

Thèse de Doctorat

Jérôme MARTIN

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : *Biologie-Santé*

Discipline : *Sciences de la vie et de la santé*

Spécialité : *Immunologie*

Unité de recherche : *INSERM UMR_S1064*

Soutenu le *15/12/2014*

Thèse N° :

Sources cellulaires, régulation et fonctions de l'inhibiteur soluble de l'interleukine 22, l'interleukine 22 binding protein (IL-22BP)

JURY

Rapporteurs : **Nadine CERF-BENSUSSAN**, Dr, INSERM UMR_S1163
Dominique BAETEN, Pr, Academic Medical Center, Université d'Amsterdam

Examineurs : **Gilles BLANCHO**, Pr, Université de Nantes
Jean-Christophe RENAULD, Pr, Université catholique de Louvain
Tamara MATYSIAK-BUDNIK, Pr, Université de Nantes

Directeur de Thèse : **Régis JOSIEN**, Pr, Université de Nantes

Table des matières

Liste des abréviations.....	iii
Liste des figures	v
Introduction	1
1 Généralités sur les cytokines de la famille de l'IL-10	1
2 L'axe IL-22/IL-22R.....	3
2.1 Gène et protéine de l'interleukine 22	3
2.2 Gènes et protéines des sous-unités du récepteur de l'IL-22.....	4
2.3 Voies de signalisation induites par l'IL-22R.....	7
2.4 Distribution de l'IL-22R	8
2.5 Sources cellulaires de l'interleukine 22	10
2.5.1 Production par le système immunitaire inné.....	10
2.5.2 Production par le système immunitaire adaptatif.....	20
2.6 Propriétés biologiques de l'axe IL-22/IL-22R.....	23
2.6.1 Renforcement et réparation des barrières épithéliales.....	23
2.6.2 Actions de l'IL-22 dans le foie et le pancréas.....	35
2.6.3 Actions de l'IL-22 sur les reins.....	41
2.7 Rôle de l'IL-22 en immunopathologie	42
2.7.1 Pathologies inflammatoires cutanées.....	42
2.7.2 Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin	50
2.7.3 Pathologies rhumatologiques	54
2.7.4 Cancer	57
2.7.5 Conclusion sur le rôle de l'IL-22 en immunopathologie.....	61
3 L'interleukine 22 <i>binding protein</i>	63
3.1 Gène et protéine de l'IL-22BP	63

3.1.1	L'IL-22BP humaine	63
3.1.2	L'IL-22BP de souris et de rat.....	66
3.2	Distribution tissulaire de l'IL-22BP.....	67
3.3	Sources cellulaires d'IL-22BP	67
3.4	Propriétés physico-chimiques de l'IL-22BP.....	68
3.5	Données biologiques sur l'IL-22BP.....	69
Objectifs du projet		71
Résultats		73
Article 1 : « L'IL-22BP est exprimée constitutivement par une sous-population de cellules dendritiques et est fortement induite par l'acide rétinoïque »		73
Résultat complémentaire de l'article 1		100
Article 2: “L'interleukine 22 <i>binding protein</i> endogène inhibe les actions protectrices de l'interleukine 22 au cours de la colite aigue ”		101
Résultats additionnels : Rôle de l'IL-22BP dans le modèle de lésions psoriasiformes induites par l'Aldara®		152
Discussion et perspectives		155
Références bibliographiques		164
Annexes		193
Annexe 1 : Rôles émergents de l'IL-17 et des lymphocytes Th17 dans la physiopathologie du lupus systémique		193
Annexe 2 : Liste des publications.....		205

Liste des abréviations

AA : acide aminé
AHR : aryl hydrocarbon receptor
AOM : azoxyméthane
cDCs : cellules dendritiques conventionnelles
CHC : carcinome hépatocellulaire
CLA : cutaneous lymphocyte antigen
CMC : candidoses cutanéomuqueuses
Con A : concanavaline A
CRC : cancer colorectal
CRF2 : class II family of cytokines receptors
CSI : cellule souche intestinale
DIO : diet-induced obesity
DSS : dextran sodium sulfate
FBN-III : fibronectine III
FLS : fibroblast-like synoviocytes
GVHD : graft versus host disease
IFI : immunofluorescence indirecte
IFN : interféron
IHC : immunohistochimie
IL-22 : interleukine-22
IL-22BP : interleukine-22 binding protein
ILCs : innate lymphoid cells
iNKT : invariant natural killer T cells
JAK : Janus kinase
LTBR : lymphotoxin beta receptor
Lti : lymphoid tissue inducer
LT α 1 β 2 : lymphotoxin alpha 1 beta 2
MAPK : mitogen-activated protein kinase
MC : maladie de Crohn
MICI : maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
MMP : matrix metalloproteases
MoDC : monocyte-derived dendritic cells

mTOR : mammalian target of Rapamycin
NCR : natural cytotoxicity receptor
NK : natural killer
OLS : organes lymphoïdes secondaires
PAMs : peptides antimicrobiens
PCR : polymerase chain reaction
PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase
PNN : polynucléaires neutrophiles
PR : polyarthrite rhumatoïde
qPCR : quantitative polymerase chain reaction
RAG : recombination activating gene
RANK : receptor activator of nuclear factor kappa-B
RANKL : receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
RARs : retinoic acid receptors
RCH : rectocolite hémorragique
ROR γ t : retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma t
SFB : segmented filamentous bacteria
SH2 : src homology 2 domain
STAT : signal transducers and activators of transcription
Th : T helper
TILs : tumor infiltrating lymphocytes
TLR : toll-like receptor
TNBS : trinitrobenzene sulfonic acid
TYK2 : tyrosine kinase 2
UTR : untranslated region

Liste des figures

Figure 1 : Structure tridimensionnelle du monomère d'IL-22.

Figure 2 : Représentation schématique des récepteurs pour les cytokines de classe II.

Figure 3 : Interaction de l'IL-22 avec l'IL-22R et voies de signalisation résultantes.

Figure 4 : Distribution tissulaire des 2 chaînes de l'IL-22R

Figure 5 : Classification des ILCs.

Figure 6 : Mécanismes de contrôle de la flore commensale mis en jeu par le système immunitaire muqueux intestinal.

Figure 7 : Principales actions protectrices proposées pour l'IL-22 au cours d'une infection intestinale par une bactérie extracellulaire.

Figure 8 : Principales actions protectrices proposées pour l'IL-22 au cours de l'atteinte hépatique.

Figure 9 : Principales actions de l'IL-22 au cours du psoriasis.

Figure 10 : Phylogénie et structure du gène *IL22RA2*.

Figure 11 : Structure cristallographique du complexe issu de l'interaction entre l'IL-22BP et l'IL-22.

Figure 12 : L'IL-22BP est fortement exprimée par les cDCs du colon de rat.

Figure 13 : L'absence d'IL-22BP majore la sévérité des lésions psoriasiformes induites par l'Aldara®.

Figure 14 : L'absence d'IL-22BP se traduit par une exacerbation de l'inflammation de l'oreille au cours de l'application d'Aldara®.

Figure 15 : Expression d'IL-22BP et d'IL-22 dans la peau de patients atteints de dermatite atopique.

Figure 16 : Influence de la flore commensale sur le développement de pathologies inflammatoires extra-digestives.

Introduction

1 Généralités sur les cytokines de la famille de l'IL-10

L'IL-22 fait partie des cytokines de la famille de l'IL-10. Cette famille, très étroitement liée à la famille des interférons (IFNs), représente la plus abondante des familles de cytokines de classe II. La définition des familles de cytokines de classe II a reposé initialement sur la capacité de ses membres à interagir avec les récepteurs aux cytokines de classe II (*class II family of cytokines receptors* ou CRF2). Ces derniers sont de nature hétérodimérique et transmembranaire, constitués de l'association d'une chaîne présentant un domaine intracytoplasmique long (IL-10R1, IL-20R1, IL-22R1 et IL-28R) avec une chaîne à domaine intracytoplasmique court (IL-10R2 et IL-20R2). (Renauld 2003). Ils se distinguent des récepteurs de classe I par leur structure, particulièrement au niveau de leur domaine extracellulaire.

La constitution de la famille des cytokines apparentées à l'IL-10 repose sur les similarités retrouvées au niveau de l'organisation de leurs gènes, de leurs structures protéiques secondaires (plus que sur une homologie des séquences d'acides aminés, qui n'excède jamais 25%), ainsi donc que sur l'utilisation de récepteurs communs (Wolk et al. 2010). Les cytokines de la famille de l'IL-10 peuvent être encore subdivisées en 3 sous-groupes, essentiellement en fonction de leurs activités biologiques respectives et dont les caractéristiques générales sont résumées dans le **Tableau 1**. (Ouyang et al., 2010). Le premier groupe comprend uniquement l'IL-10. Elle agit sur divers types de leucocytes et tend principalement à réguler les réponses inflammatoires. Le second groupe, comprend les cytokines de la sous-famille de l'IL-20, à savoir l'IL-19, l'IL-20, l'IL-24, l'IL-26 et l'IL-22. Ce groupe de cytokines agit préférentiellement sur des cellules épithéliales pour les protéger des agressions liées à des germes extracellulaires (bactéries, levures). Ces protéines interviennent également dans le remodelage tissulaire et la cicatrisation. Ces actions permettent le maintien de l'intégrité et la restauration de l'homéostasie tissulaire au cours des infections et des réponses inflammatoires. Le 3^{ème} groupe enfin, est représenté par les IFNs de type III (aussi dénommés IFNs λ) et comprend l'IL-28A, l'IL-28B et l'IL-29. Ces cytokines induisent des réponses antivirales similaires à celles induites par les IFNs de type I (α/β) mais

agissent avant tout sur les cellules épithéliales. Elles peuvent en outre agir en synergie avec les IFNs type I et accentuer les réponses antivirales de l'hôte.

Nom	Structure	Récepteur		Sources cellulaires	Cibles cellulaires	Fonctions majeures	
		Chaîne α	Chaîne β				
IL-10	Dimère	IL-10R1	IL-10R2	Leucocytes	Leucocytes	Immunorégulation	
IL-19	Monomère	IL-20R1	IL-20R2	Cellules myéloïdes, cellules épithéliales	Cellules épithéliales	Réponses antibactériennes, remodelage tissulaire, cicatrisation	
IL-20	Monomère	IL-20R1/IL-22R1					
IL-22	Monomère	IL-22R1	IL-10R2	Lymphocytes T, cellules lymphoïdes innées			
IL-24	Monomère	IL-20R1/IL-22R1	IL-20R2	Cellules myéloïdes, cellules épithéliales, Lymphocytes T CD4 ⁺ Th2			
IL-26	Dimère ?	IL-20R1	IL-10R2	Lymphocytes T, NKT, cellules lymphoïdes innées			
IL-28A	Monomère	IL-28R1		Cellules épithéliales			Réponses antivirales
IL-28B	Monomère						
IL-29	Monomère						

Tableau 1 : Principales caractéristiques des cytokines de la famille de l'IL10, d'après Ouyang et al., 2010.

2 L'axe IL-22/IL-22R

2.1 Gène et protéine de l'interleukine 22

L'IL-22 a été identifiée en 2000 dans une lignée murine de lymphome T, au cours de recherches visant à mettre en évidence les gènes surexprimés après stimulation par l'IL-9 (Dumoutier et al. 2000a). L'équivalent humain a été identifié quelques mois après, par 2 équipes différentes (Dumoutier et al. 2000b; Xie et al. 2000). L'IL-22 a rapidement été considérée comme une cytokine du fait de plusieurs caractéristiques. Il peut notamment être mentionné la présence d'un peptide signal hydrophobe de 33 acides aminés (AA), situé à l'extrémité N-terminale, une masse moléculaire proche de 20 kDa ainsi qu'une homologie, bien que faible, avec la structure primaire de l'IL-10. Le gène codant pour l'IL-22 humaine est situé sur le bras long du chromosome 12, en 12q15, à proximité des *loci IFNG3* et *IL26*. Il comprend 5 exons codants, et conduit à la formation d'une protéine de 179 AA, qui après excision du peptide signal aboutit donc à la sécrétion d'une protéine de 146 AA.

La structure tridimensionnelle de la cytokine (**Figure 1**) a pu être élucidée de façon indépendante par 2 groupes grâce à des expériences de cristallographie sur des protéines exprimées dans *Escherichia coli* (Nagem et al., 2002) et *Drosophila melanogaster* (Xu et al., 2004). La structure de l'IL-22 comprend une petite hélice 3_{10} N-terminal (hélice preA) et 6 hélices α (A à F) organisées dans une conformation anti-parallèle et reliées entre elles par des boucles. Le cœur de la protéine est constitué d'un « fagot » caractéristique des cytokines de classe II, formé par les hélices A, C, D et F. L'hélice B est beaucoup plus courte que les autres et se serre au niveau de l'extrémité N-terminale de l'hélice C. L'hélice E, quant à elle, se lie au « fagot » en interagissant avec les hélices B et C ainsi qu'avec la boucle AB. Finalement, contrairement aux hélices A à E qui sont droites, l'hélice F présente un coude caractéristique des cytokines de cette famille qui la divise en 2 parties (F1 et F2), permettant l'exposition de résidus importants pour l'interaction avec le récepteur (Trivella et al., 2010). La structure de la protéine est en outre stabilisée par 2 ponts disulfures (Cys40-Cys132 et Cys89-Cys178). L'IL-22 possède 3 sites de N-glycosylation (Asn54, Asn68 et Asn97) dont 2 étaient glycosylés (Asn54 et Asn97) dans la structure cristallographique issue de *D. melanogaster* mais ne semblaient induire que des changements mineurs dans la structure tertiaire de la protéine (Xu et al., 2004). La glycosylation au niveau de l'Asn54 est nécessaire à l'interaction de la cytokine avec son récepteur. Finalement, l'IL-22 semble être active biologiquement sous la forme de monomères bien que des dimères voir des tétramères aient pu être observées pour

des concentrations élevées (Logsdon et al., 2002; Nagem et al., 2002; de Oliveira Neto et al., 2008).

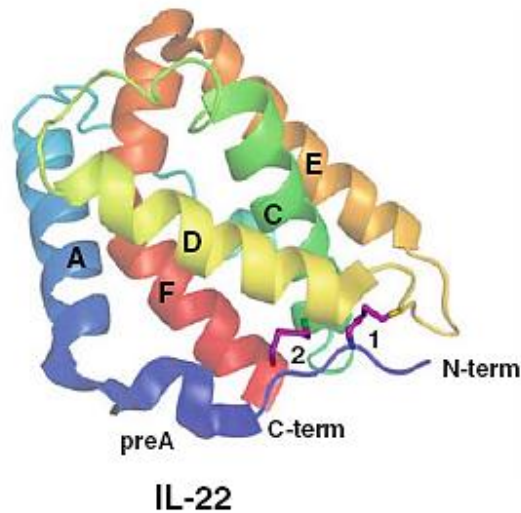


Figure 1 : Structure tridimensionnelle du monomère d'IL-22. Les hélices sont nommées (preA, A-F) et les ponts disulfures sont représentés en violet (Trivella et al, 2010).

2.2 Gènes et protéines des sous-unités du récepteur de l'IL-22

Le récepteur de l'IL-22 (IL-22R) est un hétérodimère composé de l'association de 2 membres de la famille CRF2, l'IL-22R1 et l'IL-10R2 (Dumoutier et al., 2000b; Kotenko et al., 2001a; Xie et al., 2000). La famille CRF2 est définie par des similarités au niveau de la portion extracellulaire de chacun de ses membres, caractérisée notamment par la présence de 2 domaines fibronectine III (FBN-III) en tandem. Elle se distingue des récepteurs hématopoïétiques et des récepteurs aux cytokines de classe I par la position des séquences cystéines conservées et l'absence de motif W-S-X-W-S (Renauld, 2003). Les différents membres de cette famille et leur structure sont représentés dans la **Figure 2**.

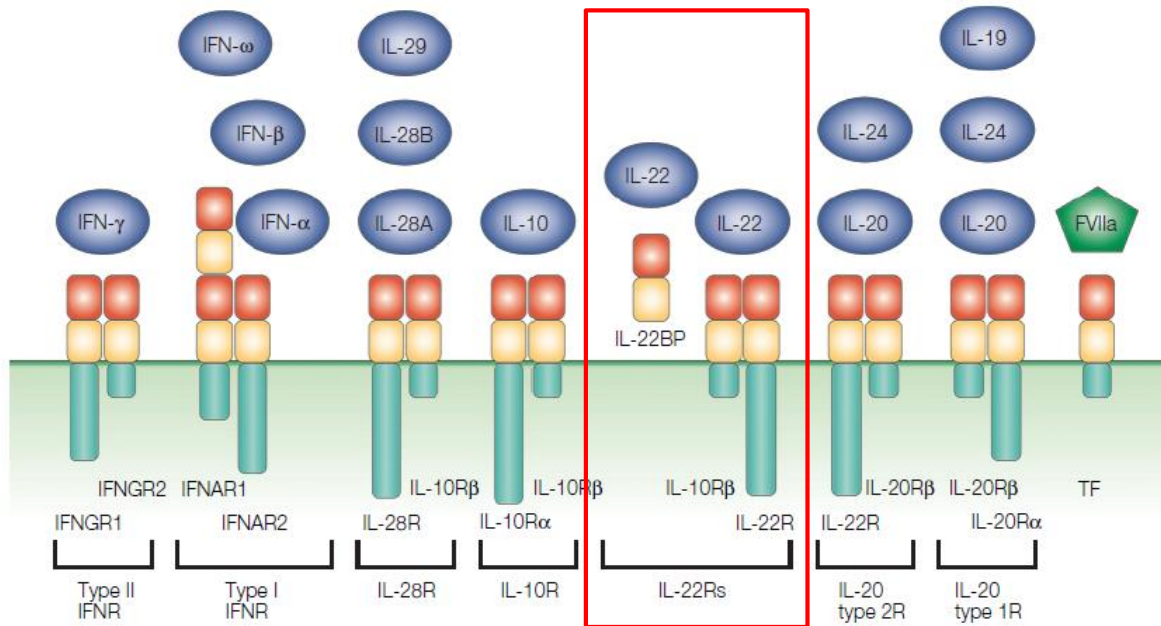


Figure 2: Représentation schématique des récepteurs pour les cytokines de classe II. Les ligands sont représentés au-dessus de leurs récepteurs respectifs. Les domaines cytoplasmiques sont représentés en vert (IFN γ R1, IFN α R2, IL-10R1, IL-20R1, IL-22R1 et IL-28R : domaine long ; IL-10R2 et IL-20R2, IFN γ R2, IFN α R1 : domaine court). Les 2 domaines FBN-III, qui comprennent le site de liaison cytokinique, sont illustrés en rouge et orange). A l'exception de l'IL-22BP et du facteur tissulaire (TF), les récepteurs sont hétérodimériques, constitués de l'association d'une chaîne à domaine intra-cytoplasmique long et d'une à domaine court. Il peut être souligné que contrairement à la plupart des récepteurs de cette famille, l'association de l'IL-22R1 avec l'IL-10R2, formant l'IL-22R, ainsi que l'IL-22BP, entourés en rouge, sont spécifiques d'un ligand unique, l'IL-22 (Renauld, 2003).

Le gène codant pour la chaîne IL-22R1 est localisé sur le chromosome 1p36, comprend 7 exons, s'étend sur environ 24 kb et code pour une protéine de 574 AA dont les 15 premiers correspondent au peptide signal. Le gène codant pour la chaîne IL-10R2 est quant à lui localisé sur le chromosome 21q21, comprend 7 exons, s'étend sur environ 31 kb et code pour une protéine de 325 AA dont les 19 premiers correspondent au peptide signal. Les expériences de cristallographie ont confirmé la présence de 2 domaines FBN-III en tandem sur les portions extracellulaires de chacune des 2 chaînes, nommés D1 pour le domaine N-terminal, et D2 pour celui proche de la membrane cellulaire (Bleicher et al., 2008; Jones et al., 2008; Yoon et al., 2010). Chacun de ces domaines est constitué de 2 feuillets β antiparallèles organisés en sandwich. Ils sont associés par une petite hélice 3_{10} et espacés d'un angle de 120° pour l'IL-22R1 et 95° pour l'IL-10R2. Il existe 3 sites potentiels de N-glycosylation sur la partie extracellulaire de la chaîne IL-22R1 et 4 sur celle de la chaîne IL-10R2. Des différences structurales localisées au niveau des boucles L2 et L5 (Yoon et al., 2010) semblent expliquer la faible affinité que présente l'IL-10R2 pour l'IL-22 en comparaison de

l'IL-22R1 (Logsdon et al., 2004). En revanche l'IL-10R2 présente une affinité plus forte pour le complexe IL-22:IL-22R1 suggérant ainsi que l'interaction de l'IL-22 avec son récepteur se fasse en plusieurs étapes. L'interaction débiterait d'abord par une fixation de l'IL-22 à l'IL-22R1, induisant alors un changement de conformation de la cytokine favorisant l'interaction du complexe IL-22:IL-22R1 avec l'IL-10R2 (**Figure 3**).

