficiency in the steady states as well as in models of inflammation. In parallel, we found that TMEM176A and B protein localizations are strongly linked to the Golgi apparatus, thus highlighting novel potential mechanisms of post-translational modifications or intracellular trafficking in which these cation channels could be involved. We believe that the study of TMEM176A and B will help decipher novel specific pathways of the ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> cell biology that could be therapeutically manipulated.

## Key Words :

TMEM176A, TMEM176B, ROR $\gamma$ t, Th17, ILC3, Ion fluxes, Autoimmunity, Type 17 immunity