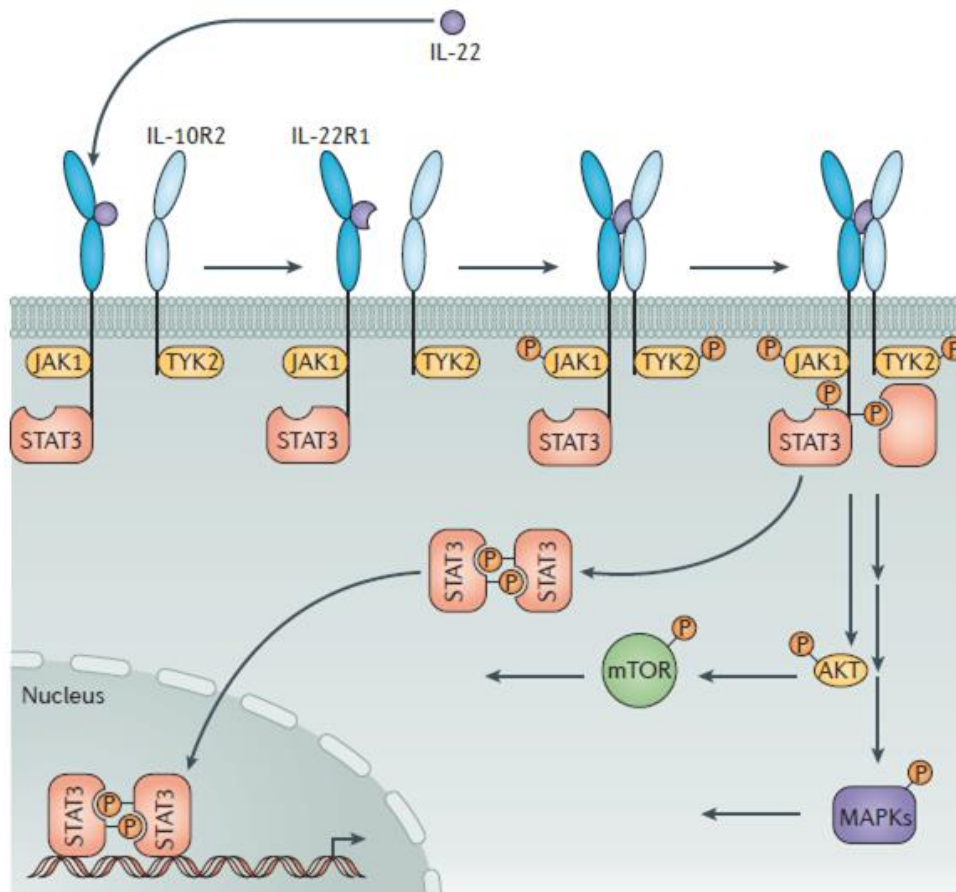


Figure 3: Interaction de l'IL-22 avec l'IL-22R et voies de signalisation résultantes. L'IL-22 interagit d'abord avec la chaîne IL-22R1 dont l'affinité est plus importante. Il s'en suit un changement de conformation de l'IL-22 lui conférant une affinité suffisante pour se lier à l'IL-10R2. La formation de ce complexe ternaire permet la phosphorylation des tyrosines kinases JAK1 et TYK2 associées respectivement aux chaînes IL-22R1 et IL-10R2. Il s'en suit alors la phosphorylation de 4 résidus tyrosines présents dans la portion intra-cytoplasmique de la chaîne IL-22R1 leur permettant de se lier aux domaines SH2 de STAT3. Ce dernier peut par ailleurs être retrouvé constitutivement associé à la chaîne IL-22R1. Les molécules STAT3 sont ensuite phosphorylées par JAK1 ce qui permet leur dimérisation et leur migration dans le noyau pour exercer leur fonction de régulation de l'expression de gènes. Un rôle des molécules STAT1 et STAT5 peut également être retrouvé. Finalement, la voie des MAPK et une voie impliquant la PI3K, AKT et mTOR pourraient également être impliquées (Sabat et al., 2014).

2.3 Voies de signalisation induites par l'IL-22R

L'activation de différentes cascades de signalisation intracellulaire a pu être observée suite à la fixation de l'IL-22 sur l'IL-22R. La principale fait intervenir la voie JAK-STAT (*Janus kinase-signal transducers and activators of transcription*) (**Figure 3**) (Lejeune et al., 2002). L'IL-22 interagit d'abord avec la chaîne IL-22R1 dont l'affinité est plus importante. Il s'en suit un changement de conformation de l'IL-22 lui conférant une affinité suffisante pour se lier à l'IL-10R2. La formation de ce complexe ternaire permet la phosphorylation des tyrosines kinases JAK1 et TYK2 (Tyrosine kinase 2) associées respectivement aux chaînes IL-22R1 et IL-10R2 et ainsi la phosphorylation de 4 résidus tyrosines présents dans la portion intra-cytoplasmique de la chaîne IL-22R1. Ces résidus phosphorylés peuvent alors interagir avec les domaines SH2 (*src homology 2 domain*) des molécules STATs et les recruter. Parallèlement, une interaction constitutive du domaine *coiled-coil* (faisceau d'hélices) de STAT3 avec l'extrémité C-terminale de la portion intra-cytoplasmique de la chaîne IL-22R1 existe (Dumoutier et al., 2009). Le recrutement de STAT permet ensuite sa phosphorylation par la tyrosine kinase JAK1 activée. La molécule STAT la plus importante dans la voie de signalisation induite par l'IL-22 est STAT3 (Lejeune et al., 2002), même si les molécules STAT1 et STAT5 peuvent aussi être phosphorylées (Dumoutier et al., 2000a, 2000b; Kotenko et al., 2001a; Lejeune et al., 2002; Xie et al., 2000). L'acétylation du résidu Lys686 est un préalable nécessaire à la phosphorylation de STAT3 au niveau du résidu Tyr705 (Yuan et al., 2005) et l'action de la sirtuine 1, une désacétylase, empêche donc l'activation de STAT3 induite par l'IL-22 (Sestito et al., 2011). Finalement, les molécules de STAT3 phosphorylées peuvent dimériser et migrer dans le noyau pour réguler l'expression de leurs gènes cibles. Les autres voies ayant été décrites suite à l'activation de l'IL-22R par l'IL-22 sont les 3 principales voies des MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) (Andoh et al., 2005; Ikeuchi et al., 2005; Lejeune et al., 2002; Wolk et al., 2006) et la cascade de signalisation PI3K/Akt/mTOR (*phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt/mammalian target of Rapamycin*) (Mitra et al., 2012a). Leurs rôles dans la signalisation intracellulaire consécutive à l'activation de l'IL-22R semblent toutefois moins importants que celui de la voie JAK1/STAT3.

2.4 Distribution de l'IL-22R

Le récepteur de l'IL-22 est composé de l'association des 2 chaînes IL-22R1 et IL-10R2 décrites précédemment. Par conséquent, seules les cellules les exprimant ensemble peuvent être sensibles à la cytokine. Alors que l'IL-10R2 est d'expression relativement ubiquitaire, celle de l'IL-22R1 est quant à elle beaucoup plus restreinte. C'est donc cette restriction d'expression de la chaîne IL-22R1 qui détermine les cibles de l'IL-22 (Wolk et al., 2004). L'expression de l'IL-22R complet est finalement retrouvée dans un nombre assez limité de tissus, principalement représentés par les barrières épithéliales de l'organisme. Parmi celles-ci, la peau ainsi que les tractus digestif (estomac, intestin grêle et colon) et respiratoire (poumon, trachée) sont les plus importants. L'IL-22R est également retrouvé au niveau du foie, du pancréas et des reins (**Figure 4**).

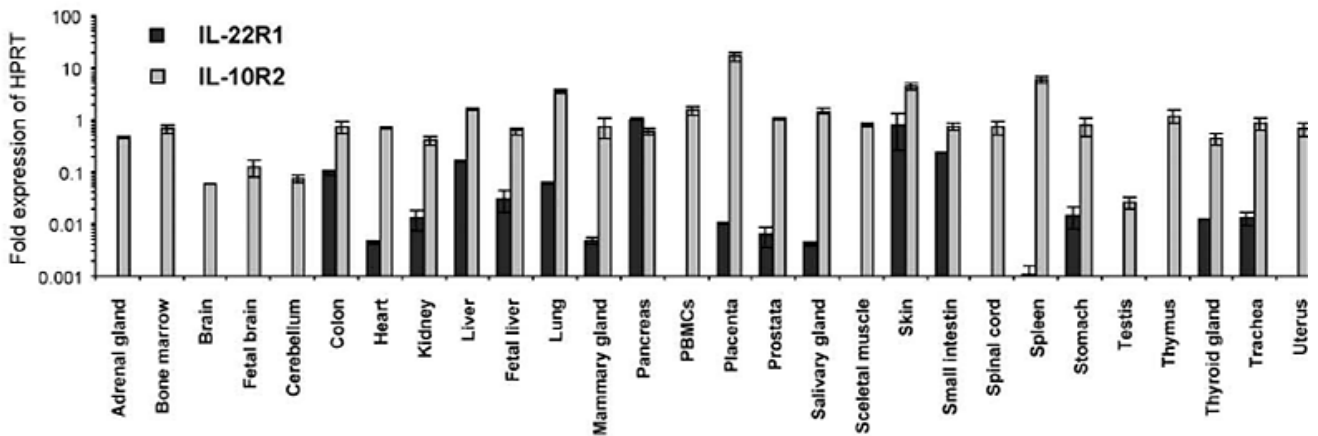


Figure 4: Distribution tissulaire des 2 chaînes de l'IL-22R (Wolk et al., 2004).

Dans l'intestin et les poumons, l'IL-22 agit sur les cellules épithéliales, incluant les cellules souches intestinales (Andoh et al., 2005; Aujla et al., 2008; Hanash et al., 2012; Sugimoto et al., 2008; Whittington et al., 2004), même si une expression du récepteur a également été décrite sur les myofibroblastes sous-épithéliaux dans le colon (Andoh et al., 2005). La signification physiologique réelle de cette dernière est toutefois incertaine du fait des fortes concentrations d'IL-22 utilisées *in vitro* pour les stimuler. Dans la peau, les cibles majeures sont les kératinocytes (Boniface et al., 2005; Sa et al., 2007), bien qu'une expression limitée du récepteur soit aussi détectable dans les fibroblastes du derme (Wolk et al., 2009a). De hauts niveaux d'expression de l'IL-22R sont aussi détectés dans les hépatocytes (Radaeva et al., 2004), les cellules acineuses et des îlots β du pancréas (Aggarwal et al., 2001; Shioya et al., 2008) ainsi que dans les cellules épithéliales des tubules rénaux proximaux (Xu et al.,

2014a) et les cellules épithéliales thymiques (Dudakov et al., 2012). Une expression par les *fibroblast-like synoviocytes* (FLS) est également observée dans la polyarthrite rhumatoïde (Ikeuchi et al., 2005). Il est particulièrement important de souligner qu'aucune expression de l'IL-22R1 n'a pu être retrouvée à la surface de cellules hématopoïétiques, au repos ou après stimulation (Wolk et al., 2002, 2004). L'IL-22 est donc une cytokine agissant très majoritairement sur les cellules épithéliales, notamment au niveau des tissus de barrières, mais pas sur les cellules immunitaires qui en sont la principale source (**cf section 2.5**). Ceci lui confère donc un rôle majeur de médiateur entre les systèmes immunitaire et épithéliaux. Ce dogme général doit toutefois être nuancé par quelques observations indiquant une expression possible de l'IL-22R par des cellules hématopoïétiques en situations pathologiques. A titre d'exemple, une étude a démontré l'induction de l'expression de l'IL-22R1 à la surface de monocytes/macrophages dans un modèle murin d'uvéite auto-immune, ce qui leur conférerait des propriétés régulatrices nécessaires au contrôle de la maladie (Ke et al., 2011). Un autre travail a quant à lui décrit une expression de l'IL-22R par les macrophages du tissu adipeux de patients diabétiques de type 2 et obèses (Dalmas et al., 2014). Dans cette étude les auteurs suggéraient que l'IL-22 produite par les lymphocytes T CD4⁺ pourrait participer à l'entretien de l'inflammation du tissu adipeux en induisant la production d'IL-1 β par les macrophages IL-22R⁺.

2.5 Sources cellulaires de l'interleukine 22

Les sources cellulaires de l'IL-22 sont uniquement représentées par des cellules du système immunitaire (Wolk et al. 2004). Pour autant elles sont relativement variées et dépendent du tissu et du contexte associés à sa production. Elles peuvent être schématiquement divisées en sources innées et adaptatives.

2.5.1 Production par le système immunitaire inné

Une production d'IL-22 par les cellules immunitaires innées a été évoquée dès sa description initiale, du fait de la sécrétion observée par les mastocytes stimulés par l'IL-9 (Dumoutier et al., 2000a). Il a par la suite été suggéré que la cytokine pourrait être sécrétée par les lymphocytes *natural killer* (NK) chez l'homme et chez la souris (Wolk et al. 2002; Zenewicz et al. 2008), ainsi que par les cellules dendritiques conventionnelles (cDC) (Zheng et al. 2008). Cependant, il semble que la principale source innée d'IL-22 soit en fait liée à sa production par certains membres d'une famille émergente, les cellules lymphoïdes innées (ILCs pour *innate lymphoid cells*) (Walker et al., 2013). L'expression possible, pour certaines ILCs productrices d'IL-22, de récepteurs cellulaires habituellement rattachés aux lymphocytes NK, ainsi que divers marqueurs de cellules myéloïdes comme le CD11c, a nécessairement imposé la reconsidération d'une production réelle par les cellules NK conventionnelles ou par les cDC. Il ne peut par conséquent être exclu que les premiers systèmes expérimentaux considérant une sécrétion d'IL-22 par ces cellules aient pu être contaminés par différentes populations d'ILCs (Zenewicz et al., 2008; Zheng et al., 2008). Cependant, à la lumière de ces considérations, deux rapports récents soulignent une contribution importante fournie par les NK conventionnels dans la production d'IL-22 dans des modèles d'infections pulmonaires à Influenza virus et *Klebsiella pneumoniae* (Kumar et al., 2012; Xu et al., 2014b). En revanche, de l'avis même du groupe qui l'avait initialement suggérée, la participation des cDC à la production d'IL-22 semble finalement improbable (Rutz et al., 2013).

2.5.1.1 Données générales sur les cellules lymphoïdes innées

Les ILCs constituent une famille de cellules hématopoïétiques, spécialisée dans la production de cytokines. Leur localisation préférentielle au niveau des barrières épithéliales, ainsi que l'absence de réarrangement d'un récepteur antigénique spécifique, permettent à ces cellules de produire rapidement une première vague de cytokines en réponse à un signal lui-même cytokinique. Les profils cytokiniques produits dépendent du type d'ILC mis en jeu et

miment ceux habituellement rattachés aux sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires effecteurs (Th pour T *helper*). Ce mimétisme est d'autant plus renforcé que les ILCs partagent en outre l'expression de facteurs de transcription importants avec leurs équivalents respectifs au sein des lymphocytes Th (T-bet pour les ILCs du groupe 1 et les Th1 ; GATA3 pour les ILCs du groupe 2 et les Th2 ; RORγt pour les ILCs du groupe 3 et les Th17). Il semble donc que les ILCs représentent le pendant inné des spécialisations fonctionnelles retrouvées pour les lymphocytes T CD4⁺, favorisant ainsi la création d'un environnement cytokinique spécialisé et cordonné entre les réponses innées et adaptatives (**Figure 5**). Par conséquent, les ILCs exercent des rôles importants dans les réponses immunitaires innées anti-microbiennes, le remodelage et le maintien de l'homéostasie tissulaire, ainsi que pour certaines, dans l'organogénèse des tissus lymphoïdes (Spits et al., 2013).

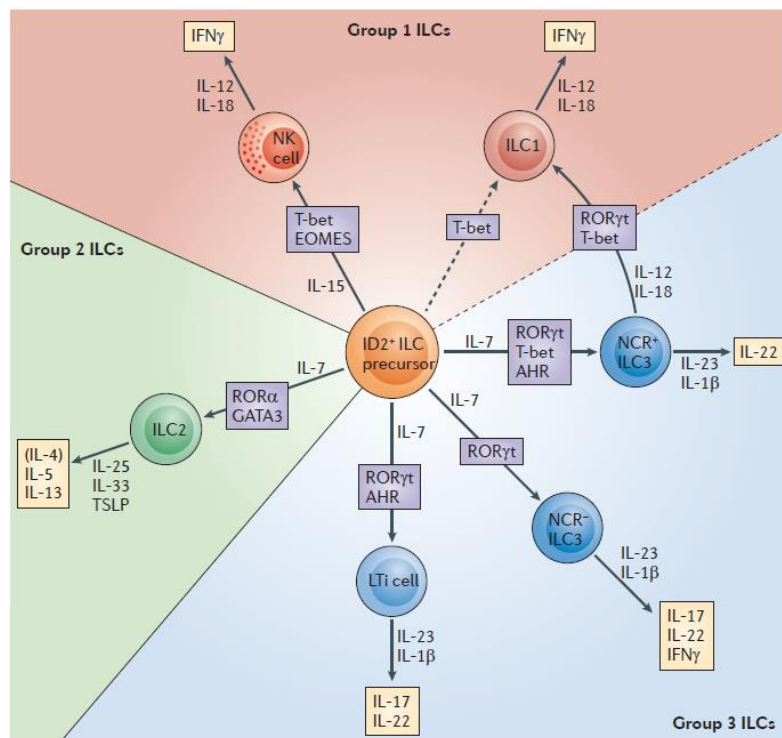


Figure 5: Classification des ILCs. La classification des ILCs repose sur des critères fonctionnels associés à leurs profils de sécrétion cytokinique. Le groupe 1 produit de l'IFN- γ et comprend les lymphocytes NK et les ILC1. Le groupe 2 produit des cytokines de type Th2 (la production d'IL-4 n'étant retrouvée que chez l'homme) et comprend uniquement les ILC2. Le groupe 3 produit des cytokines de type Th17 (IL-17 et IL-22 essentiellement bien que certains membres puissent également sécréter de l'IFN- γ et du GM-CSF) et comprend les LTi (*lymphoid tissue-inducer*) d'une part et les ILC3 d'autre part. Ces derniers sont eux-mêmes subdivisés en 2 groupes selon qu'ils expriment ou non des récepteurs de type NK (ILC3 NCR⁺ et ILC3 NCR⁻). D'après Spits et al., 2013.

Le regroupement des ILCs au sein d'une même famille a d'abord reposé sur des caractéristiques fonctionnelles, leur classification étant basée sur les profils de sécrétion propres à chacun de ses membres. Néanmoins, l'absence d'expression de marqueurs de lignées hématopoïétiques communes ($\text{TCR}\alpha\beta$, $\text{TCR}\gamma\delta$, CD3, CD19, CD20, CD14...), leur différenciation et survie dépendantes de la chaîne γ_c (appartenant aux récepteurs des cytokines IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 et IL-21), et le fait que leur développement implique nécessairement l'expression du régulateur négatif de transcription Id2 et la signalisation Notch, sont autant de caractéristiques partagées ayant fait suggérer l'existence d'un précurseur hématopoïétique propre à ces différentes populations et dérivant du progéniteur lymphoïde commun (Walker et al., 2013). Abondant dans ce sens, un travail récent fait état de l'existence d'une population rare $\text{Id2}^+ \alpha_4\beta_7^+ \text{Lin}^- \text{IL-7Ra}^+$ dans la moelle osseuse de souris et dont le transfert adoptif permet la génération de la plupart des ILCs. Ce précurseur a été en conséquence dénommé ChILP pour *common helper ILC precursor* (Klose et al., 2014).

2.5.1.2 Cellules lymphoïdes innées du groupe 3

Les ILCs capables de produire de l'IL-22 appartiennent exclusivement au groupe 3, dont la définition repose sur la capacité de ses membres à produire de l'IL-17 et/ou de l'IL-22 (Spits et al., 2013). Ces cellules dépendent en outre toutes du facteur de transcription ROR γ t (Sawa et al., 2010). Le groupe 3 des ILCs se divise en LTi (*lymphoid tissue-inducer*) d'une part et ILC3 d'autre part. Ces derniers se distinguent des LTi par des critères phénotypiques qui comprennent entre autres l'expression du marqueur NKp46. Ils sont pour cette raison désignés sous le terme ILC3 NCR⁺ (NCR pour *natural cytotoxicity receptor*) (Cella et al., 2009; Luci et al., 2009; Sanos et al., 2009; Satoh-Takayama et al., 2008). Les ILCs du groupe 3 sont trouvés constitutivement au niveau du système immunitaire muqueux intestinal mais peuvent aussi s'observer dans d'autres tissus au cours d'états inflammatoires. Finalement, d'autres populations rattachées aux ILC3 mais n'exprimant pas le NKp46 ont également été décrites au cours de l'inflammation colique chez la souris. Elles sont globalement désignées sous le terme ILC3 NCR⁻ (Buonocore et al., 2010). Les principaux caractères phénotypiques de ces populations sont résumés dans le **Tableau 2**.

a) Les ILC3 NCR⁺

La caractérisation de la production d'IL-22 par les ILC3 NCR⁺ s'est effectuée de façon concomitante à leur découverte chez l'homme et la souris, au cours d'études visant initialement à mieux définir les populations de cellules NK dans le système immunitaire

muqueux intestinal (Cella et al., 2009; Luci et al., 2009; Sanos et al., 2009; Satoh-Takayama et al., 2008). Dans ces études, les ILC3 NCR⁺ avaient été rapidement distinguées des cellules NK conventionnelles par l'absence d'expression d'un certain nombre de marqueurs, dont en premier lieu le NK1.1, ainsi que par leur incapacité à exercer des actions cytotoxiques et à sécréter de l'IFN- γ . Au contraire, elles produisaient de l'IL-22 de façon constitutive ainsi que du GM-CSF après activation, mais pas d'IL-17A, suggérant donc une spécialisation fonctionnelle dans la production homéostatique d'IL-22 dans l'intestin.

Les ILC3 NCR⁺ sont dispersées dans la *lamina propria* de la muqueuse intestinale, principalement dans l'intestin grêle. Elles sont aussi présentes dans les plaques de Peyer, les amygdales et l'appendice. Leur présence dans les cryptes chez la souris, définis comme des agrégats de LTi servant de précurseurs aux follicules lymphoïdes isolés, est controversée, une étude ayant même suggéré que leur observation dans ces structures pouvait en fait être liée à un manque de spécificité des réactifs utilisés (Satoh-Takayama et al., 2011). Les ILC3 NCR⁺ se développent après la naissance mais l'influence de signaux issus de la flore commensale pour leur génération est controversée (Lee et al., 2011; Sanos et al., 2009; Satoh-Takayama et al., 2008; Sawa et al., 2011). L'impact contrasté du microbiote intestinal sur leur génération pourrait s'expliquer par des différences qualitatives liées aux souches et aux conditions d'élevage de souris étudiées. Finalement, ces cellules peuvent également se retrouver en dehors du tractus digestif dans certaines situations pathologiques. Elles ont notamment été identifiées dans la peau au cours du psoriasis (Dyring-Andersen et al., 2014; Teunissen et al., 2014; Villanova et al., 2014), et dans les glandes salivaires au cours du syndrome de Sjögren (Ciccio et al., 2011a).

b) Les *Lymphoid Tissue-inducer*

Les LTi ont été initialement caractérisés (avant la découverte des ILCs) par leur rôle prépondérant dans la genèse des ganglions lymphatiques et des plaques de Peyer au cours de l'embryogénèse (Mebius, 2003), ainsi que des follicules lymphoïdes isolés après la naissance (Bouskra et al., 2008). Chez la souris, ils représentent une source importante d'IL-22 et d'IL-17 dans l'intestin au cours de l'embryogénèse et jusqu'au sevrage (Sawa et al., 2011). La production d'IL-22 par les LTi durant la période fœtale a également pu être caractérisée chez l'homme (Cupedo et al., 2009). La signification de ces hauts niveaux d'IL-22 et d'IL-17 au cours du développement fœtal n'est pas connue. Il a été suggéré qu'ils puissent simplement être le reflet de l'engagement des LTi dans un programme pro-inflammatoire initié par l'expression de ROR γ t et nécessaire à leur fonction durant la genèse des organes lymphoïdes

secondaires (OLS) (Eberl, 2012). Une autre hypothèse serait que ces cytokines, par leur capacité à induire la production de peptides antimicrobiens (PAMs) et de mucines, contribueraient à créer un environnement intestinal propre à sélectionner une flore microbienne adaptée au moment de la colonisation. Une telle hypothèse est favorisée par le fait que les souris déficientes pour l'IL-22 présentent une flore différente de leur contrepartie sauvage, plus prône au développement de colites inflammatoires sévères (Zenewicz et al., 2013).

Après la naissance, les LTi sont présents dans l'intestin, au niveau des cryptopatches chez la souris, ainsi que dans les ganglions et la rate. Ils conservent leur capacité à produire de l'IL-22 et de l'IL-17 après activation (Cupedo et al., 2009; Takatori et al., 2009) et exercent donc leur fonction de cellules lymphoïdes innées (Sonnenberg et al., 2011).

Souris				Homme		
Marqueur	LTi	ILC3 NCR ⁺	ILC3 NCR ⁻	Marqueur	LTi	ILC3 NCR ⁺
CD4	+	10%	-	CD4	-	-
CD25	75%	NR	+	CD25	NR	Low
CD90	+	+	+	CD56	-	50%
CD117	+	+	-	CD117	+	+
CD127	+	+	+	CD127	+	+
SCA1	-	NR	+	CD161	+/-	+
NKp46	-	+	-	NKp44	-	+
IL-1R	+	+	+	NKp46	-	+
IL-23R	+	+	+	ICOS	NR	+
				IL-1R	+	+
				IL-23R	+	+

Tableau 2 : Principaux marqueurs phénotypiques des ILCs du groupe 3 chez l'homme et la souris (d'après Spits et al., 2013). NR : Non Renseigné.

2.5.1.3 Développement et maintien des ILCs du groupe 3

Ainsi qu'il l'a été mentionné plus haut, les ILC du groupe 3 dérivent d'un progéniteur hématopoïétique commun à toutes les ILCs. Ce dernier dépend de l'expression d'Id2 et de la

voie de signalisation Notch. Sa survie et sa prolifération nécessite également l'IL-7 dont l'importance peut être illustrée par l'absence d'ILC du groupe 3 chez les souris *Rag2^{-/-} Il2rg^{-/-}* (Sanos et al., 2009; Satoh-Takayama et al., 2008). Le facteur de transcription GATA3, initialement décrit comme spécifiquement requis pour les ILC2, semble en fait également jouer un rôle dans la différenciation précoce des ILC du groupe 3 (Serafini et al., 2014). L'expression de GATA3 est d'ailleurs maintenue dans les ILC3 matures (Satoh-Takayama et al., 2008). Les ILC du groupe 3 sont ensuite hautement dépendants de ROR γ t (Sawa et al., 2010) qui constitue le facteur de transcription majeur de ces cellules. Son déficit est associé à la disparition de l'ensemble des membres de ce groupe (Sanos et al., 2009; Satoh-Takayama et al., 2008). Finalement, T-bet (Klose et al., 2013; Rankin et al., 2013; Sciumé et al., 2012) et Tcf-1 (Mielke et al., 2013a) interviennent plus particulièrement dans le développement des ILC3 NCR⁺.

Alors que la flore commensale n'intervient pas dans développement des LTi (Sawa et al., 2010, 2011) et que son influence sur celui des ILC3 NCR⁺ est controversée (Lee et al., 2011; Sanos et al., 2009; Satoh-Takayama et al., 2008; Sawa et al., 2011), plusieurs arguments suggèrent néanmoins que la génération et le maintien des ILC du groupe 3 après la naissance dépendent de facteurs environnementaux. D'abord, l'ensemble des membres de ce groupe exprime également le facteur de transcription AHR dont l'activation et la migration dans le noyau sont tributaires de la reconnaissance de ligands extérieurs à la cellule, synthétiques (hydrocarbures aromatiques polycycliques halogénés) ou naturels. Ces derniers comprennent des produits issus du métabolisme du tryptophane, de l'acide arachidonique ainsi que des composés alimentaires (notamment issus de végétaux de la famille des *Brassicaceae*) (Monteleone et al., 2013). La constatation que les ILCs du groupe 3 sont absentes chez les souris déficientes pour AHR, associée au fait que ces souris sont dépourvues de follicules lymphoïdes isolés mais pas de ganglions lymphatiques ni de Plaques de Peyer, dont les développements dépendent de l'action des LTi respectivement après et avant la naissance, indique que le rôle d'AHR dans le maintien et/ou l'expansion de ces cellules à nécessairement lieu après la naissance, sous l'influence de facteurs environnementaux (Kiss et al., 2011; Lee et al., 2011; Qiu et al., 2011). Ensuite, l'acide rétinoïque, le métabolite actif de la vitamine A, exerce également une influence notable sur le maintien des ILC du groupe 3 après la naissance puisqu'en son absence la différenciation des ILC intestinales en ILC2 est favorisée (Spencer et al., 2014). Finalement, l'acide rétinoïque d'origine maternelle semble également intervenir durant la vie embryonnaire en permettant l'expression de ROR γ t et donc la différenciation des LTi (van de Pavert et al., 2014).

2.5.1.4 Régulation de la production d'interleukine 22 par les ILCs du groupe 3

La production d'IL-22 par les ILCs du groupe 3, bien que constitutive dans l'intestin, est très largement dépendante des signaux présents dans leur environnement. Ces derniers incluent une régulation directe et indirecte par les bactéries commensales et/ou pathogènes, ainsi qu'une régulation par des facteurs alimentaires et des contacts cellulaires.

a) Régulation directe par les bactéries

La régulation directe de la production d'IL-22 fait intervenir des produits microbiens capables d'agir sur les ILCs afin d'induire la sécrétion de la cytokine. Les LTI humains expriment des niveaux significatifs des récepteurs de l'immunité innée TLR1/2 et TLR2/6 (TLR pour Toll-like récepteurs). Il a ainsi pu être décrit que la stimulation par les ligands de ces récepteurs, habituellement rencontrés dans la paroi des bactéries Gram+, pouvait induire la sécrétion d'IL-22 (Crellin et al., 2010). Cette sécrétion était de plus renforcée par l'IL-2 produite simultanément, qui fournissait un rétrocontrôle positif en agissant de façon autocrine. L'induction directe de la production d'IL-22 par les ligands de TLR2 sur les ILCs murins ne semble en revanche pas exister puisque ces derniers n'expriment pas le récepteur. Un deuxième mécanisme direct a récemment été mis en évidence chez la souris. Dans leur étude, Zelante et al. ont en effet montré que la stimulation d'AHR par un métabolite du tryptophane produit par un lactobacille de l'estomac, permettait d'augmenter la production d'IL-22 par les ILC3 NCR⁺ gastriques, favorisant ainsi la résistance à l'infection par *Candida albicans* (Zelante et al., 2013). AHR semble en effet agir en synergie avec ROR γ t au niveau du locus *Ii22* (Qiu et al., 2011). L'activation du récepteur NKp46 exprimé par les ILC3 NCR⁺ ne semble en revanche pas intervenir dans la régulation de leur production d'IL-22 (Satoh-Takayama et al., 2009). Il a cependant été observé que la mise jeu du NKp44 en conjonction avec l'IL-23, l'IL-1 β et l'IL-7 produisait un effet synergique sur la production d'IL-22 par les ILC3 humains, suggérant pour la première fois un rôle fonctionnel de ces récepteurs dans ces populations (Glatzer et al., 2013). Il peut également être souligné que lorsque seul NKp44 est activé, les ILC3 produisent préférentiellement du TNF α . Ceci suggère donc une capacité d'adaptation de leur fonctionnalité aux signaux environnementaux.

b) Régulation indirecte par les bactéries

La reconnaissance de motifs bactériens par les cellules myéloïdes favorise la production d'un certain nombre de cytokines dont l'IL-1 β et IL-23, toutes 2 capables d'induire rapidement la production d'IL-22 par les ILCs du groupe 3 qui en expriment constitutivement

les récepteurs (**Tableau 2**) (Cella et al., 2009; Hughes et al., 2010; Lee et al., 2013; Sonnenberg et al., 2011; Takatori et al., 2009). Cependant, la production permanente d'IL-1 β par les macrophages intestinaux, sous l'influence de la flore commensale (Shaw et al., 2012), semble avant tout permettre le maintien de la production de GM-CSF par les ILC3. Cette production de GM-CSF est elle-même indispensable à l'établissement des propriétés spécifiques des cDC de la muqueuse intestinale (Mortha et al., 2014). De même, l'étude des ILC3 de souris déficientes pour l'IL-23 a montré que cette dernière n'est pas requise pour leur production constitutive d'IL-22 (Sawa et al., 2011). En revanche l'IL-23 est un inducteur puissant d'IL-22 dans les ILC3 en conditions inflammatoires, que ce soit dans l'intestin (Sawa et al., 2011; Sonnenberg et al., 2011) ou dans d'autres tissu comme la peau (Van Belle et al., 2011) ou le thymus (Dudakov et al., 2012). Finalement, il semble que l'action majoritaire de la flore commensale en dehors de toute inflammation soit en fait de tempérer la production constitutive d'IL-22 par les ILC3. Ces dernières voient en effet leurs niveaux d'expression diminuer après la naissance en regard de ceux observés durant la période embryonnaire. Il a été proposé que l'IL-25 produite par les cellules épithéliales en réponse à la colonisation bactérienne, agisse sur les cDC de manière à leur conférer la propriété d'atténuer les productions d'IL-22 par les ILC3 (Sawa et al., 2011). Ce mécanisme pourrait être nécessaire à l'établissement de l'équilibre indispensable entre la flore commensale et le système immunitaire muqueux intestinal. La production massive d'IL-23 permet donc de contrecarrer cette inhibition au cours de situations où la majoration des actions de l'IL-22 est requise.

c) Régulation par des facteurs alimentaires

Il a été mentionné plus haut qu'AHR était indispensable au maintien et/ou à l'expansion post-natale des ILCs du groupe 3, et que son activation par des métabolites bactériens pouvait contribuer à la production d'IL-22 par ces cellules. Un certain nombre de ligands d'AHR sont également présents dans l'alimentation, notamment au sein des végétaux de la famille des *Brassicaceae*. Il est donc hautement probable que le régime alimentaire conditionne lui-aussi la production d'IL-22 par les ILC3. Abondant dans ce sens, il a été montré que l'administration d'un régime riche en tryptophane à des souris sauvages s'accompagnait d'une augmentation de la production d'IL-22 par les ILC3 NCR⁺ (Zelante et al., 2013). Une autre étude a montré que l'acide rétinoïque participait également à potentialiser leur production d'IL-22 au cours d'un modèle de colite inflammatoire. L'acide rétinoïque activait les facteurs de transcription RARs (Retinoic Acid Receptors), capables eux aussi d'interagir directement

avec le locus *Il22* (Mielke et al., 2013b). Des effets analogues de l'acide rétinoïque étaient aussi observés pour une autre source innée d'IL-22, les lymphocytes T $\gamma\delta$.

d) Régulation par des contacts cellulaires

La production d'IL-22 par les LTI au cours de l'inflammation intestinale semble être en grande partie dépendante de leur expression de la lymphotoxine $\alpha_1\beta_2$ (LT $\alpha_1\beta_2$). Il a en effet pu être observé dans le modèle d'infection colique par *Citrobacter rodentium*, que les LTI régulaient eux-mêmes leur production d'IL-22 selon un mécanisme de rétrocontrôle positif. La LT $\alpha_1\beta_2$ présente à leur surface permettait d'activer le récepteur membranaire LTBR (*Lymphotoxin beta receptor*) exprimé par les cDC. Ces dernières répondaient alors en produisant de l'IL-23 qui venait renforcer la production d'IL-22 (Tumanov et al., 2011). Cette voie de signalisation ne semble en revanche pas intervenir dans la régulation de la production d'IL-22 par les ILC3 NCR⁺ (Sato-Takayama et al., 2011). Finalement, l'observation qu'en l'absence d'immunité adaptative, la production d'IL-22 par les ILCs du groupe 3 est très nettement augmentée (Sawa et al., 2011), a permis d'identifier des mécanismes de régulation liés à des interactions directes avec les lymphocytes T CD4⁺ (Korn et al., 2014).

2.5.1.5 Conclusion sur la production d'interleukine 22 par les ILCs du groupe 3

La production constitutive d'IL-22 par les ILCs du groupe 3 est propre à l'intestin et très probablement nécessaire au maintien d'un équilibre pérenne entre la flore commensale et l'hôte. Elle s'explique aisément par la charge microbienne importante retrouvée à ce niveau et implique une régulation étroite faisant intervenir de nombreux facteurs de l'environnement local. Ces derniers comprennent en premier lieu la flore commensale elle-même et l'alimentation. La capacité de déplacer cet équilibre lorsqu'une production accrue d'IL-22 est requise doit cependant être maintenue et semble particulièrement dépendante de l'IL-23. L'IL-23 est également primordiale pour induire la production d'IL-22 par les ILCs du groupe 3 dans d'autres tissus que l'intestin. Les mécanismes moléculaires participant de la régulation de la production d'IL-22 par ces cellules sont encore imparfaitement connus mais il semble que l'activation de STAT3 par l'IL-23, sous le contrôle de la protéine adaptatrice DOCK8, est importante (Guo et al., 2014; Singh et al., 2014).

2.5.1.6 Autres sources innées d'interleukine 22

En dehors des ILCs du groupe 3, un certain nombre d'autres sources innées d'IL-22 ont pu être décrites, particulièrement en dehors de l'intestin. Premièrement, il a déjà été mentionné plus haut que les lymphocytes NK peuvent représenter une source importante de la

cytokine au cours d'infections pulmonaires virales et bactériennes (Kumar et al., 2012; Xu et al., 2014b). L'analyse phénotypique des cellules productrices d'IL-22 dans l'étude de Kumar et al. indique qu'elles étaient NK1.1⁺ NKp46⁺ CD127⁻ RORγt⁻ excluant donc bien une possible contamination par des ILC3. Le phénotype des NK identifiés dans l'étude de Xu et al. (NK1.1⁺ NKp46⁺ CCR6⁻) impose toutefois plus de réserve quant à cette assertion. Les signaux inducteurs de la production d'IL-22 n'ont pas été clairement définis mais il semble que l'IL-15 et l'IL-23 soient importantes (Kumar et al., 2012). Deuxièmement, une production par les lymphocytes NKT a également été suggérée après stimulation de splénocytes murins par le ligand αGalCer, et confirmée sur des NKT spléniques isolés et stimulés par des anticorps anti-CD3 et anti-CD28. La sécrétion d'IL-22 s'accompagnait également de celle d'IL-17 (Goto et al., 2009). L'induction de la production d'IL-22 par les NKT invariants (iNKT) dépend d'une part de l'activation du TCR par le CD1d, et d'autre part de la stimulation par les cytokines IL-1β et IL-23 associées (Doisne et al., 2011). Une production d'IL-22 par les iNKT a également été décrite dans le poumon dans un modèle d'infection par *Influenzavirus* et dépendait de l'infection des cDC par le virus (Paget et al., 2012). Troisièmement, les lymphocytes Tγδ humains et murins stimulés par IL-1β et IL-23 sécrètent de l'IL-22 (Ness-Schwickerath et al., 2010; Sutton et al., 2009). La production d'IL-22 par les lymphocytes Tγδ a pu être décrite dans le poumon, la peau et le foie (Van Belle et al., 2011; Pantelyushin et al., 2012; Rao et al., 2014; Simonian et al., 2010). Quatrièmement, il a été observé que les polynucléaires neutrophiles (PNN) activés par l'IL-23 pouvaient contribuer de façon significative à la production d'IL-22 au cours d'un modèle murin de colite inflammatoire induite par le DSS (DSS pour *dextran sodium sulfate*) (Zindl et al., 2013). Finalement, une production importante d'IL-22 par une population rare de cellules CD3⁺ CD4⁻ CD8⁻ Sca1⁺ est observée dans les enthèses au cours d'un modèle de spondylarthropathie induite par l'IL-23. Une fois encore, l'IL-23 agissait directement sur ces cellules pour induire la production d'IL-22 (Sherlock et al., 2012). Il ressort donc de ces études qu'en dehors des ILCs du groupe 3, l'IL-22 peut présenter de multiples sources innées, variables selon les tissus et les modèles expérimentaux, mais présentant toutes le point commun de produire l'IL-22 en réponse à l'IL-23. Cette dernière est en effet l'inducteur le plus nécessaire à la production d'IL-22 *in vivo* au cours de situations inflammatoires et infectieuses (Mus et al., 2010; Sherlock et al., 2012; Tumanov et al., 2011; Zheng et al., 2007, 2008).

2.5.2 Production par le système immunitaire adaptatif

2.5.2.1 Production d'interleukine 22 par les lymphocytes T

La production d'IL-22 par le système immunitaire adaptatif est à l'origine de sa découverte. Cette dernière a en effet été identifiée suite à l'analyse des gènes surexprimés par la stimulation d'une lignée murine de lymphome T par l'IL-9 (Dumoutier et al., 2000a). Peu de temps après, Wolk et al. ont suggéré que chez l'homme, l'IL-22 était majoritairement une cytokine effectrice des lymphocytes T CD4⁺ de polarisation Th1 mais pas Th2. Une production moindre par les lymphocytes T CD8⁺ était également retrouvée alors qu'aucun signal n'était détecté dans les lymphocytes B ni dans les monocytes (Wolk et al., 2002). Les lymphocytes T CD4⁺ Th17 n'étaient alors pas encore caractérisés (Harrington et al., 2005; Park et al., 2005) mais l'analyse de leur profil de sécrétion cytokinique a ensuite montré qu'ils constituaient la principale source d'IL-22 parmi les lymphocytes T CD4⁺ murins en regard des Th1 qui ne présentaient qu'une faible expression (Liang et al., 2006). Chez l'homme les Th17 peuvent aussi sécréter de l'IL-22 (Acosta-Rodriguez et al., 2007) et représentent environ 15% cellules IL-22⁺ après stimulation des lymphocytes T CD4⁺ mémoires du sang périphérique (Duhén et al., 2009). La même expérience montre que les Th1 représentent environ 30% des cellules IL-22⁺, soit 2 fois plus que les Th17. Cette donnée indique donc que l'assimilation de l'IL-22 à une cytokine Th17 est plus le propre de la souris que de l'homme. En accord avec ceci, l'expression de l'IL-22 corrèle avec celles de l'IFN γ et du facteur de transcription T-bet mais pas avec celles de l'IL-17 ni de *RORC* (Volpe et al., 2009). Finalement, 50% des cellules produisant de l'IL-22 après stimulation ne produisent ni IFN γ ni IL-17. Cette observation a permis l'identification d'une population de lymphocytes T CD4⁺ dont la polarisation serait orientée spécifiquement vers la production d'IL-22 (Duhén et al., 2009; Eyerich et al., 2009; Trifari et al., 2009).

Cette population de Th22, dont l'acceptation en tant que sous-population indépendante n'est pas encore unanime, est homogène d'un individu à l'autre et présente un profil transcriptionnel différent de celui des Th17 produisant de l'IL-22 (Eyerich et al., 2009). L'analyse des facteurs de transcription classiquement impliqués dans la différenciation des Th ne retrouve aucune expression de T-bet et seulement des niveaux faibles de *RORC* et *GATA3* (Duhén et al., 2009). En revanche, le facteur de transcription AHR est quant à lui fortement exprimé et son activation majeure la production d'IL-22 (Trifari et al., 2009). La différenciation des Th22 est stable et non altérée en présence d'autres cytokines ou après restimulation (Eyerich et al., 2009). Elle semble particulièrement dépendante de l'IL-6 et du TNF α . La

présence d'IL-1 β en plus de ces 2 cytokines oriente par contre la différenciation vers des Th17¹ producteurs d'IL-22 (Duhén et al., 2009). Alternativement, l'IL-21 seule permet l'induction de Th22 *in vitro*. Toutefois, ses effets sont nettement majorés lorsque de l'IL-1 β et de l'IL-23 sont ajoutées dans le milieu (Yeste et al., 2014). Au contraire, le TGF β est un puissant inhibiteur de la production d'IL-22 par les lymphocytes TCD4⁺ (Duhén et al., 2009; Ghoreschi et al., 2010; Rutz et al., 2011; Volpe et al., 2009). La différenciation des Th22 est particulièrement efficace en présence de cellules dendritiques plasmacytoïdes qui peuvent présenter l'antigène où exercer un effet *bystander* (Duhén et al., 2009). De même, la culture de lymphocytes T CD4⁺ en présence de cellules dendritiques cutanées allogéniques, plus particulièrement en présence de cellules de Langerhans, oriente leur différenciation vers une production spécifique d'IL-22 (Fujita et al., 2009). Il est par conséquent particulièrement intéressant de noter que les Th22 présentent un profil d'expression de récepteurs aux chimiokines favorisant un tropisme cutané. Ils expriment en effet CCR6, CCR4 et CCR10 auxquels s'ajoute le ligand de sélectines CLA (*cutaneous lymphocyte antigen*) (Duhén et al., 2009; Eyerich et al., 2009; Trifari et al., 2009). Ils sont de ce fait particulièrement représentés au niveau de l'épiderme des patients atteints de psoriasis et de dermatite atopique où ils constituent la source majoritaire d'IL-22 (Eyerich et al., 2009; Nograles et al., 2009). L'équivalent murin de cette population de Th22 n'est pas clairement identifié mais il est possible d'induire la différenciation de T CD4⁺ produisant de l'IL-22 mais pas d'IL-17 *in vitro* (Zheng et al., 2007). En outre, une population de lymphocytes T CD4⁺ produisant spécifiquement de l'IL-22 sous l'influence de l'IL-6 a pu être caractérisée récemment dans le modèle de colite induite par *Citrobacter rodentium* (Basu et al., 2012).

Pour finir, les lymphocytes T CD8⁺ humains peuvent également produire de l'IL-22, seule ou associée avec l'IL-17 (Liu et al., 2011; Luan et al., 2014; Ortega et al., 2009). Ils semblent particulièrement représentés dans le psoriasis et sont parfois retrouvés sous les désignations Tc17 ou Tc22 selon qu'ils produisent l'IL-17 ou non. De même, des Tc17 ont été identifiés chez la souris dans le poumon et l'intestin (Hamada et al., 2009; Kryczek et al., 2007).

¹ Plus de considération sur les lymphocytes Th17 peuvent être trouvées dans la revue figurant en Annexe

2.5.2.2 Mécanismes moléculaires régulant l'expression d'interleukine 22 par les lymphocytes T

Les mécanismes moléculaires contrôlant la production d'IL-22 par les lymphocytes T ont été assez largement étudiés. Tout comme il l'a été évoqué plus haut pour les ILCs du groupe 3, STAT3 est un facteur de transcription indispensable à l'expression de la cytokine. Ceci explique donc aisément l'importance des cytokines IL-6, IL-23 et IL-21, dont la signalisation passe par STAT3, dans l'induction de l'expression d'IL-22. Le rôle clef de STAT3 dans le contrôle de la production d'IL-22 par les lymphocytes T est illustré par leur capacité nettement réduite à sécréter la cytokine lorsqu'ils en sont déficients (Nurieva et al., 2007), ou que ses fonctions sont bloquées par le sunitinib (Guo et al., 2014). A l'inverse, la transfection de lymphocytes T CD4⁺ naïfs par un vecteur viral permettant l'expression constitutive de STAT3 activé, majore de façon considérable l'expression d'IL-22 lors de la différenciation en Th17 en présence d'IL-6 et d'IL-23 (Yang et al., 2007).

Un deuxième facteur de transcription contribuant à la production d'IL-22 par les lymphocytes T est ROR γ t. Cependant, contrairement à STAT3 celui-ci n'est pas indispensable puisque les lymphocytes Th1 et Th22 ne l'expriment pas mais représentent une source importante d'IL-22 chez l'homme (Duhon et al., 2009). Le rôle de ROR γ t dans la production d'IL-22 semble donc être indirect. Il est possible que du fait de l'induction de l'expression de l'IL-23R induite par ROR γ t, ce dernier optimise la sensibilité des Th17 à l'IL-23, favorisant ainsi, entre autres, la production d'IL-22 (Rutz et al., 2013; Zhou et al., 2008). Toujours en faveur d'un rôle indirect, l'expression ectopique de ROR γ t par des lymphocytes T ne suffit pas par elle-même à induire l'expression d'IL-22 (Manel et al., 2008; Veldhoen et al., 2009). L'expression du facteur de transcription AHR par les Th17 et les Th22 rend de plus modulable leur production d'IL-22 (Duhon et al., 2009; Veldhoen et al., 2008), à l'image de ce qui a été décrit plus haut pour les ILCs du groupe 3. Par ailleurs, les facteurs de transcriptions Notch et Batf semblent également participer à la régulation de l'expression d'IL-22 par les lymphocytes T (Alam et al., 2010; Schraml et al., 2009).

Finalement, il a été mentionné plus haut que le TGF β est un inhibiteur puissant de l'expression d'IL-22 par les lymphocytes T (Duhon et al., 2009; Ghoreschi et al., 2010; Rutz et al., 2011; Volpe et al., 2009). Il a pu être démontré que cet effet était lié à l'activation du facteur de transcription c-Maf par le TGF β . En effet, lors de la différenciation de lymphocytes T CD4⁺ Th17 murins en présence de TGF β , c-Maf interagit directement avec le promoteur du gène *Il22* pour en inhiber l'expression (Rutz et al., 2011).

2.6 Propriétés biologiques de l'axe IL-22/IL-22R

2.6.1 Renforcement et réparation des barrières épithéliales

Le maintien de l'intégrité des barrières épithéliales est un enjeu important puisqu'elles constituent le seul rempart entre l'environnement extérieur et l'intérieur de l'organisme. Toutefois, à l'exception de la peau, les fonctions physiologiques majeures de ces barrières sont de permettre l'absorption de constituants indispensables à la vie, tels que l'oxygène dans les poumons ou les nutriments dans l'intestin, imposant donc qu'elles soient fines et perméables, constituées pour la plupart d'une couche unique de cellules épithéliales. Leur colonisation par les différentes flores commensales, dont la présence est nécessaire au bon déroulement d'un certain nombre de processus physiologiques, tels que la digestion ou la production de vitamines dans l'intestin, nécessite par ailleurs que la barrière physique constituée par les jonctions serrées entre cellules épithéliales soit renforcée. Pour cela, les cellules épithéliales sécrètent différents PAMs ainsi que du mucus. Leur production est en partie induite par la reconnaissance de divers produits microbiens par des récepteurs de l'immunité innée exprimés par les cellules épithéliales elles-mêmes. Néanmoins les charges microbiennes importantes retrouvées au niveau des barrières muqueuses imposent que ces défenses soient renforcées, et justifient l'existence du système immunitaire muqueux. Ce dernier peut être schématiquement défini par l'ensemble du tissu lymphoïde associé aux surfaces muqueuses. Ses actions comprennent parmi d'autres, la sécrétion de médiateurs solubles venant agir sur les cellules épithéliales pour en moduler les propriétés physiologiques. La **Figure 6** résume les principaux mécanismes mis en jeu par le système immunitaire muqueux afin de limiter les contacts trop rapprochés entre la flore commensale et les cellules épithéliales dans l'intestin (Brown et al., 2013).

La production exclusive de l'IL-22 par les cellules immunitaires, associée aux hauts niveaux d'expression de l'IL-22R par les cellules épithéliales, témoignent de l'importance que cette dernière exerce à ce niveau. Les champs d'actions principaux de l'IL-22 comprennent premièrement un rôle dans le façonnement et le contrôle de la flore intestinale, deuxièmement une participation aux processus de régénération et cicatrisation épithéliales, et finalement un rôle dans les défenses anti-infectieuses, principalement étudiées dans l'intestin et le poumon.

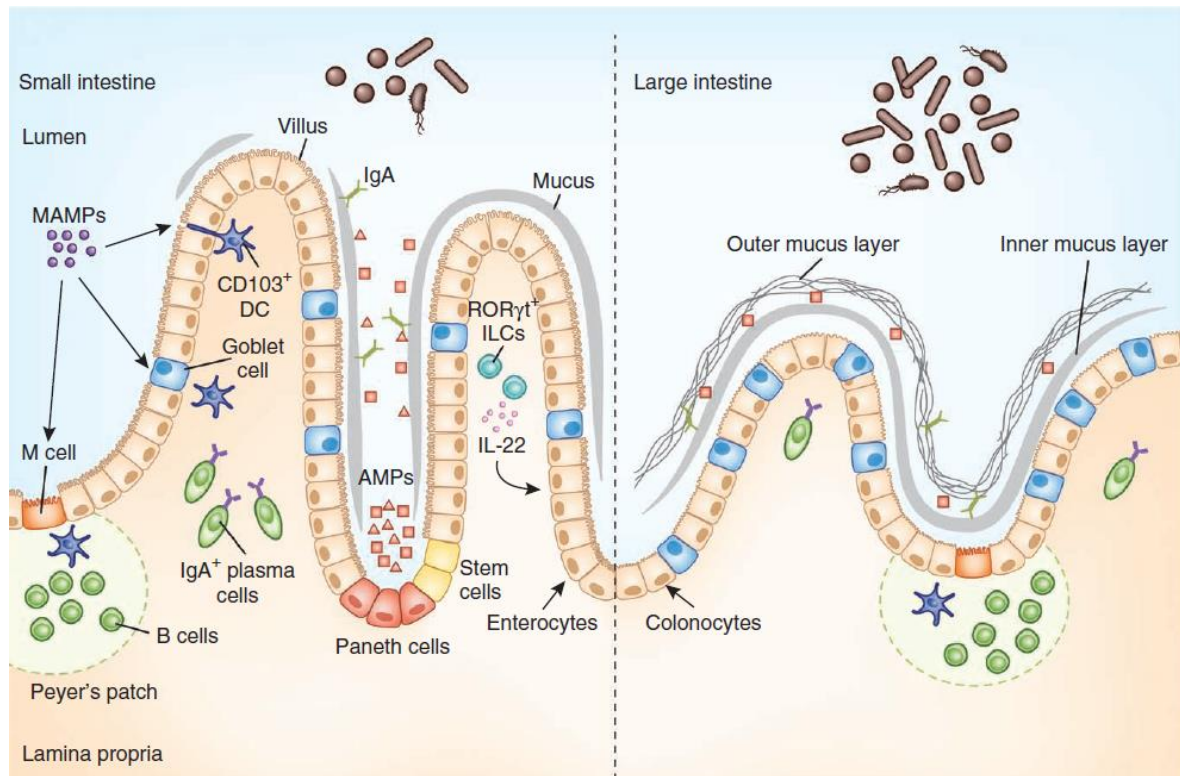


Figure 6: Mécanismes de contrôle de la flore commensale mis en jeu par le système immunitaire muqueux intestinal. La détection de produits microbiens, ou MAMPs, par les cellules épithéliales favorise leur production de PAMs et de mucus. Les cellules épithéliales sont aidées par le système immunitaire muqueux qui détecte également les MAMPs, favorisant notamment la production d'IL-22 par les ILCs du groupe 3. L'IL-22 vient renforcer la production de PAMs et de mucus par les cellules épithéliales. Finalement, la détection des MAMPs par les DCs leur permet de contribuer à la production d'IgA dont la sécrétion dans la lumière intestinale vient aider au maintien de la flore à distance de l'épithélium. MAMPs : microbial-associated molecular patterns ; PAMs : peptides antimicrobiens ; DCs : cellules dendritiques. D'après Brown et al., Nat immunol, 2013.

2.6.1.1 Rôle de l'IL-22 dans le façonnement et le contrôle de la flore intestinale

L'IL-22 est produite de façon permanente par les ILCs du groupe 3 dans l'intestin. Cette singularité, unique à ce tissu, témoigne du rôle important exercé par l'IL-22 dans le contrôle de la flore commensale. En effet, la simple neutralisation de l'IL-22 par l'injection d'un anticorps monoclonal à des souris naïves se traduit par la détection de croissances bactériennes dans le foie et la rate, normalement stériles. Ceci reflète la translocation de bactéries au-delà de la muqueuse digestive et s'accompagne de l'installation d'une inflammation systémique (Sonnenberg et al., 2012). Les mêmes observations peuvent être relevées lorsque les ILCs du groupe 3 sont directement ciblées, mais sont corrigées par l'injection concomitante d'IL-22 recombinante, prouvant donc que ces cellules sont bien la source d'IL-22. L'importance de l'IL-22 dans la prévention des translocations bactériennes

provient du fait qu'elle induit fortement l'expression de PAMs et de mucus par les cellules épithéliales intestinales (Begue et al., 2011; Behnsen et al., 2014; Brand et al., 2006; Sugimoto et al., 2008; Zheng et al., 2008). Dans leur étude, Sonnenberg et al. montrent ainsi que la neutralisation de l'IL-22 induit une chute de l'expression constitutive des PAMs REGIII γ , REGIII β , S100A8 et S100A9 par les cellules épithéliales de l'iléon. Il est intéressant de noter que la neutralisation de l'IL-22 ne s'accompagne pas d'une altération de la perméabilité de la barrière épithéliale, indiquant que les bactéries disséminant dans l'organisme ne proviennent pas de la lumière intestinale. Ces dernières, appartenant au genre *Alcaligenes*, sont en fait issues des plaques de Peyer et des ganglions mésentériques, où elles résident naturellement.

Une deuxième fonction importante de l'IL-22 réside dans sa participation au façonnement de la flore intestinale. En effet, l'expression permanente de certains PAMs par les cellules épithéliales contribue à sélectionner des bactéries capables de s'y adapter. L'importance de l'IL-22 dans la production continue de ces PAMs est illustrée par la chute de leur expression lorsqu'elle est neutralisée (Sanos et al., 2009; Sonnenberg et al., 2012) ou absente (Kinnebrew et al., 2010). Il a ainsi pu être montré que la flore colique des souris déficientes pour l'IL-22 est différente de celle des souris sauvages, et comprend notamment des bactéries habituellement indétectables (Zenewicz et al., 2013). Cette flore émergeant en l'absence d'IL-22 confère par ailleurs une susceptibilité accrue aux colites induites par le DSS, démontrée à l'aide d'expériences de transfert dans des souris sauvages. En accord avec ces résultats, une sensibilité accrue et dépendante de la flore a également été décrite dans le modèle de colite induite par le transfert de lymphocytes T CD4⁺ CD45RB^{hi} chez les souris *Rag*^{-/-} *Ahr*^{-/-}, qui ne présentent donc pas d'ILCs du groupe 3 (Qiu et al., 2013). Par ailleurs, la production d'IL-22 par les ILCs du groupe 3 permet également de contrôler le développement des bactéries SFB (*segmented filamentous bacteria*) dans l'iléon (Qiu et al., 2013). Ces bactéries apparentées au genre *Clostridium* sont indispensables à la génération des lymphocytes Th17 retrouvés naturellement dans l'iléon (Gaboriau-Routhiau et al., 2009; Ivanov et al., 2009). La neutralisation de l'IL-22 par un anticorps monoclonal induit une augmentation importante et spécifique des SFB dans l'iléon des souris WT s'accompagnant donc d'une augmentation de la fréquence des lymphocytes Th17. Par conséquent, ces résultats indiquent que le contrôle exercé par l'IL-22 sur la composition de la flore influence indirectement le développement d'autres effecteurs importants du système immunitaire muqueux. Une dernière étude récente indique de plus que l'IL-22 produite par les ILCs du groupe 3 contrôle l'expression du gène *Fut2* par les entérocytes et les cellules de Goblet,

permettant ainsi d'en réguler la fucosylation (Goto et al., 2014). Cette fucosylation participe également au façonnement de la flore commensale, en sélectionnant des bactéries capables d'utiliser le fucose pour leur métabolisme énergétique, ainsi qu'en diminuant l'expression de facteurs de virulence par certains pathogènes (Kamada et al., 2013).

Finalement, il a pu être rapporté que l'IL-22 participe aussi aux modifications de la flore engendrées par un régime riche en gras. En effet, l'augmentation de l'expression intestinale d'IL-23, et donc d'IL-22 en résultant, observées au cours de ce type de régime, s'accompagne logiquement de changements dans la composition de la flore commensale. Ces changements sont, en accord avec les données mentionnées plus haut, caractérisés par une réduction de la présence des SFB et nécessaires à l'obésité induite par un régime riche en gras. L'influence des SFB sur le contrôle des apports énergétiques au cours de la digestion n'est cependant pas établie et il se peut que leurs variations soient uniquement le reflet de celles de l'IL-22 (Upadhyay et al., 2012). Compte tenu des actions qu'elle exerce également sur le foie et le pancréas, des considérations supplémentaires sur le rôle de l'IL-22 dans le syndrome métabolique seront abordées dans le paragraphe **2.6.2.3**.

2.6.1.2 Rôle de l'IL-22 dans les processus de régénération et cicatrisation des barrières épithéliales

L'IL-22 est capable d'induire l'expression de gènes anti-apoptotiques, de prolifération et de mobilité cellulaire par les cellules épithéliales intestinales et pulmonaires (Aujla et al., 2008; Brand et al., 2006; Cella et al., 2009; Pickert et al., 2009; Sonnenberg et al., 2010), ainsi que de favoriser la différenciation de cellules souches, au moins dans l'intestin (Hanash et al., 2012). Ces propriétés confèrent à l'IL-22 des actions importantes dans les processus de régénération et de cicatrisation des barrières épithéliales intestinale et pulmonaire au cours d'épisodes inflammatoires aigus.

a) Rôle de l'IL22 dans la régénération et la cicatrisation de l'épithélium intestinal

De nombreuses études ont fait état des propriétés de régénération et de cicatrisation de l'IL-22 au cours de l'inflammation intestinale. Il a ainsi été montré qu'au-delà de sa capacité à induire l'expression de mucines et de PAMs, l'IL-22 permettait la régénération des cellules de Goblet au cours d'un modèle de colite spontanée chez les souris déficientes pour la chaîne TCR α , ainsi que dans la colite induite par le DSS (Sugimoto et al., 2008). Ce dernier modèle est particulièrement adapté à l'étude des processus de cicatrisation épithéliale. Dans ce modèle, l'importance des propriétés réparatrices de l'IL-22 est illustrée par l'allongement de

la phase de cicatrisation épithéliale, caractérisée par une guérison retardée, lorsque l'IL-22 est neutralisée par un anticorps monoclonal (Neufert et al., 2010; Pickert et al., 2009; Sugimoto et al., 2008). Les actions de l'IL-22 s'exercent sur les cellules épithéliales différenciées et favorisent l'expression de gènes de prolifération, de mobilité et de survie cellulaire (Pickert et al., 2009). Ces actions sont complétées par les rôles précédemment évoqués de l'IL-22 dans le renforcement des propriétés de barrières, permettant de limiter la diffusion systémique de bactéries commensales (Zindl et al., 2013). L'action de l'IL-22 sur les cellules souches intestinales n'a en revanche pas été analysée dans ce modèle. Au cours des colites induites par le DSS, l'IL-22 est produite en réponse à l'IL-23 (Cox et al., 2011) par les ILCs du groupe 3, les lymphocytes $T\gamma\delta$ et les PNN (Mielke et al., 2013b; Sawa et al., 2011; Zindl et al., 2013). Renforçant les arguments en faveur d'actions protectrices de l'IL-22 au cours des colites inflammatoires, une plus grande résistance est observée lorsque de l'IL-22 exogène est administrée (Cox et al., 2011; Sugimoto et al., 2008), ou que sa production est renforcée par l'administration de ligands d'AHR (Monteleone et al., 2011) ou d'acide rétinoïque (Mielke et al., 2013b). Un rôle protecteur de l'IL-22 est également rencontré dans le modèle de transfert de lymphocytes T $CD4^+ CD45RB^{hi}$ chez les souris *Rag^{-/-}* (Zenewicz et al., 2008) ou dans le modèle de colite induite par les TNBS (*trinitrobenzene sulfonic acid*) lorsque sa production est induite par l'administration d'un ligand d'AHR (Monteleone et al., 2011).

Des actions de l'IL-22 semblent également pouvoir s'exercer sur les cellules souches intestinales (CSI). Il a en effet été observé au cours d'un modèle de réaction du greffon contre l'hôte (GVHD : *graft versus host disease*) que les CSI, caractérisées par l'expression de *Lrg5* et localisées à la base des cryptes intestinales, ainsi que les progéniteurs épithéliaux, expriment le récepteur de l'IL-22. Ils sont ainsi sensibles à l'IL-22 produite par les LT α radio-résistantes, en réponse à l'IL-23 dont la production est elle-même induite par l'irradiation. Dans ce modèle, l'IL-22 protège les CSI de l'apoptose, favorise leur prolifération et leur différenciation, permettant donc de restaurer l'intégrité de l'épithélium intestinal (Hanash et al., 2012). Aucune action protectrice de l'IL-22 n'a en revanche été observée pour la GVHD cutanée. Par ailleurs, l'IL-22 produite par les lymphocytes T du donneur ne semble pas exercer d'action particulière. Ce dernier résultat est toutefois à prendre avec précaution puisqu'une étude indépendante retrouve un rôle pro-inflammatoire délétère de l'IL-22 produite par ces lymphocytes T (Couturier et al., 2013).

b) Rôle de l'IL-22 dans la régénération et la cicatrisation de l'épithélium pulmonaire

A l'image de ce qui vient d'être décrit pour l'intestin, les propriétés régénératrices et réparatrices de l'IL-22 semblent aussi importantes pour l'épithélium pulmonaire, bien qu'elles soient moins clairement caractérisées. Un rôle protecteur de l'IL-22 a pu être décrit dans un modèle de lésions pulmonaires induites par la ventilation mécanique (Hoegl et al., 2011). Dans ce modèle, l'atteinte pulmonaire est associée à une altération des cellules épithéliales alvéolaires en lien avec la forte pression utilisée pour la ventilation, ainsi qu'à l'installation d'une réponse inflammatoire. L'administration concomitante d'un aérosol d'IL-22 permet de réduire significativement la mortalité associée à la ventilation. Elle se caractérise par une atteinte pulmonaire moins sévère avec une réduction du syndrome hémorragique et de l'œdème. Le mécanisme protecteur de l'IL-22 n'a pas été clairement élucidé dans cette étude mais semble passer par des actions renforcées sur les cellules épithéliales alvéolaires, objectivées par une plus forte phosphorylation de STAT3.

Une autre étude suggère par ailleurs que l'IL-22 exerce un rôle protecteur dans un modèle de fibrose pulmonaire induite par l'administration répétée de *Bacillus subtilis* par voie nasale (Simonian et al., 2010). Dans ce travail, les auteurs montrent que l'IL-22 produite par une sous-population de lymphocytes $T\gamma\delta V\gamma6/V\delta1^+$, sous la dépendance d'AHR, permet de limiter l'expression de chimiokines nécessaires au recrutement des lymphocytes T $CD4^+$ effecteurs responsables de la fibrose. Une réduction de la fibrose pouvait ainsi être observée lorsque de l'IL-22 recombinante était injectée. Au contraire, une majoration de cette dernière s'observait lorsque la production d'IL-22 était abolie par des inhibiteurs d'AHR.

Finalement, l'ajout d'IL-22 recombinante permet de limiter l'apoptose induite par la bléomycine sur une lignée de cellules épithéliales pulmonaires *in vitro* (Sonnenberg et al., 2010). Cependant, ces effets protecteurs de l'IL-22 ne peuvent être observés *in vivo*, dans un modèle de pneumopathie induite par la bléomycine, qu'en l'absence d'IL-17. En effet, dans ce modèle l'action combinée de l'IL-17 et de l'IL-22 sur les cellules épithéliales conduit à exacerber leurs propriétés pro-inflammatoires respectives et s'avère donc délétère. L'IL-22 et l'IL-17 peuvent induire l'expression de chimiokines comme CCL2 ou CXCL8, qui favorisent le recrutement d'effecteurs inflammatoires tels que les monocytes ou les PNN. Ces effets sont faibles lorsque les cytokines agissent individuellement mais peuvent se potentialiser mutuellement. De tels effets synergiques entre l'IL-17 et de l'IL-22 ont aussi été décrits *in vitro* sur des cultures de cellules épithéliales trachéales et de kératinocytes (Aujla et al., 2008; Liang et al., 2006). Ils existent également entre l'IL-22 et le TNF α (Eyerich et al., 2011). Ces

résultats indiquent que les actions de l'IL-22 peuvent être modulées par l'environnement cytokinique dans lequel elle est produite, à l'image de ce qui est également admis pour l'IL-17 (Baeten and Kuchroo, 2013), et ne peuvent donc être interprétées que de façon contextuelle.

2.6.1.3 Rôle de l'IL-22 dans les défenses anti-infectieuses intestinales et pulmonaires

La capacité de l'IL-22 à induire la production de PAMs et de mucus par les cellules épithéliales, associée à ses propriétés de cicatrisation, de régénération et éventuellement pro-inflammatoires, lui confèrent des fonctions importantes dans les réponses anti-infectieuses au niveau des surfaces muqueuses, particulièrement à l'encontre des bactéries et levures extracellulaires. A nouveau ces réponses ont été particulièrement étudiées dans l'intestin et le poumon. Les propriétés réparatrices de l'IL-22 sur l'épithélium pulmonaire semblent également exercer un rôle dans les infections respiratoires virales. Finalement, quelques études ont aussi évalué le rôle de l'IL-22 dans certaines parasitoses digestives. Etonnamment, malgré la capacité de l'IL-22 à induire la production de PAMs et de chimiokines pro-inflammatoires par les kératinocytes (Boniface et al., 2005; Wolk et al., 2004), principalement lorsqu'elle agit en synergie avec l'IL-17 (Liang et al., 2006) et le TNF α (Eyerich et al., 2011), très peu de choses sont connues sur son rôle dans les infections cutanées. En outre, malgré quelques travaux ayant analysé son rôle dans la tuberculose, l'IL-22 ne semble pas exercer de fonctions majeures contre les infections à bactéries intracellulaires (Behrends et al., 2013; Dhiman et al., 2009, 2012, 2014; Graham et al., 2011; Scriba et al., 2008; Wilson et al., 2010; Zeng et al., 2011).

a) Rôle de l'IL-22 dans les infections à bactéries extracellulaires

La caractérisation des actions de l'IL-22 dans les infections à bactéries extracellulaires provient essentiellement de l'étude de son rôle dans les colites provoquées par *Citrobacter rodentium*. Cette bactérie est l'équivalent murin des *Escherichia coli* entéro-hémorragiques (EHEC) et entéro-pathogènes (EPEC) humains. La production d'IL-22 est induite de façon précoce après l'inoculation du pathogène et témoigne d'une sécrétion assurée par les ILCs du groupe 3 (Sato-Takayama et al., 2008; Sonnenberg et al., 2011). La contribution relative des ILC3 NCR⁺ en regard des LTi au cours de l'infection n'est pas définitivement établie mais semble privilégier les LTi (Sonnenberg et al., 2011). Abondant dans ce sens, les souris déficientes pour le récepteur de la lymphotoxine présentent la même sensibilité à l'infection que les souris *Il22*^{-/-} (Tumanov et al., 2011). Cette production précoce d'IL-22 est absolument

requis pour la survie des animaux infectés (Sonnenberg et al., 2011; Zheng et al., 2008). Les phases plus tardives de l'infection sont ensuite caractérisées par une production d'IL-22 par les lymphocytes Th22 alors que les ILCs du groupe 3 cessent de la produire (Basu et al., 2012; Sonnenberg et al., 2011). L'importance de la production d'IL-22 par les Th22 dans les phases tardives est illustrée par une mortalité accrue observée lorsqu'un anticorps monoclonal neutralisant l'IL-22 est administré 7 jours après le début de l'infection. En effet, à ce point seuls les Th22 produisent de l'IL-22 (Basu et al., 2012; Sonnenberg et al., 2011).

Alors que la production d'IL-22 par les ILCs du groupe 3 est strictement dépendante de l'IL-23 dans ce modèle (Basu et al., 2012; Sonnenberg et al., 2011; Tumanov et al., 2011; Zheng et al., 2008), celle assurée par les Th22 requiert de l'IL-6, l'IL-23 permettant toutefois de la majorer (Basu et al., 2012). La source d'IL-6 n'a pas été clairement étudiée et celle d'IL-23 est encore débattue. Elle pourrait faire intervenir une production coordonnée par les cDCs CD103⁺ CD11b⁺ (Kinnebrew et al., 2012; Satpathy et al., 2013) et les phagocytes mononucléés CX3CR1⁺ (Longman et al., 2014; Manta et al., 2012), définis comme des macrophages mais pouvant migrer vers les ganglions mésentériques en conditions inflammatoires (Diehl et al., 2013; Merad et al., 2013).

L'importance du rôle de l'IL-22 dans le maintien et le renforcement de l'intégrité de la barrière épithéliale dans ce modèle est illustrée par la majoration des translocations bactériennes observées chez les souris déficientes pour l'IL-22 (Zheng et al., 2008). Par ailleurs, la mortalité observée chez les souris *Il22*^{-/-} au cours de l'infection peut être partiellement corrigée lorsque le peptide antimicrobien REGIII γ , dont l'expression est fortement dépendante de l'IL-22, est injecté. Finalement, l'IL-22 permet également de maintenir l'intégrité de l'organisation des follicules lymphoïdes isolés dans le colon au cours de l'infection (Ota et al., 2011). Le mécanisme par lequel l'IL-22 assure cette fonction n'a pas été clairement défini mais il est possible qu'il soit lié au maintien de l'intégrité épithéliale assuré par l'IL-22. Cette dernière peut en outre induire l'expression de chimiokines comme CXCL13, qui favorise le regroupement et l'association des LTi (Marchesi et al., 2009). Les principales actions protectrices de l'IL-22 durant une infection intestinale par une bactérie extracellulaire sont résumées dans la **Figure 7**.

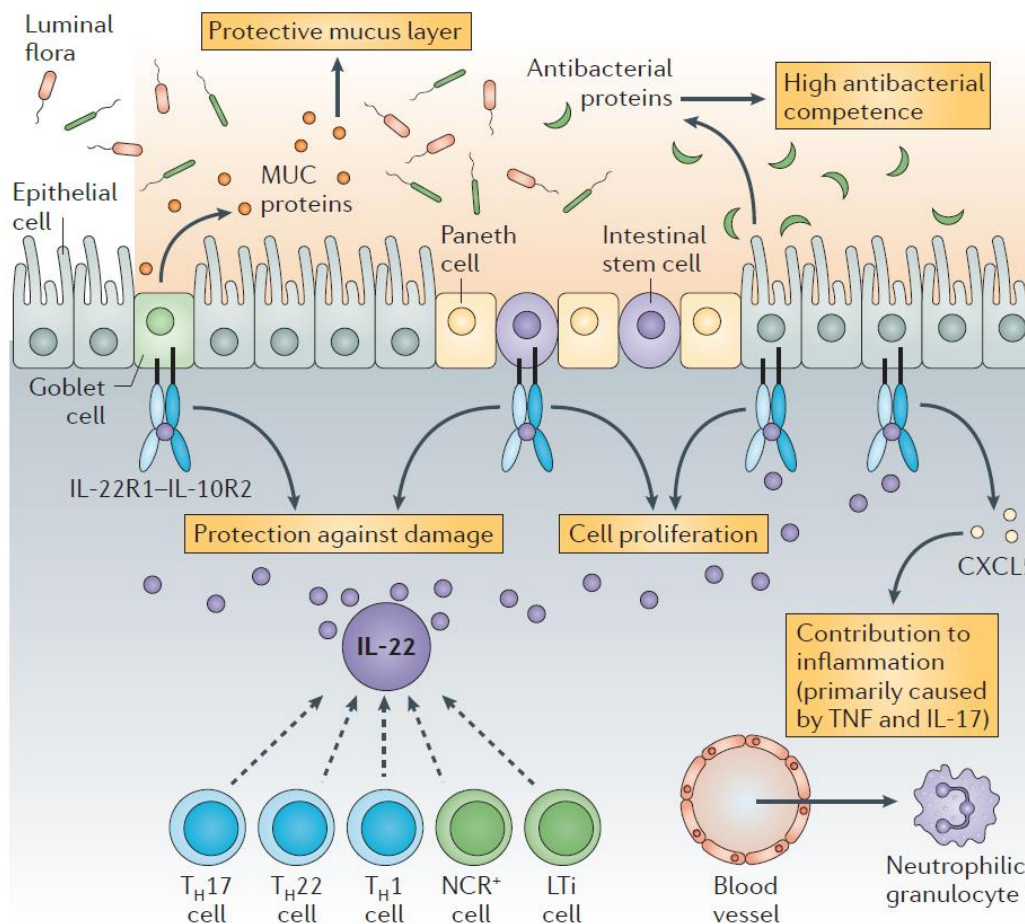


Figure 7: Principales actions protectrices proposées pour l'IL-22 au cours d'une infection intestinale par une bactérie extracellulaire. L'IL-22 permet d'induire la sécrétion de PAMs et de mucus facilitant le cloisonnement des bactéries à distance de l'épithélium. Elle permet également de restaurer l'intégrité de l'épithélium en favorisant la prolifération, la mobilité et la survie des cellules épithéliales. Elle pourrait aussi protéger les cellules souches. Enfin, en synergie avec d'autres cytokines, elle induit la sécrétion de chimiokines pro-inflammatoires, permettant le recrutement d'effecteurs de l'immunité innée comme les polynucléaires neutrophiles (Sabat et al., Nat Rev Drug Discov, 2013).

De manière analogue, l'IL-22 exerce un rôle protecteur au cours de pneumopathies à *Klebsiella pneumoniae* (Aujla et al., 2008). Cependant, la source d'IL-22 identifiée dans ce modèle reste sujette à caution. En effet, la production de la cytokine a été attribuée par les auteurs aux lymphocytes T puisqu'aucune expression d'IL-22 n'était détectable chez les souris *Rag2^{-/-} Il2rg^{-/-}* et que l'ensemble des cellules IL-22⁺ étaient CD90⁺. Pourtant, l'analyse cinétique de l'expression d'IL-22 après l'infection retrouve une induction très précoce avec un maximum détecté à 16h. De plus les auteurs indiquent que la production d'IL-22 est strictement dépendante de l'IL-23, compte-tenu de l'absence d'induction chez les souris *Il23a^{-/-}*. Ces données sont difficilement conciliables avec une production d'IL-22 restreinte

aux lymphocytes T. Il est en fait très probable que la sécrétion d'IL-22 dans ce modèle soit assurée par des ILCs du groupe 3, qui expriment constitutivement le récepteur de l'IL-23 ainsi que CD90, et nécessitent la chaîne γc (CD132) pour leur développement. Une autre équipe a depuis montré que les cellules IL-22⁺ dans ce modèle sont NK1.1⁺ NKp46⁺ CCR6⁻ (Xu et al., 2014b). A nouveau ce phénotype est parfaitement compatible avec les ILCs du groupe 3 et plus précisément avec les ILC3 NCR⁺ qui peuvent exprimer de faibles niveaux de NK1.1 (Satoh-Takayama et al., 2008). Il est d'ailleurs intéressant de souligner que la production d'IL-22 par des ILCs du groupe 3 a récemment été décrite dans un modèle de pneumopathie à *Streptococcus pneumoniae* (Van Maele et al., 2014).

Finalement, les propriétés protectrices de l'IL-22 à l'encontre des bactéries extracellulaires ne semblent pas universelles. Ainsi, en dépit d'une forte induction d'IL-22 observée dans les infections à *Salmonella enterica* ser. enteritidis, aucun effet protecteur ne semble être exercé par la cytokine (Schulz et al., 2008). Au contraire, Behnsen et al. ont récemment suggéré que lorsque des souris prétraitées par la streptomycine étaient infectées par des salmonelles, la forte expression des PAMs lipocaline-2 et calprotectine induite par l'IL-22, leur conférait un avantage sélectif vis-à-vis des entérobactéries commensales comme *E. coli*. (Behnsen et al., 2014). En effet, la chélation de métaux comme le fer, le zinc et le manganèse par ces peptides empêche la croissance d'*E. coli* mais pas des salmonelles qui ont développé des systèmes d'échappement à ces défenses.

b) Rôle de l'IL-22 dans les infections fongiques

L'IL-22 est nécessaire à la protection contre la levure *Candida albicans* après infection par voie gastrique (De Luca et al., 2010; Zelante et al., 2013). Dans ce modèle, l'IL-22 est produite par les ILC3 NCR⁺ en réponse à l'IL-23 sécrétée par les cDCs activées par la dectine-1 (Carvalho et al., 2012; De Luca et al., 2010). La production d'IL-22 est par ailleurs modulée par un métabolite du tryptophane produit par un lactobacille gastrique et interagissant avec AHR (Zelante et al., 2013). Une sécrétion par les lymphocytes T CD4⁺ est également observée lorsque l'infection est réalisée à partir des hyphes mycéliens (De Luca et al., 2010). La contribution relative des sources innées et adaptatives de la cytokine semble suivre un schéma similaire à celui décrit pour les infections à *Citrobacter rodentium* dans le colon (Basu et al., 2012; De Luca et al., 2010). A l'image des mécanismes employés dans la lutte contre les bactéries extracellulaires, l'IL-22 agit sur les cellules épithéliales gastriques et induit la production des PAMs REGIII γ , REGIII β , S100A8 et S100A9 selon une voie de signalisation dépendante de STAT3. Ces actions permettent de limiter l'envahissement de la

muqueuse mais ne semblent pas jouer sur la dissémination du champignon (De Luca et al., 2010). Les actions protectrices de l'IL-22 semblent aussi s'appliquer aux infections gastriques par d'autres levures dont *Candida krusei* et *Saccharomyces cerevisiae* (De Luca et al., 2010), ainsi qu'aux candidoses vaginales au cours desquelles la source d'IL-22 est à nouveau principalement représentée par les ILC3 NCR⁺ et dépend d'AHR (De Luca et al., 2013). En revanche, l'IL-22 ne semble pas intervenir dans la lutte contre les candidoses cutanées (Kagami et al., 2010a), même si la stimulation de kératinocytes par de l'IL-22 et du TNF α , ou du surnageant de Th22, les rend résistants à l'infection par *Candida albicans in vitro* (Eyerich et al., 2011). Il peut finalement être mentionné que les candidoses cutanéomuqueuses (CMC) des patients atteints du syndrome APECED (*autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy*) sont associées à la présence d'anticorps neutralisants l'IL-22 et l'IL-17, suggérant que ces deux cytokines sont centrales dans la prévention des CMC chez l'homme (Kisand et al., 2010; Puel et al., 2010).

Dans le poumon, l'IL-22 intervient également dans les défenses contre les infections à *Aspergillus fumigatus* (Gessner et al., 2012). Sa production dépend de la sécrétion d'IL-23 par les cDCs en réponse à l'activation de la dectine-1 par les β -glucanes de la levure (Gessner et al., 2012). L'absence ou la neutralisation de l'IL-22 dans ce modèle se traduit par un défaut d'élimination du pathogène rattachée à une diminution de l'activité fongicide des cellules épithéliales pulmonaires. Cependant, cette dernière ne semble pas liée à l'activité des PAMs lipocaline-2, REGIII γ , S100A8 et S100A9, suggérant que l'IL-22 pourrait induire la production d'autres facteurs solubles importants pour les défenses antifongiques (Gessner et al., 2012). Chez l'homme, la culture de PBMCs en présence de conidies ou d'hyphes mycéliens d'*Aspergillus fumigatus* induit la production d'IL-22 majoritairement par les lymphocytes T CD4⁺, sans restriction à une sous-population particulière (Th1, Th17 ou Th22), et sans que leur nature effectrice ou mémoire n'ait été analysée (Gresnigt et al., 2013). Cette production n'est pas dépendante de l'activation de la dectine-1 par les β -glucanes ce qui est cohérent avec le fait que ces derniers induisent principalement la production d'IL-23 par les cDCs, et que l'IL-23 ne peut induire seule la production d'IL-22 par les lymphocytes T. En revanche, la sécrétion d'IL-22 dépend du TLR4 et est inhibée par l'activation du TLR2, suggérant des rôles différents de ces récepteurs, probablement également en lien avec les sécrétions de cytokines qu'ils induisent par les cDCs (Gresnigt et al., 2013). Finalement, cette étude indique que l'activation du récepteur au complément CR3 par les levures opsonisées favorise également la sécrétion d'IL-22 par les lymphocytes T.

c) Rôle de l'IL-22 dans les infections virales

Plusieurs études ont évoqué un rôle de l'IL-22 au cours des infections virales respiratoires, particulièrement du fait de ses propriétés protectrices et réparatrices sur l'épithélium. L'IL-22 est en effet induite rapidement au cours d'une infection par les virus du genre *Influenza* (Guo and Topham, 2010; Ivanov et al., 2013; Kumar et al., 2012; Paget et al., 2012; Pociask et al., 2013). Sa production semble principalement assurée par les lymphocytes NK conventionnels et NKT en réponse à l'IL-23 au cours de l'infection par la souche virale A/PR8/34 (H1N1) (Kumar et al., 2012; Paget et al., 2012). En revanche, l'infection par la souche Scotland/20/74 (H3N2) s'associe à une production par les lymphocytes TCD8⁺, T γ δ , iNKT et dans une moindre mesure par des ILCs du groupe 3 (Ivanov et al., 2013). L'infection par le virus H1N1 conduit à une destruction de l'épithélium trachéal dont la régénération est altérée chez les souris *Il22*^{-/-} en regard des souris sauvages. Cette régénération inefficace semble liée à un défaut de prolifération des cellules épithéliales, illustrée par un nombre réduit de cellules Ki67⁺. Elle peut être corrigée par le transfert adoptif de cellules CD3⁻ NK1.1⁺ NKp46⁺ issues de souris sauvages mais pas *Il22*^{-/-}, confirmant donc un rôle spécifique de l'IL-22 (Kumar et al., 2012). Les effets régénératifs de l'IL-22 s'exercent aussi sur le parenchyme pulmonaire au niveau duquel l'expression de l'IL-22R est induite durant l'infection (Pociask et al., 2013). Des conclusions similaires ont été portées au cours de l'infection par le virus H3N2 administré à doses subléthales (Ivanov et al., 2013). L'IL-22 permet aussi de limiter les surinfections bactériennes associées à l'infection virale (Ivanov et al., 2013).

Finalement, un mécanisme d'action original de l'IL-22 a récemment été décrit au cours de l'infection par le cytomégalo virus murin (MCMV) (Stacey et al., 2014). Dans ce modèle, la neutralisation de l'IL-22 s'accompagne d'une augmentation des charges virales dans le foie et le poumon, deux organes cibles importants du MCMV, reflétant ainsi le rôle de la cytokine dans le contrôle de l'infection. L'expression d'IL-22 est induite dès le deuxième jour de l'infection et semble maximale le quatrième jour. Les sources d'IL-22 décrites sont variées mais semblent faire intervenir majoritairement les lymphocytes NK conventionnels et iNKT ainsi que les lymphocytes T. La production par les ILCs du groupe 3 semble en revanche exclue du fait de l'absence d'expression de ROR γ t par les cellules NK1.1⁺. La neutralisation de l'IL-22 se traduit par une diminution de l'accumulation des PNN dans le poumon et le foie, qui semble en partie rattachée à un défaut d'induction de l'expression de CXCL1 par les cellules épithéliales. Les PNN recrutés par l'IL-22 permettent de contrôler l'infection en induisant l'apoptose des cellules infectées selon un mécanisme dépendant de leur expression membranaire du ligand de mort cellulaire TRAIL.

d) Rôle de l'IL-22 dans les infections parasitaires

Une induction de la production d'IL-22 a pu être décrite dans le colon d'un patient atteint de rectocolite hémorragique qui s'inoculait volontairement le nématode *Trichiuris trichiuria* (Broadhurst et al., 2010). De même, la stimulation de biopsies duodénales par des extraits protéiques de l'ankylostome *Necator americanus*, prélevées chez des patients infectés dans le cadre d'un protocole thérapeutique de la maladie cœliaque, induit l'expression d'IL-22 (Gaze et al., 2012). Ces observations suggèrent ainsi une possible participation de l'IL-22 aux réponses immunitaires dirigées contre les vers intestinaux. Allant dans ce sens, l'infection de souris déficientes pour l'IL-22 par *Nippostrongylus brasiliensis* se caractérise par un délai allongé de l'expulsion du vers (Turner et al., 2013). En effet, la production d'IL-22 par les ILCs du groupe 3 et les lymphocytes Th17 permet d'induire une hyperplasie des cellules de Goblet et donc une augmentation de la quantité de mucus favorisant l'évacuation du parasite. Des résultats similaires ont été obtenus au cours de l'infection par *Trichiuris trichiuria*. Les faibles différences observées entre les souris *Il22^{+/+}* et *Il22^{-/-}* indiquent tout de même que la contribution de l'IL-22 dans ces réponses reste modeste (Turner et al., 2013).

L'IL-22 semble en revanche être un médiateur important de l'iléite nécrosante observée lors de l'infection de souris C57BL/6 par *Toxoplasma gondii* administré par voie orale (Muñoz et al., 2009). L'IL-22 est produite en réponse à l'IL-23, sous l'influence de la flore commensale, par les lymphocytes T CD4⁺ et probablement par des ILCs du groupe 3, bien que leur nature n'ait pas été formellement caractérisée. La survie des souris déficientes pour l'IL-22 est prolongée lors de l'infection et s'associe à l'absence de nécrose iléale. Pour autant, le pourcentage de mortalité reste de 100%, contrairement à ce qui est observé pour les souris *Il23p19^{-/-}*. Ceci suggère donc que malgré le rôle exercé par l'IL-22 dans l'atteinte de ces animaux, d'autres médiateurs dépendants de l'IL-23 sont probablement impliqués. L'absence d'amélioration clinique des animaux *Il17^{-/-}* indique qu'il ne s'agit pas de l'IL-17. Les effets délétères de l'IL-22 semblent paradoxaux au vu de ses actions protectrices évoquées plus haut au cours de l'inflammation colique. Il est possible que l'environnement cytokinique créé suite à l'infection orale par *Toxoplasma gondii* favorise une exacerbation des effets pro-inflammatoires de l'IL-22 prenant alors le pas sur ses actions protectrices.

2.6.2 Actions de l'IL-22 dans le foie et le pancréas

L'IL-22R est fortement exprimé dans le foie et le pancréas qui constituent donc des cibles importantes de l'IL-22. Les actions de l'IL-22 sur ces deux organes peuvent se diviser en trois grandes catégories. Tout d'abord, l'IL-22 exerce des effets régénératifs et protecteurs

puissants, particulièrement étudiés dans différents modèles d'atteinte hépatique. Ensuite, l'IL-22 peut induire la sécrétion des protéines de la phase aiguë de l'inflammation et donc participer à la mise en place d'une réponse systémique. Finalement, l'IL-22 exerce également des effets métaboliques qui nécessitent toutefois d'être clarifiés.

2.6.2.1 Actions régénératives et protectrices de l'IL-22 sur le foie et le pancréas

a) Foie

Les effets régénératifs et protecteurs de l'IL-22 sur le foie ont été étudiés dans de nombreux modèles et suggèrent des actions puissantes de la cytokine à ce niveau. L'IL-22 est fortement produite dans le foie au cours du modèle d'hépatite induite par la concanavoline A (Con A) (Pan et al., 2004; Radaeva et al., 2004; Zenewicz et al., 2007). Dans ce modèle, l'accumulation de la lectine dans le foie suite à son injection intraveineuse, permet l'activation polyclonale des lymphocytes T CD4⁺ et NKT. L'expression de FasL et la sécrétion d'IFN γ , principalement par les lymphocytes T activés, sont alors responsables de la destruction des hépatocytes et le développement d'une hépatite, pouvant être nécrosante, mimant les caractéristiques histopathologiques d'une hépatite auto-immune. Le blocage de l'IL-22 par un anticorps neutralisant (Radaeva et al., 2004), ou l'administration de Con A à des animaux *Il22*^{-/-} (Zenewicz et al., 2007), majore très nettement la cytolysse et la nécrose, conduisant à une mortalité augmentée. Au contraire, l'administration d'IL-22 recombinante avant l'injection de Con A (Radaeva et al., 2004), l'injection locale de vecteurs viraux contenant le gène de l'IL-22 (Pan et al., 2004), ou le traitement de souris transgéniques pour l'IL-22 (IL-22-Tg), pour lesquelles le gène *Il22* est placé sous le contrôle du promoteur de l'albumine (Park et al., 2011), protègent significativement de l'hépatite. L'IL-22 est produite rapidement après l'injection de Con A par les lymphocytes T, avec un maximum d'expression détecté au bout de 9 heures. Elle favorise la survie, la croissance et la prolifération des hépatocytes suite à l'activation de la voie de signalisation dépendante de STAT3. L'IL-22 induit notamment l'expression de gènes codant pour des molécules anti-apoptotiques (Bcl-xL, Bcl-2, McL-1) et mitogènes (c-myc, cycline D1, Rb2, CDK4) (Radaeva et al., 2004). L'IL-22 peut également s'avérer bénéfique au cours des hépatites induites par le paracétamol. L'injection prophylactique d'IL-22 recombinante limite la cytolysse et favorise la prolifération des hépatocytes (Feng et al., 2014; Scheiermann et al., 2013). Par ailleurs, bien que l'injection thérapeutique d'IL-22 ne réduise pas significativement l'atteinte hépatique au cours de l'intoxication aiguë, elle potentialise les bénéfices du traitement par N-acétylcystéine

(Scheiermann et al., 2013). Au contraire, l'expression chronique d'IL-22 par les souris IL-22-Tg les rend plus susceptibles (Feng et al., 2014).

Des effets protecteurs de l'IL-22 ont également été observés dans le modèle de fibrose hépatique induite par le tétrachlorure de carbone (CCl₄) (Kong et al., 2012; Pan et al., 2004). Dans ce modèle la fibrose découle de l'activation des cellules stellaires hépatiques (HSC) qui produisent les protéines de la matrice extracellulaire. A nouveau l'administration d'un vecteur viral contenant le gène de l'IL-22 favorise la résolution de la fibrose (Kong et al., 2012). Les souris IL-22-Tg en sont par ailleurs protégées alors que la fibrose est exacerbée chez les souris *Il22*^{-/-} (Kong et al., 2012; Meng et al., 2012). L'IL-22 induit la sénescence des HSC, diminuant ainsi leur production de collagène et d' α -actine tout en les protégeant de l'apoptose. La stimulation des HSC par l'IL-22 active à nouveau STAT3 qui permet l'expression de SOCS3 et le recrutement des facteurs de transcription p53 et p21, responsables de l'entrée en sénescence des HSC.

Les actions de l'IL-22 permettent en outre d'améliorer la lipogénèse et la stéatose hépatiques induites par l'alcool et les régimes riche en gras (Ki et al., 2010; Xing et al., 2011; Yang et al., 2010). La consommation d'alcool augmente l'expression de l'IL-22R par les hépatocytes et l'administration d'IL-22 recombinante ou d'un vecteur viral permettent la surexpression du gène de la métallothionéine, un antioxydant, ainsi que la diminution de l'expression du transporteur des acides gras (FATP : *fatty acid transporter protein*) (Ki et al., 2010). De même, l'IL-22 inhibe l'expression d'un certain nombre de régulateurs du métabolisme lipidique, permettant ainsi de diminuer la lipogénèse (Yang et al., 2010).

Un rôle de l'IL-22 dans l'atteinte hépatique associée à l'ischémie-reperfusion semble aussi exister du fait de l'induction de son expression dans le foie, combinée à la surexpression de l'IL-22R (Chestovich et al., 2012). L'administration d'IL-22 recombinante permet d'améliorer la cytolysse hépatique, l'atteinte histologique et l'infiltrat leucocytaire. En revanche la neutralisation de l'IL-22 par un anticorps ne s'accompagne pas d'une exacerbation des lésions. De même, les gènes de l'IL-22 et de l'IL-22R sont surexprimés après hépatectomie partielle et les niveaux sériques d'IL-22 augmentent (Ren et al., 2010). La neutralisation de l'IL-22 par un anticorps entrave la régénération hépatique et est associée à moins de prolifération des hépatocytes (Ren et al., 2010). Les différents effets protecteurs exercés par l'IL-22 sur le foie sont résumés dans la **Figure 8**.

Finalement, le rôle de l'IL-22 dans les hépatites virales n'est pas encore clairement établi. Les infections chroniques par les virus des hépatites B et C (HBV et HCV) se caractérisent par une induction de la production d'IL-22 qui corrèle avec le degré de la cytolysse (Park et al.,

2011). L'expression d'IL-22 corrèle aussi avec la prolifération des progéniteurs hépatiques chez les patients infectés par l'HBV, suggérant qu'elle pourrait y participer et donc contribuer au maintien de l'intégrité du foie (Feng et al., 2012a). Cependant, d'autres études suggèrent qu'elle pourrait aussi contribuer à l'inflammation et à la fibrose hépatique chez ces mêmes patients en agissant notamment sur les HSC (Zhang et al., 2011b; Zhao et al., 2014).

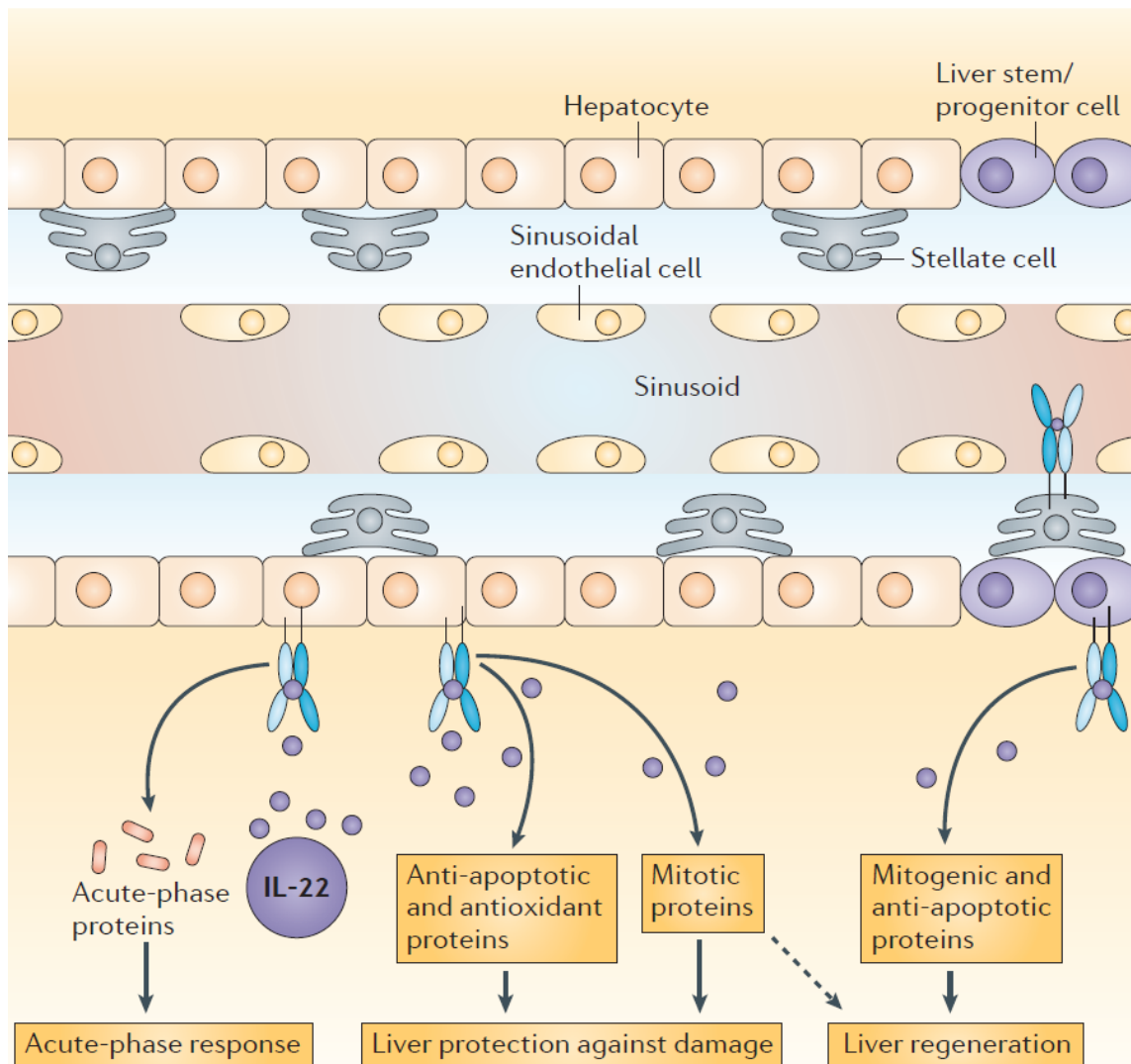


Figure 8: Principales actions protectrices proposées pour l'IL-22 au cours de l'atteinte hépatique. L'IL-22 permet d'induire l'expression de protéines mitogènes et anti-apoptotiques par les hépatocytes et les cellules souches hépatiques, favorisant ainsi la protection et la régénération du foie. Elle protège également contre la stéatose hépatique en induisant l'expression d'antioxydants et en diminuant la lipogénèse. L'IL-22 exerce de plus des actions anti-fibrotiques en induisant la sénescence des cellules hépatiques stellaires (non représenté). Finalement, elle participe à l'installation d'une réponse de la phase aiguë de l'inflammation (Sabat et al., Nat Rev Drug Discov, 2013).

b) Pancréas

Malgré une expression très forte de l'IL-22R retrouvée dans le pancréas (**Figure 4**) (Wolk et al., 2004), très peu de choses sont encore connues sur les propriétés biologiques de la cytokine à ce niveau. A l'image de ce qui vient d'être évoqué pour le foie, quelques études suggèrent tout de même une fonction importante de l'IL-22 au cours des pancréatites. Les souris IL-22-Tg sont résistantes au développement de pancréatites aiguës et chroniques induites par l'injection intra-péritonéale de ceruléine, un decapeptide analogue de la cholécystokinine (Feng et al., 2012b). En outre, les injections prophylactiques et thérapeutiques d'IL-22 recombinante ou d'un vecteur viral codant pour son gène protègent les souris de la pancréatite. Les effets bénéfiques de l'IL-22 semblent passer par l'induction de l'expression des protéines Bcl-2 et Bcl-xL capables de se lier à la protéine Becline-1 et ainsi d'inhiber l'autophagie induite par l'injection de céruleine (Feng et al., 2012b). Il est important de souligner que les souris déficientes pour l'IL-22 ne présentent pas de sensibilité exacerbée dans ce modèle, suggérant que la production endogène d'IL-22 ne joue pas de rôle dans ce modèle. En accord avec cette observation, une autre étude indique que malgré une induction de l'expression de l'IL-22R dans ce modèle, ainsi que dans un second basé sur l'administration d'un régime sans choline et complémenté par de la DL-éthionine, l'expression de l'IL-22 diminue au cours de la pancréatite (Xue et al., 2012). Dans ce travail, les auteurs rattachent cette diminution à une déplétion des lymphocytes T CD4⁺ qui en sont la source principale en l'absence de tout traitement. Une production par les ILC3 NCR⁺ est également observée. Finalement les auteurs confirment le potentiel thérapeutique de l'IL-22 et suggèrent qu'il pourrait passer par l'induction de REGIII γ , dont les fonctions protectrices au cours des pancréatites sont connues. Ils indiquent par ailleurs que la production d'IL-22 peut être augmentée par l'administration de biliverdine qui active AHR. Le rôle de la production constitutive d'IL-22 dans le pancréas n'est pas discuté dans ce travail mais il est possible que l'IL-22 participe à la régulation des fonctions métaboliques du pancréas au cours de l'homéostasie. L'activation d'AHR par la biliverdine pourrait en outre expliquer cette production permanente dans le pancréas.

2.6.2.2 Induction de la production des protéines de la phase aigüe de l'inflammation

L'IL-22 est capable d'induire la sécrétion des protéines de la phase aigüe de l'inflammation, principalement en agissant sur les hépatocytes (**Figure 8**). La forte expression de l'IL-22R par ces derniers a rapidement fait évoquer qu'elle puisse stimuler la production de ce type de protéine (Dumoutier et al., 2000b). La stimulation d'hépatocytes par l'IL-22

induit donc l'expression de fibrinogène, d'haptoglobine, d' α 1 antitrypsine, de sérum amyloïde A et de LPB (*LPS binding protein*) (Dumoutier et al., 2000b; Wolk et al., 2007; Zhang et al., 2011b). De plus, ces mêmes protéines sont augmentées dans le sérum de souris sauvages après l'injection d'un adénovirus comprenant le gène codant pour l'IL-22 (AdIL-22) (Liang et al., 2010). L'injection des souris par l'AdIL-22 semble induire une vraie réponse inflammatoire puisqu'en plus de la production des protéines de la phase aiguë, elles présentent une anémie et une thrombocytose, ainsi qu'une neutrophilie associée à une augmentation du CXCL1 sérique produit dans le foie. L'IL-22 peut aussi induire la synthèse de protéines de la phase aiguë par les cellules acineuses du pancréas (Aggarwal et al., 2001).

2.6.2.3 Effets métaboliques de l'IL-22

Ainsi qu'il l'a été mentionné plus haut, l'IL-22 est capable de moduler la lipogenèse en influençant l'expression d'enzymes impliquées dans différentes voies métaboliques (Yang et al., 2010). De plus, le façonnement de la flore intestinale par l'IL-22 influence les apports caloriques au moment de la digestion, les souris *Il22^{-/-}* étant résistantes à l'obésité induite par un régime riche en gras (DIO *diet induced obesity*) (Upadhyay et al., 2012). Ces données suggèrent donc que l'IL-22 pourrait exercer des fonctions métaboliques importantes sans que celles-ci soient clairement définies puisque, d'une part l'IL-22 semblerait protectrice (Yang et al., 2010) et de l'autre elle favoriserait l'obésité (Upadhyay et al., 2012). Renforçant la confusion, une étude récente indique quant à elle que les souris déficientes pour la chaîne IL-22R1 prennent plus de poids et développent une insulino-résistance plus sévère au cours d'un régime riche en gras (Wang et al., 2014). Ces effets ne sont cependant pas retrouvés chez les souris *Il22^{-/-}*, suggérant que la différence soit due à un défaut d'action de l'IL-20 ou de l'IL-24, qui partagent la chaîne IL-22R1 avec l'IL-22 pour leur récepteur (**Figure 2**). Pour autant, dans cette étude, les souris *Il22^{-/-}* ne sont pas résistantes au DIO contrairement à celle d'Upadhyay et al. Par ailleurs, l'injection d'IL-22 recombinante atténue fortement les effets du DIO dans l'étude de Wang et al., qui suggère que l'IL-22 diminuerait l'insulino-résistance. Finalement, les auteurs proposent que le bénéfice lié à l'injection d'IL-22 dans ce modèle découle majoritairement de sa capacité à inhiber la lipogenèse hépatique, ainsi qu'à augmenter la lipolyse et la β -oxydation par les adipocytes. Néanmoins, une étude *in vitro* avait préalablement proposé que la culture d'hépatocytes humains en présence d'IL-22 diminuait leur sensibilité à l'insuline (Fabbrini et al., 2013). En conclusion, l'augmentation de l'IL-22 retrouvée dans le tissu adipeux des patients obèses insulino-résistants ou diabétiques

de type 2 (Dalmas et al., 2014; Fabbrini et al., 2013) indique qu'elle y exerce probablement des fonctions importantes, qui doivent cependant être clarifiées.

2.6.3 Actions de l'IL-22 sur les reins

Seules 2 études récentes ont analysé les fonctions que l'IL-22 pourrait exercer dans le rein, en dépit d'une expression forte de l'IL-22R retrouvée à ce niveau (**Figure 4**) (Wolk et al., 2004). Dans leur étude, Kulkarni et al. montrent que les propriétés régénératives de l'IL-22 semblent aussi s'appliquer aux cellules épithéliales tubulaires (TEC) (Kulkarni et al., 2014). La mise en culture de ces cellules *ex vivo* s'accompagne d'une mortalité importante nécessitant leur prolifération afin de reformer une monocouche. Ce système mime les processus de régénération subis par les TEC *in vivo* au cours de l'ischémie-reperfusion. L'ajout d'IL-22 à la culture permet d'améliorer significativement la reconstitution. Par ailleurs, la production d'IL-22 est induite au cours de l'ischémie-reperfusion rénale *in vivo* et la neutralisation de la cytokine par un anticorps monoclonal entrave la régénération tubulaire. La source d'IL-22 dans ce modèle n'est pas clairement identifiée mais l'induction de sa production semble dépendante de TLR4 (Kulkarni et al., 2014). En accord avec ces résultats, une étude indépendante retrouve également une induction de la production d'IL-22 au cours de l'ischémie-reperfusion rénale (Xu et al., 2014a). L'injection d'IL-22 recombinante ou d'un AdIL-22 améliore de plus significativement la régénération tubulaire et la fonction rénale et s'accompagne d'une atténuation des syndromes inflammatoires rénal et systémique. L'IL-22 semble protéger les cellules tubulaires épithéliales proximales de l'apoptose en induisant l'expression de Bcl-2 tout en diminuant celles de Bad et Bax.

2.7 Rôle de l'IL-22 en immunopathologie

De hauts niveaux d'IL-22 sont retrouvés au niveau des tissus inflammatoires d'un certain nombre de conditions pathologiques humaines, particulièrement dans le psoriasis, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, la polyarthrite rhumatoïde et les spondylarthropathies. Les actions à double tranchant que peut exercer l'IL-22 sur ses tissus cibles, illustrées notamment par ses effets protecteurs dans la plupart des modèles de colites inflammatoires mais pathologiques au cours de l'infection orale par *Toxoplasma gondii* ou dans certains modèles particuliers de colites, rendent cependant délicate l'interprétation de son rôle réel au cours de ces états pathologiques chroniques. L'étude des propriétés biologiques de l'IL-22 indique par ailleurs que ses actions sont largement influencées par le contexte dans lequel elle est produite. Ainsi, les effets pro-inflammatoires faibles de la cytokine, participant notamment au contrôle de la flore commensale intestinale, peuvent être renforcés significativement par l'action synergique d'autres cytokines comme l'IL-17, le TNF α ou l'IL-1 β . De plus, les actions prolifératives, anti-apoptotiques et régénératrices de l'IL-22, indispensables à la reconstruction d'un tissu épithélial lésé, peuvent devenir particulièrement dangereuses en cas de prolongation non contrôlée et semblent impliquées dans l'entretien et la croissance d'un certain nombre de carcinomes. Afin de faire émerger l'intérêt ou non de la modulation des actions de l'IL-22 à des fins thérapeutiques, une compréhension la plus juste possible a donc justifié de nombreux travaux descriptifs et *in vitro* chez l'homme, associés à l'étude de modèles animaux adressant directement ses actions en immunopathologie.

2.7.1 Pathologies inflammatoires cutanées

2.7.1.1 Psoriasis

Le psoriasis résulte d'une activation permanente et dérégulée du système immunitaire cutané, déclenchée par un facteur environnemental chez des individus génétiquement prédisposés (Perera et al., 2012). Les cytokines sécrétées en permanence par les effecteurs immunitaires agissent sur les kératinocytes. Elles sont responsables des anomalies de différenciation et de mobilité de ces derniers, conduisant au développement des altérations histologiques caractéristiques de la maladie. De plus, les kératinocytes stimulés produisent des médiateurs pro-inflammatoires qui favorisent l'activation et le recrutement de nouvelles cellules effectrices, entretenant ainsi une inflammation cutanée chronique (Lowes et al.,

2014). Parmi les médiateurs inflammatoires les plus fortement impliqués dans le psoriasis, l'axe IL-23/IL-17 semble exercer un rôle prépondérant, illustré par l'efficacité remarquable des biothérapies ciblant la sous-unité p40, commune à l'IL-23 et l'IL-12 (McInnes et al., 2013; Papp et al., 2008), ainsi que celles bloquant directement l'IL-17 ou son récepteur (Hueber et al., 2010; Leonardi et al., 2012; Papp et al., 2012, 2013). Renforçant l'importance de cet axe dans le psoriasis, des polymorphismes de l'IL-23R ont pu être significativement rattachés à la maladie (Cargill et al., 2007).

La forte expression de l'IL-22R par les kératinocytes associée à l'induction de la sécrétion d'IL-22 par l'IL-23 a logiquement fait suspecter une implication de l'IL-22 dans la physiopathologie du psoriasis. Allant dans ce sens, des variants génétiques au niveau de sites de liaisons d'AHR ont récemment été identifiés au niveau du promoteur du gène *IL22*, et associés à des formes des psoriasis à début précoce, avant la puberté (Nikamo et al., 2014).

a) Expression et sources cellulaires d'IL-22 dans le psoriasis

L'IL-22 est fortement exprimée au niveau des lésions cutanées de psoriasis en regard de la peau non lésionnelle ou de celle de sujets sains (Boniface et al., 2007; Nograles et al., 2009; Wolk et al., 2004, 2006) Son expression diminue par ailleurs avec l'efficacité du traitement (Wolk et al., 2006). De l'IL-22 est également détectée dans le sérum (Boniface et al., 2007; Kagami et al., 2010b; Wolk et al., 2006) et sa concentration corrèle avec l'activité de la maladie (Kagami et al., 2010b; Wolk et al., 2007). Ces niveaux sériques suggèrent ainsi un possible retentissement systémique de l'IL-22 produite dans la peau inflammatoire. Dans la peau lésionnelle, les sources cellulaires d'IL-22 sont principalement représentées par les lymphocytes T CD4⁺ de polarisation Th17 et Th22 en proportion équivalente, ainsi que dans une moindre mesure par les lymphocytes Th1 (Eyerich et al., 2009; Nograles et al., 2009). Les lymphocytes T CD8⁺ sécrètent aussi de l'IL-22, mais leur fréquence est moins importante que celles des T CD4⁺ (Hijnen et al., 2013; Nograles et al., 2009). Des lymphocytes T CD4⁺ IL-22⁺ sont aussi retrouvés à des fréquences plus élevées dans le sang périphérique des patients atteints de psoriasis en comparaison aux sujets sains (Benham et al., 2013; Kagami et al., 2010b). Finalement, des proportions plus élevées de cellules CD3⁻ IL-22⁺ sont observées dans le sang périphérique, la peau saine et la peau lésionnelle des patients atteints de psoriasis en regard de volontaires sains (Villanova et al., 2014). Ces cellules correspondent aux ILC3 NCR⁺ qui sont enrichies dans le sang et la peau au cours du psoriasis (Dyring-Andersen et al., 2014; Teunissen et al., 2014; Villanova et al., 2014). Leur fréquence dans la peau lésionnelle est corrélée à l'activité de la maladie (Teunissen et al., 2014) et l'étude d'un patient suggère

de plus que leur fréquence dans le sang diminue au cours du traitement par anti-TNF α (Villanova et al., 2014). Etonnamment, les ILC3 NCR⁺ semblent plus nombreuses dans la peau saine que dans la peau lésionnelle, laissant supposer qu'elles pourraient participer au développement de nouvelles lésions (Dyring-Andersen et al., 2014; Villanova et al., 2014). Leur analyse phénotypique dans le sang retrouve en outre une expression forte de CLA cohérente avec leur tropisme cutané (Teunissen et al., 2014; Villanova et al., 2014). Pour finir, l'expression de l'IL-22R est elle aussi augmentée dans les kératinocytes de patients psoriasiques (Tohyama et al., 2009) et pourrait être liée à l'IFN α (Tohyama et al., 2012) produit par les cellules dendritiques plasmacytoïdes.

b) Etudes *in vitro* des actions de l'IL-22 sur la peau humaine

Plusieurs études ont cherché à mieux caractériser les actions de l'IL-22 sur la peau humaine *in vitro*. En accord avec un rôle important de l'IL-22 dans la physiopathologie du psoriasis, la culture de peau humaine reconstituée en présence d'IL-22 recombinante induit les mêmes altérations histologiques que celles retrouvées dans la peau lésionnelle, provoquant notamment un épaissement de l'épiderme lié à une hyperplasie des couches de kératinocytes (acanthose), une perte des granules de kératohyaline dans la couche granuleuse, la rétention de noyaux par les cornéocytes (parakératose) et une élongation des crêtes épidermiques (papillomatose) (Boniface et al., 2005; Nograles et al., 2008; Sa et al., 2007; Wolk et al., 2009a). De plus, l'analyse du contrôle transcriptionnel exercé par l'IL-22 lorsqu'elle est ajoutée à la culture de kératinocytes isolés, ou à celle de peau humaine reconstituée, retrouve une corrélation significative avec les gènes différentiellement exprimés dans la peau lésionnelle de psoriasis par rapport à celle de volontaires sains (Sa et al., 2007). Des résultats similaires sont obtenus lorsque l'IL-22 est injectée dans de la peau humaine greffée à une souris immunodéprimée (Perera et al., 2014). Finalement, ces gènes différentiellement régulés par l'IL-22 sont contrôlés de manière analogue lorsque des kératinocytes humains sont cultivés en présence de surnageants de lymphocytes T infiltrant la peau lésionnelle (Boniface et al., 2007).

L'IL-22 régule l'expression de 4 grands groupes de gènes. D'une part, elle induit l'expression de PAMs, particulièrement lorsqu'elle agit en synergie avec l'IL-17, l'IL-1 β ou le TNF α (S100A7, S100A8, S100A9, S100A12, β -défensines 2 et 3) (Boniface et al., 2005; Liang et al., 2006; Nograles et al., 2008; Sa et al., 2007; Wolk et al., 2004, 2009a). D'autre part, l'IL-22 inhibe l'expression de nombreux gènes permettant la différenciation terminale des kératinocytes (involucrine, loricrine, fillagrine, kératine 10, kératine 1, calmodulin-like 5,

desmocolline 1 etc...) (Boniface et al., 2005; Sa et al., 2007; Wolk et al., 2006, 2009a). L'IL-22 induit également l'expression de gènes impliqués dans la mobilité cellulaire, notamment MMP1 et MMP3 (MMP : *matrix metallo proteases*) (Boniface et al., 2005; Wolk et al., 2006). La régulation de l'expression de gènes impliqués dans la différenciation et la mobilité cellulaire explique les altérations histologiques observées après traitement de peau humaine reconstituée par l'IL-22. De tels effets ont aussi été décrits à moindre degré pour les autres cytokines de la sous-famille de l'IL-20, également exprimées dans la peau lésionnelle au cours du psoriasis, suggérant donc qu'elles viennent renforcer les actions pathologiques de l'IL-22 (Sa et al., 2007; Wolk et al., 2009a). Il est à ce titre intéressant de noter que l'IL-22 induit elle-même la production d'IL-20 par les kératinocytes, créant ainsi une boucle d'amplification de ses effets (Tohyama et al., 2009; Wolk et al., 2009b). L'IL-17 et l'IFN γ ne semblent en revanche pas intervenir dans le contrôle de la mobilité et de la différenciation des kératinocytes, indiquant qu'il s'agit d'une propriété propre aux cytokines de la sous-famille de l'IL-20 (Nograla et al., 2008; Wolk et al., 2009a). Finalement, lorsqu'elle agit en synergie avec l'IL-17, l'IL-22 renforce l'expression de chimiokines pro-inflammatoires, favorisant le recrutement des PNN (CXCL1, CXCL5, CXCL8) (Boniface et al., 2005; Guilloreau et al., 2010; Sa et al., 2007). Elle participe ainsi à la formation des micro-abcès de Munro et des pustules spongiformes de Kogoj. Les principaux mécanismes physiopathologiques de l'IL-22 dans le psoriasis mis en évidence par ces études sont résumés dans la **Figure 9**.

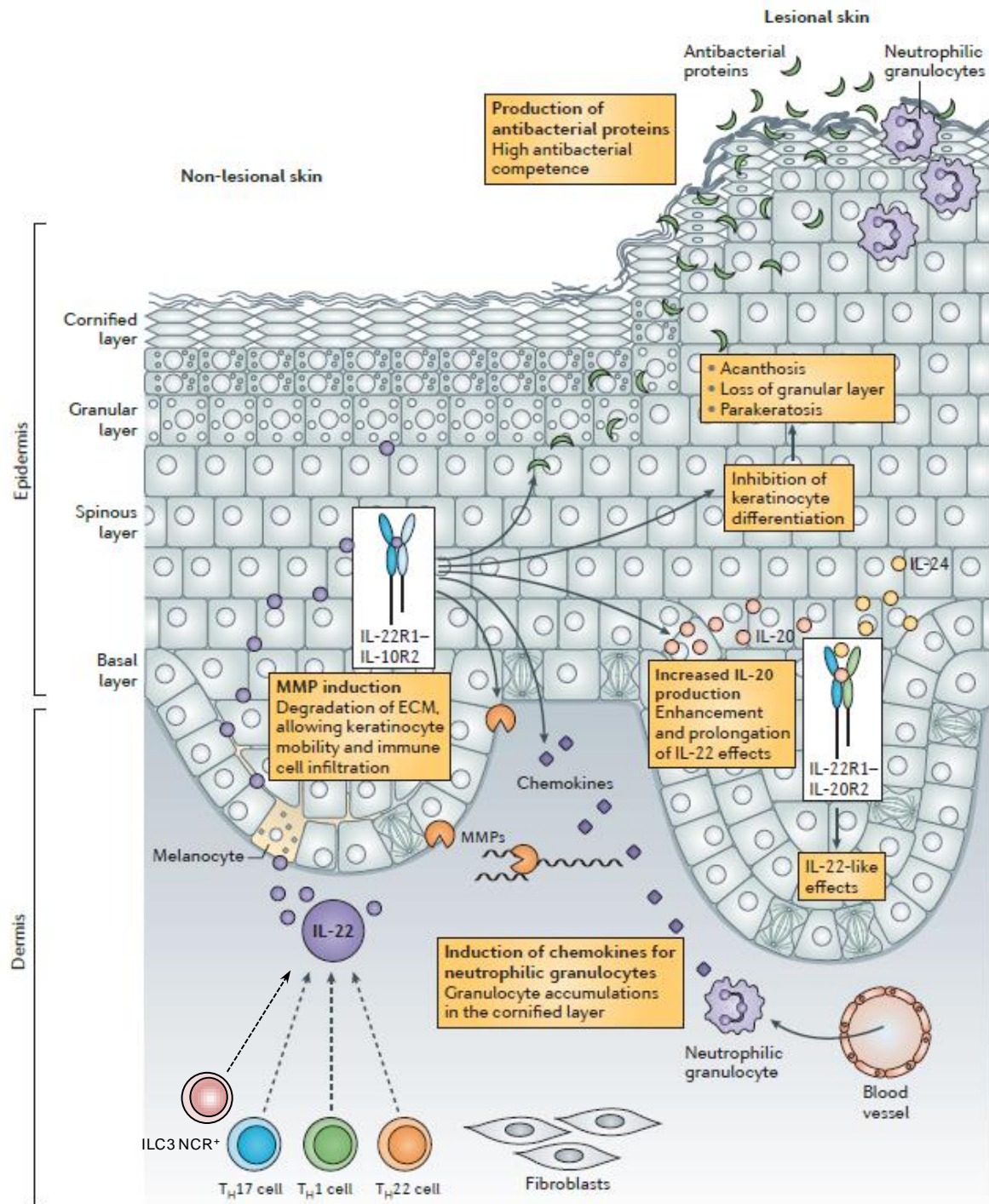


Figure 9: Principales actions de l'IL-22 au cours du psoriasis. En agissant sur les kératinocytes, l'IL-22 inhibe leur différenciation et cornification, conduisant au développement de l'acanthose, de la parakératose et de la perte de granules au niveau de la couche granuleuse. Elle induit également la production de MMP1 et MMP3 qui facilitent la restructuration de l'épiderme. L'IL-22 favorise de plus la production de peptides antimicrobiens, expliquant la faible prévalence des infections cutanées au cours du psoriasis. Elle participe au recrutement de polynucléaires neutrophiles en aidant à la production de chimiokines les attirant, favorisant ainsi le développement des micro-abcès de Munro et des pustules de Kogoj. Finalement, l'IL-22 induit la production d'autres cytokines de la sous-famille de l'IL-20, permettant de prolonger et renforcer ses actions. (Sabat et al., Nat Rev Drug Discov, 2013).

c) Rôles de l'IL-22 dans les modèles animaux de psoriasis

Plusieurs études chez la souris ont également permis d'appréhender le rôle que l'IL-22 pourrait exercer dans la physiopathologie du psoriasis. Tout d'abord, l'analyse des souris transgéniques pour l'IL-22 révèle qu'elles présentent toutes des lésions cutanées sévères, avec un retentissement général majeur conduisant à la mort des animaux dans les jours suivant la naissance. L'analyse histologique de leur peau retrouve des similitudes fortes avec les altérations caractéristiques du psoriasis (Wolk et al., 2009a). Un second modèle basé sur l'injection intradermique d'IL-23 dans l'oreille permet d'induire localement une acanthose et un infiltrat inflammatoire du derme, rappelant par là le rôle majeur de l'IL-23 dans le psoriasis (Zheng et al., 2007). Dans ce modèle, l'injection d'IL-23 entraîne une forte expression d'IL-17 et d'IL-22 dans le derme, où elles sont produites par des lymphocytes T CD4⁺ (Zheng et al., 2007). La production d'IL-22 est également induite dans l'épiderme suite au recrutement d'une sous-population de lymphocytes T $\gamma\delta$ CCR6⁺ (Mabuchi et al., 2011). Le rôle majeur de l'IL-22 dans ce modèle est souligné par la disparition des signes cutanés et de l'infiltrat de PNN lorsque l'injection d'IL-23 est réalisée chez des souris *Il22*^{-/-}. Aucun effet n'est en revanche observé sur l'infiltrat de lymphocytes T, ce qui est cohérent avec le fait que l'IL-22 n'induit pas la sécrétion de chimiokines permettant de les recruter (Boniface et al., 2005; Guilloteau et al., 2010; Sa et al., 2007; Zheng et al., 2007). Des effets similaires sont observés lorsqu'un anticorps monoclonal neutralisant l'IL-22 est injecté à des souris sauvages avant l'administration d'IL-23 (Zheng et al., 2007). Un troisième modèle reposant sur le transfert adoptif de lymphocytes TCD4⁺ CD45RB^{hi} CD25⁻ à des souris *scid/scid* permet également d'induire l'apparition de lésions érythémato-squameuses proches de celles observées dans le psoriasis. Ces lésions recouvrent l'ensemble du corps mais prédominent sur la face et le cou. Leur analyse histologique retrouve une forte analogie avec le psoriasis puisqu'elles sont caractérisées par une acanthose, une parakératose, une papillomatose, des micro-abcès de Munro et un infiltrat inflammatoire du derme (Ma et al., 2008). Une forte expression d'IL-17, d'IL-22, d'IFN γ , d'IL-1 β , d'IL-6 et de TNF α est présente au niveau de la peau lésionnelle. L'analyse de la production de cytokines par les lymphocytes T des ganglions cervicaux retrouve une production d'IL-22 par les Th17 essentiellement. A nouveau, le rôle central de l'IL-22 dans ce modèle est illustré par la prévention de la desquamation et de l'épaississement de la peau ainsi que par la forte atténuation de l'érythème et la disparition des signes histologiques lorsqu'un anticorps neutralisant l'IL-22 est injecté avant le transfert adoptif. L'analyse par qPCR de la peau lésionnelle retrouve une diminution de l'expression des PAMs ainsi que des cytokines IL-1 β , IL-6, IL-23, IL-17 et IL-22 elle-même. Il est par

ailleurs important de souligner que l'administration thérapeutique de l'anticorps neutralisant 14 jours après le transfert, permet d'améliorer significativement l'atteinte des souris (Ma et al., 2008). Dans une autre étude, il a pu être observé que les lésions psoriasiformes se développant spontanément chez les souris déficientes pour l'adaptateur Act1, essentiel à la voie de signalisation de l'IL-17, ne se forment pas si les souris sont déficientes pour l'IL-22 (Wang et al., 2013). Il est intéressant de noter qu'un variant d'Act1, D10N, plus facilement dégradé dans le cytoplasme du fait de son impossibilité à interagir avec la protéine chaperonne hsp90, et conduisant donc à un défaut de signalisation IL-17, est associé au psoriasis (Wang et al., 2013).

Finalement, l'observation que le traitement topique par la crème Aldara® chez des patients atteints de psoriasis, pouvait favoriser l'exacerbation ou l'apparition de nouvelles lésions (Fanti et al., 2006; Gilliet et al., 2004; Rajan and Langtry, 2006; Wu et al., 2004), a permis le développement d'un nouveau modèle simple de psoriasis chez le rongeur (van der Fits et al., 2009) et commence à être développé chez l'homme (Vinter et al., 2014). Dans ce modèle, l'Aldara® est appliqué quotidiennement sur la peau du dos ou l'oreille de l'animal pendant une semaine. Des lésions érythémato-squameuses et un épaissement de la peau s'observent dès les 2-3^{èmes} jours après le début de l'application. L'analyse histologique de la peau retrouve une acanthose, une parakératose et une perte de granules dans la couche granuleuse, caractéristiques du psoriasis (van der Fits et al., 2009). Ces effets semblent néanmoins variables selon les souches de souris utilisées et sont plus marqués chez les BALB/c que chez les C57BL/6, qui présentent par contre une atteinte systémique, avec fièvre et perte de poids, plus sévère. L'infiltrat inflammatoire est également proche de celui décrit dans le psoriasis et retrouve des cDC, des pDC, des lymphocytes T ainsi que des PNN au niveau de la couche cornée, évoquant donc des micro-abcès de Munro (van der Fits et al., 2009). Renforçant les similitudes avec le psoriasis, ce modèle est fortement dépendant de l'IL-23 dont l'expression est induite en 48 heures (Van Belle et al., 2011; van der Fits et al., 2009; Wohn et al., 2013). La production d'IL-23 dépend principalement du principe actif de l'Aldara®, l'imiquimod, dont la nature nucléosidique en fait un agoniste du TLR7 (TLR7/8 chez l'homme). Ce dernier permet ainsi d'activer la voie de signalisation MyD88 et la sécrétion d'IL-23 par les cDC CD207⁺ du derme qui en sont la source majeure (Wohn et al., 2013). Une contribution des cellules de Langerhans semble aussi intervenir, au moins dans l'oreille (Yoshiki et al., 2014). De façon surprenante, et contrairement au psoriasis humain, les pDC et la production d'IFN de type I ne sont pas nécessaires dans ce modèle (Wohn et al., 2013). L'IL-23 induit la production d'IL-22 par une sous-population de lymphocytes T $\gamma\delta$ et

des ILCs du groupe 3 (Van Belle et al., 2011; Pantelyushin et al., 2012). En accord avec les études précédentes, le rôle majeur de l'IL-22 dans le développement des lésions cutanées et l'inflammation du derme est illustré par leur atténuation significative chez les animaux *IL22*^{-/-} ou traités par un anticorps neutralisant (Van Belle et al., 2011; Pantelyushin et al., 2012).

d) Conclusion sur le rôle de l'IL-22 dans le psoriasis

La dérégulation des réponses immunitaires observée dans la peau au cours du psoriasis se caractérise par une production permanente d'IL-23 supportant elle-même les productions d'IL-17 et d'IL-22. Les actions synergiques de ces 2 cytokines sur les kératinocytes, auxquelles peuvent s'ajouter, entre autres, les effets de l'IL-1 β et du TNF α , contribuent à l'installation d'un état inflammatoire chronique, auto-entretenu par les kératinocytes eux-mêmes. L'IL-22 semble de plus particulièrement impliquée dans les perturbations de la différenciation et de la mobilité des kératinocytes, responsables des anomalies histologiques observées dans le psoriasis. Le succès des biothérapies ciblant la sous-unité p40, l'IL-17 et l'IL-17R confirme l'importance de l'axe IL-23/IL-17/IL-22 dans la maladie. L'IL-22 représente donc un candidat de choix à de futurs développements. Renforçant un peu plus les arguments en ce sens, l'efficacité d'un traitement par anticorps neutralisant l'IL-22 a pu être démontrée récemment dans un modèle de xénotransplantation de peau lésionnelle de psoriasis humain sur des souris immunodéprimées AGR129 (Perera et al., 2014). Cependant, un premier essai thérapeutique de phase 1 évaluant l'efficacité de faibles doses d'anticorps neutralisant l'IL-22 dans le psoriasis modéré s'est pour l'instant avéré négatif (<https://clinicaltrials.gov>; identifiant: NCT01010542) (Cai et al., 2012).

2.7.1.2 Dermatite atopique

L'IL-22 est fortement exprimée dans la peau lésionnelle des patients atteints de dermatite atopique (Wolk et al., 2004), à des niveaux pouvant même être supérieurs à ceux détectés dans le psoriasis (Nogralés et al., 2009). Cependant, contrairement au psoriasis, les niveaux d'expression d'IL-17 sont faibles (Nogralés et al., 2009). Dans la peau lésionnelle, l'IL-22 est principalement produite par des lymphocytes T CD4⁺ Th22 et T CD8⁺ Tc22 (Hijnen et al., 2013; Nogralés et al., 2009). La fréquence des Tc22 corrèle de plus fortement avec l'activité de la maladie (Nogralés et al., 2009). Des lymphocytes Th22 et Tc22 sont également retrouvés dans le sang périphérique, à des fréquences similaires à celles observées dans le psoriasis (Nogralés et al., 2009; Teraki et al., 2013). Cependant, près de 50% de ces cellules produisent également de l'IL-13 (Teraki et al., 2013). De l'IL-22 sérique peut être

détectée et ses niveaux corrèlent avec ceux de CCL17, un marqueur d'activité de la maladie déjà validé (Hayashida et al., 2011). La production d'IL-22 par les lymphocytes T CD4⁺ peut être induite spécifiquement par l'entérotoxine SEB (*staphylococcal enterotoxin B*) et l' α -toxine, toutes 2 produites par *Staphylococcus aureus* (Niebuhr et al., 2010), ce qui semble particulièrement relevant compte-tenu de la colonisation cutanée des patients atteints de dermatite atopique par ce germe. Ce dernier semble d'ailleurs directement impliqué dans l'initiation de la maladie en induisant la dégranulation des mastocytes cutanés via la sécrétion de δ -toxine (Nakamura et al., 2013). Finalement, les niveaux d'expression d'IL-22 augmentent significativement dans les lésions aiguës en regard de la peau non lésionnelle, et continuent d'augmenter lorsque ces lésions deviennent chroniques (Gittler et al., 2012). Il est intéressant de noter que cette augmentation progressive des niveaux d'expression d'IL-22 corrèle avec celle de l'acanthose, de la prolifération des kératinocytes, de l'infiltrat inflammatoire et de l'expression des protéines de la famille S100, suggérant un rôle direct de l'IL-22 dans l'installation des lésions cutanées (Gittler et al., 2012). Au contraire, ces niveaux d'expression diminuent fortement dans la peau lésionnelle au cours d'un traitement efficace par cyclosporine A (Khattri et al., 2014). L'ensemble de ces données a justifié la mise en place d'un essai thérapeutique de phase 2, toujours en phase de recrutement, visant à évaluer l'intérêt de l'utilisation d'un anticorps monoclonal neutralisant l'IL-22 dans la dermatite atopique (<https://clinicaltrials.gov>; identifiant: NCT01941537).

2.7.2 Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) regroupent un ensemble de lésions inflammatoires chroniques du tractus gastro-intestinal, pouvant évoluer sous forme de poussées entrecoupées de phases de rémission. Les deux entités principales, définies cliniquement, sont la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH). Leur prévalence est estimée à 250 cas pour 100.000 individus dans les pays industrialisés, et leur incidence connaît une augmentation constante dans les pays émergents, soulignant le rôle de l'environnement dans leur initiation (Baumgart and Sandborn, 2007; Loftus, 2004). L'étiologie des MICI est encore imparfaitement connue mais il est largement admis qu'elles résultent de réponses immunitaires inappropriées et/ou dérégulées à l'encontre de la flore commensale, chez des individus génétiquement prédisposés et sous l'influence de facteurs environnementaux (Kaser et al., 2010). La MC et la RCH sont caractérisées par une atteinte de l'épithélium intestinal en lien avec l'inflammation et font intervenir différentes cascades cytokiniques, dont certaines semblent communes aux deux maladies (Kaser et al., 2010).

L'importance de l'axe IL-22/IL-22R dans le tractus gastro-intestinal associée à l'existence de polymorphismes de l'IL-23R fortement rattachés aux deux maladies (Duerr et al., 2006; Schmechel et al., 2008) ont logiquement fait suspecter un rôle majeur de l'IL-22 dans la physiopathologie des MICI. Allant dans ce sens, plusieurs travaux ont pu mettre en évidence une forte production d'IL-22 dans la muqueuse inflammatoire de la MC et de la RCH. De nombreuses études chez le rongeur, discutées dans la section 2.6, ont également souligné le rôle protecteur de l'IL-22 au cours de l'inflammation intestinale, notamment par sa capacité à promouvoir le renforcement, la cicatrisation et la régénération de la barrière épithéliale. Cependant, bien que la majorité des études soient en faveur d'un rôle bénéfique de l'IL-22, des actions délétères de la cytokine ont également été relevées dans des modèles particuliers et viennent donc en nuancer l'interprétation.

2.7.2.1 Expression et sources cellulaires d'IL-22 dans les MICI

Une forte expression d'IL-22 est détectée par qPCR dans la muqueuse inflammatoire des patients atteints de MC et de RCH en comparaison à de la muqueuse non lésionnelle ou de sujets sains (Brand et al., 2006; Ciccia et al., 2011b; Geremia et al., 2011; Sekikawa et al., 2010; Yu et al., 2013). Les expériences d'immunohistochimie (IHC) indiquent que dans la RCH, l'IL-22 est produite uniquement dans la *lamina propria*, alors que dans la MC elle peut être détectée dans toute la paroi intestinale (Andoh et al., 2005; Sekikawa et al., 2010; Yu et al., 2013). L'identification des sources cellulaires d'IL-22 *in situ* par des expériences de double immuno-marquages en immunofluorescence indirecte (IFI) retrouve une production majoritaire par les lymphocytes T CD4⁺ (Andoh et al., 2005) bien que des cellules IL-22⁺ CD56⁺ aient aussi pu être détectées dans la RCH (Sekikawa et al., 2010). Plusieurs études ont en outre analysé les sources d'IL-22 par cytométrie en flux (Geremia et al., 2011; Kleinschek et al., 2009; Leung et al., 2013; Longman et al., 2014; Pariente et al., 2011a; Ramesh et al., 2014; Takayama et al., 2010). La production de la cytokine peut être détectée dans les lymphocytes Th17 CD161⁺ NKG2D⁺ MDR1⁺ (MDR : *multi drug resistance*) de la muqueuse inflammatoire et du sang périphérique des patients atteints de MC (Kleinschek et al., 2009; Pariente et al., 2011a; Ramesh et al., 2014). Une production par les lymphocytes Th22 dans la MC est aussi observée, cependant leur fréquence n'est pas différente de celle observée chez les sujets sains (Leung et al., 2013). Par ailleurs, aucune différence dans les fréquences des lymphocytes Th22 ou Th17 produisant de l'IL-22 n'est mesurée entre les muqueuses inflammatoires et non inflammatoires (Leung et al., 2013). Dans la RCH, la fréquence des lymphocytes Th22 chute dans la muqueuse inflammatoire en regard des sujets sains. De plus,

contrairement à la MC, aucune augmentation des lymphocytes coproduisant l'IL-22 et l'IL-17 n'est observée, la plupart des T CD4⁺ ne produisant que de l'IL-17 (Broadhurst et al., 2010; Leung et al., 2013). La mise en relation de ces données avec les expériences d'IFI indiquant une production majoritairement assurée par les lymphocytes T (Andoh et al., 2005; Sekikawa et al., 2010) est donc difficilement compatible avec les hauts niveaux d'expression d'IL-22 détectés principalement dans la muqueuse inflammatoire des deux MICI. En outre, une production d'IL-22 par les ILCs du groupe 3 a également été suggérée (Geremia et al., 2011; Takayama et al., 2010). Ces cellules pourraient en fait représenter la source principale d'IL-22 dans les MICI. Allant dans ce sens, la contribution relative des cellules CD3⁺ et CD3⁻ à la production d'IL-22 dans la muqueuse inflammatoire de la MC et de la RCH a été récemment analysée et suggère que les ILC3 NCR⁺ sont effectivement la source majoritaire d'IL-22 (Longman et al., 2014). Cette étude indique de plus que la production IL-22 par ces cellules est induite par des signaux issus de la flore microbienne stimulant la production d'IL-23 et d'IL-1 β par des macrophages CD14⁺ CX3CR1⁺ (Longman et al., 2014) dont la présence semble spécifiquement associée aux MICI (Kamada et al., 2008). Pour finir, l'IL-22 est également détectée dans le sérum des patients atteints de MC et ses niveaux corrént avec l'activité de la maladie (Schmechel et al., 2008; Wolk et al., 2007). La présence de la cytokine dans le sérum indique qu'elle peut exercer des effets systémiques, notamment en agissant sur les hépatocytes. De tels effets ont été décrits au cours d'un modèle de colite induite par le DSS chez la souris (Wolk et al., 2007).

2.7.2.2 Rôle de l'IL-22 dans les modèles animaux de colites

Un faisceau d'arguments issus de l'étude des modèles de colites inflammatoires chez le rongeur laisse suggérer que l'IL-22 y exerce des actions protectrices majeures nécessaires à la résolution de la maladie. Tout d'abord, les colites induites par le DSS ou le transfert de lymphocytes T CD4⁺ CD45RB^{hi} CD25⁻ dans des souris *Rag1*^{-/-} sont plus sévères chez les animaux *Il22*^{-/-} et se caractérisent par plus d'inflammation intestinale et de dommages tissulaires (Pickert et al., 2009; Zenewicz et al., 2008). Ensuite, le blocage de l'IL-22 par un anticorps neutralisant au cours d'une colite induite par le DSS prolonge la durée de la phase de cicatrisation épithéliale (Neufert et al., 2010; Sugimoto et al., 2008). Enfin, l'injection d'IL-22 recombinante (Cox et al., 2011; Sugimoto et al., 2008) ou l'induction de sa production endogène (Mielke et al., 2013b; Monteleone et al., 2011) atténue de façon spectaculaire la sévérité de la colite, y compris dans le modèle dépendant du TNBS, dans lequel l'IL-22 n'est pas produite spontanément (Monteleone et al., 2011). Les actions

protectrices de l'IL-22 dans ces modèles impliquent d'une part, le renforcement de la fonction de barrière de l'épithélium intestinal à travers l'induction de la production de PAMs par les cellules épithéliales (Zindl et al., 2013), de mucus par les cellules de Goblet (Sugimoto et al., 2008) et le renforcement des jonctions serrées (Brand et al., 2006) ; d'autre part une induction de la cicatrisation épithéliale à travers l'induction de l'expression de gènes anti-apoptotiques et mitogènes par les cellules épithéliales différenciées, ainsi que la différenciation des cellules souches intestinales (Hanash et al., 2012; Pickert et al., 2009).

Nuançant ce rôle protecteur de l'IL-22, des actions délétères lui ont également été attribuées dans des modèles particuliers, indiquant encore une fois que ses propriétés sont influencées par le contexte dans lequel elle est produite. Premièrement, le transfert de lymphocytes T CD4⁺ CD45RB¹⁰ CD25⁻ dans des souris *Rag1*^{-/-} induit le développement d'une colite très modérée en 13 semaines, sans destruction de l'épithélium mais caractérisée par plus de prolifération cellulaire, attribuée à la production d'IL-22 par les lymphocytes T transférés (Kamanaka et al., 2011). Contrairement aux modèles de colites habituels dans lesquels l'atteinte épithéliale favorise l'induction d'IL-22 par les ILC du groupe 3 en réponse à des interactions majorées avec la flore commensale, pratiquement aucune induction d'IL-22 n'est observée dans les cellules du receveur, suggérant que le phénotype observé est lié à l'excès d'apport exogène d'IL-22 par le transfert. A l'image de la colite, la signification physiologique de ce modèle reste très modeste. Dans une seconde étude, l'injection d'un anticorps anti-CD40 à des souris *Rag1*^{-/-} induit une colite qui peut être prévenue si un anticorps neutralisant l'IL-22 est injecté quotidiennement (Eken et al., 2013). La colite dépend de la production d'IL-22 par les ILCs du groupe 3 et ne se développe donc pas lorsque l'anti-CD40 est injecté à des souris *Rag1*^{-/-} *Il23*^{-/-}. Au contraire, l'injection d'un plasmide contenant le cDNA de l'IL-22 permet de la restaurer, indiquant donc clairement un rôle pathogène de la cytokine. Dans ce modèle, l'IL-22 semble majorer la production de CXCL1, CXCL2 et CXCL5 et donc le recrutement de PNN dans le colon (Eken et al., 2013).

2.7.2.3 Conclusion sur le rôle de l'IL-22 dans les MICI

La forte expression d'IL-22 retrouvée dans la muqueuse inflammatoire de la MC et de la RCH suggère qu'elle y exerce un rôle important. En accord avec les données issues de l'étude des modèles animaux, l'IL-22 est probablement nécessaire au renforcement et à la réparation de l'épithélium intestinal au cours des poussées aiguës. Cependant, les propriétés puissantes de la cytokine nécessitent d'être strictement régulées afin d'éviter des actions

prolongées ou exacerbées qui peuvent s'avérer particulièrement dommageables, tel qu'illustré dans certains modèles de colites ou dans le psoriasis.

2.7.3 Pathologies rhumatologiques

2.7.3.1 Polyarthrite rhumatoïde

L'expression d'IL-22 est détectée par PCR dans le tissu synovial inflammatoire des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (PR) (Ikeuchi et al., 2005; van de Veerdonk et al., 2011), notamment dans les *fibroblast-like synoviocytes* (FLS) (Carrión et al., 2013; Ikeuchi et al., 2005). Les expériences d'IHC retrouvent également une production forte d'IL-22 dans le tissu synovial des patients atteints de PR mais pas d'ostéoarthrite (OA) (Ikeuchi et al., 2005; Kim et al., 2011). Par ailleurs, la réalisation de double immunomarquages par IFI et des expériences de western blot (WB) suggèrent que les FLS sont une source importante de la cytokine à ce niveau (Carrión et al., 2013; Ikeuchi et al., 2005), en association avec les lymphocytes T (Mitra et al., 2012b). De l'IL-22 soluble peut également être dosée dans le liquide synovial (Kim et al., 2011; Mitra et al., 2012b). Les concentrations sériques d'IL-22 sont augmentées au cours de la PR en regard de témoins sains ou atteints d'OA (Cascão et al., 2010; Kim et al., 2011; Leipe et al., 2011, 2014; Mitra et al., 2012b; Zhang et al., 2011a). Des hauts niveaux d'IL-22 sériques semblent de plus associés à des PR plus érosives et prédisent une évolution radiologique plus sévère à deux ans (Leipe et al., 2011). Ces hauts niveaux d'IL-22 sont présents chez les patients porteurs de l'allèle rs1805010 de l'IL-4R, responsable d'une signalisation altérée et associé à des PR plus destructrices, particulièrement s'ils sont homozygotes (Leipe et al., 2014). Enfin, les fréquences des lymphocytes Th22 et Th17 produisant de l'IL-22 sont augmentées au cours de la PR (Colin et al., 2010; Leipe et al., 2011; Shen et al., 2009; Zhang et al., 2011a, 2012) et la production d'IL-22 par ces derniers diminue lorsqu'ils sont stimulés en présence de dexaméthasone et de vitamine D (Colin et al., 2010).

Les analyses par PCR, IHC, IFI et WB indiquent également que les FLS expriment l'IL-22R et constituent la cible principale de l'IL-22 au niveau du tissu synovial des patients atteints de PR (Carrión et al., 2013; Ikeuchi et al., 2005; Mitra et al., 2012b). L'expression de l'IL-22R est de plus renforcée s'ils sont activés par du TNF α ou du LPS (Carrión et al., 2013). La stimulation *in vitro* de ces FLS par de l'IL-22 recombinante induit leur prolifération, suggérant que l'IL-22 pourrait participer à la formation du pannus synovial (Carrión et al., 2013; Ikeuchi et al., 2005; Mitra et al., 2012b). L'IL-22 induit également la production de

CCL2 (Ikeuchi et al., 2005), MMP1 et S100A8 (Carrión et al., 2013), indiquant qu'elle pourrait aussi favoriser la réorganisation du tissu synoviale et entretenir l'inflammation locale. Enfin, les FLS cultivés en présence d'IL-22 expriment RANKL (*receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*) de façon dose dépendante. Ce dernier semble fonctionnel puisque la culture de FLS activés par l'IL-22 en présence de M-CSF favorise la différenciation de monocytes en ostéoclastes, laissant supposer que l'IL-22 puisse aussi contribuer aux érosions osseuses dans la PR (Kim et al., 2011).

Plusieurs études ont également analysé le rôle de l'IL-22 dans des modèles d'arthrites chez le rongeur. Tout d'abord, l'expression d'IL-22 est induite dans les articulations inflammatoires au cours du modèle d'arthrite induite par le collagène de type II en présence d'adjuvant complet de Freund (Sarkar et al., 2013). La production de la cytokine peut être détectée dans les lymphocytes T CD4⁺ spléniques et semble dépendante de l'IL-23 (Geboes et al., 2009; Mus et al., 2010; Sarkar et al., 2013). Le rôle de l'IL-22 dans ce modèle n'est pas clair puisque, d'une part, l'incidence des arthrites est moins importante, et pour les souris atteintes la sévérité de l'arthrite est légèrement atténuée, lorsque le collagène et l'adjuvant sont injectés à des souris *Il22*^{-/-} (Geboes et al., 2009), et d'autre part, l'injection d'IL-22 recombinante à des souris sauvages permet d'en diminuer la gravité (Sarkar et al., 2013). Il est intéressant de noter que dans ces 2 études, des cellules CD11b⁺ IL-22R⁺ sont détectées dans la rate des souris immunisées. Les actions de l'IL-22 sur ces cellules sont à nouveau contrastées puisque Geboes et al. indiquent qu'elle favoriserait l'ostéoclastogénèse en présence de M-CSF et de RANKL, alors que Sarkar et al. suggèrent qu'elle induirait la production d'IL-10. Il faut mentionner que les fonds génétiques des souris utilisées dans ces 2 études sont différents. Renforçant un peu plus les difficultés d'interprétation, une dernière étude indique que l'administration d'anticorps neutralisant l'IL-22 empêche le développement de l'arthrite alors que l'injection d'IL-22 recombinante la majore (Pineda et al., 2014). Ensuite, l'étude du modèle d'arthrite spontanée des souris *Il1ra*^{-/-} retrouve des niveaux d'IL-22 articulaires d'autant plus élevés que l'atteinte est sévère et suggère qu'elle est modérément atténuée si des anticorps neutralisant l'IL-22 sont utilisés (Marijnissen et al., 2011). Finalement, aucun rôle de l'IL-22 n'est retrouvé dans le modèle d'arthrite induite par l'injection intradermique d'albumine bovine sérique méthylée émulsifiée dans l'adjuvant complet de Freund (van Hamburg et al., 2013).

Les niveaux de production élevés d'IL-22 associés à l'expression de son récepteur par les FLS laissent entendre qu'elle pourrait exercer un rôle physiopathologique important dans la

PR. Cependant, les résultats contrastés issus de l'étude des modèles animaux empêchent à ce jour d'établir des conclusions claires sur sa place réelle dans la maladie.

2.7.3.2 Spondylarthrites

Bien que l'étude du rôle de l'IL-22 dans les spondylarthrites (SpA) fasse pour l'instant l'objet de moins de travaux que dans la PR, les arguments en faveur d'une place importante de la cytokine dans la physiopathologie de ces maladies semblent plus forts. Tout d'abord, l'existence d'un chevauchement clinique et génétique entre les SpA, le psoriasis et les MICI (Braun and Sieper, 2007), particulièrement illustré par leur association commune avec des variants de l'IL-23R (Cargill et al., 2007; Duerr et al., 2006; Rahman et al., 2008; Rueda et al., 2008; Schmechel et al., 2008), en relation avec les preuves convaincantes de l'importance de l'IL-22 dans le psoriasis et les MICI discutées plus hauts, suggère fortement que cette cytokine soit également impliquée dans les SpA. Renforçant cette hypothèse, une augmentation de la fréquence des lymphocytes T CD4⁺ IL-22⁺, coproduisant ou non de l'IL-17, dans le sang périphérique, ainsi qu'une forte production d'IL-22 par les ILC3 NCR⁺ dans l'iléon inflammatoire, sont retrouvées chez les patients atteints de spondylarthrite ankylosante (Ciccia et al., 2011b; Shen et al., 2009; Zhang et al., 2012). Il peut de plus être noté qu'une preuve formelle du rôle de l'IL-17 dans cette maladie a été fournie récemment par l'efficacité du traitement par un anticorps neutralisant l'IL-17 (Baeten et al., 2013). Ensuite, l'absence de développement de symptomatologie articulaire et digestive dans le modèle de rat HLA-B27/hβ(2) lorsque les animaux sont élevés en conditions *germ-free* (Taurog et al., 1994) indique que la flore commensale intestinale, et donc probablement son contrôle par l'IL-22, sont importants. La surexpression systémique d'IL-22, induite par l'injection d'un minicercle d'ADN à des souris, favorise par ailleurs le développement d'une enthésite. Une enthésite plus sévère, associée à des lésions de psoriasis, sont de plus induites par l'injection de minicercle d'ADN codant pour l'IL-23. Cette dernière induit la production d'IL-22 et d'IL-17 par une population CD3⁺ CD4⁻ CD8⁻ RORγt⁺ résidant constitutivement dans les enthèses, et la neutralisation de ces deux cytokines par des anticorps monoclonaux prévient l'incidence de la maladie. L'enthésite est caractérisée par un infiltrat inflammatoire important et un remodelage osseux proche de celui observé dans les SpA. Ce remodelage osseux semble particulièrement dépendant de l'IL-22 puisqu'il est reproduit plus fortement par les injections de minicercles d'ADN codant pour l'IL-22 plutôt que pour l'IL-23 (Sherlock et al., 2012). Finalement, la neutralisation de l'IL-22 par un anticorps monoclonal atténue la sévérité de l'enthésite mais

majore celle de l'iléite dans le modèle de SpA murin induit par l'injection de curdlan à des souris BALB/c ZAP-70^{W163C} (Benham et al., 2014).

2.7.3.3 Lupus systémique et syndrome de Sjögren

Peu d'études ont jusqu'à présent analysé la place de l'IL-22 dans le lupus systémique (LS) et le syndrome de Sjögren (SS). Les niveaux sériques d'IL-22 pourraient être légèrement plus élevés chez les patients atteints de SS primaire (Lavoie et al., 2011). Par ailleurs, une forte expression d'IL-22, produite par les lymphocytes T CD4⁺ et les ILC3 NCR⁺, est retrouvée dans les glandes salivaires de ces patients en regard de ceux atteints de sialadénite chronique non spécifique (Ciccina et al., 2011a). Étonnamment, une production par les cellules épithéliales est également évoquée. Finalement, la production d'IL-22 dans les glandes salivaires diminue après traitement efficace par le rituximab (Ciccina et al., 2013). Les données concernant les niveaux sériques et la fréquence des lymphocytes T CD4⁺ IL-22⁺ dans le LS sont quant à elles discordantes selon les études et empêchent d'établir des conclusions définitives à l'heure actuelle (Cheng et al., 2009; Lin et al., 2014; Pan et al., 2009; Qin et al., 2011; Yang et al., 2013; Yu et al., 2011; Zhao et al., 2013).

2.7.4 Cancer

Sans être mutagènes, les propriétés puissantes exercées par l'IL-22 sur les cellules épithéliales, favorisant leur prolifération, leur survie et leur régénération, importantes pour la protection des tissus épithéliaux, peuvent également s'appliquer aux cellules malignes et ainsi favoriser le développement de carcinomes. Plusieurs travaux ont ainsi relevé des liens étroits entre l'IL-22 et les cancers digestifs, le carcinome hépatocellulaire (CHC) ainsi que le cancer du poumon. Des rôles de l'IL-22 dans la prolifération des cellules tumorales exprimant de façon aberrante le récepteur de l'IL-22 ont également été notés au cours de certaines hémopathies malignes.

2.7.4.1 Cancers du tractus digestif

a) Cancer colorectal

Des niveaux d'expressions élevés d'IL-22 sont retrouvés au niveau des adénocarcinomes colorectaux (Jiang et al., 2013; Kirchberger et al., 2013; Kryczek et al., 2014; Wu et al., 2014; Yu et al., 2013). L'IL-22 y est majoritairement produite par les lymphocytes T CD4⁺ infiltrant la tumeur (TILs : *tumor infiltrating lymphocytes*) et dans une moindre mesure par les ILC3 NCR⁻ (Jiang et al., 2013; Kirchberger et al., 2013). Une augmentation des concentrations

sériques de la cytokine est également observée chez les patients atteints de cancer colorectal (CRC) et semble corrélée à un moins bon pronostic en lien avec une plus forte résistance de la tumeur à la chimiothérapie (Wu et al., 2013, 2014). L'ajout d'IL-22 ou de TILs IL-22⁺ au cours de la culture de lignées tumorales de CRC favorise leur prolifération, les protège de l'apoptose, les rend résistantes à la chimiothérapie et induit leur production d'oxyde nitrique synthase inductible (Jiang et al., 2013; Wu et al., 2013, 2014; Ziesché et al., 2007). Il est intéressant de relever que des polymorphismes du gène *IL22* pouvant conférer une susceptibilité accrue au CRC ont été décrits (Thompson et al., 2010). Finalement, des études *in vivo* de modèles animaux de CRC confortent le rôle que l'IL-22 semble pouvoir exercer sur la survie et la prolifération des cellules tumorales. Tout d'abord, le développement de tumeurs colorectales suite à l'injection d'azoxyméthane (AOM), un carcinogène puissant, à des souris 129SvEv.*Rag*^{-/-} chez lesquelles une inflammation colique est préalablement induite par l'injection de la bactérie *Helicobacter hepaticus*, peut être prévenue par l'administration répétée d'anticorps neutralisant l'IL-22 (Kirchberger et al., 2013). L'incidence des tumeurs est également réduite dans le modèle de souris *Apc*^{min/+}, qui présentent une mutation dominante du gène *Apc* (*adenomatous polyposis coli*) et développent spontanément de multiples adénomes tout au long de l'intestin, lorsqu'elles sont déficientes pour l'IL-22 (Huber et al., 2012). Au contraire, la charge tumorale est majorée chez les souris *IL22*^{-/-} dans le modèle DSS/AOM dans lequel l'inflammation intestinale est induite par l'administration de DSS dans l'eau de boisson (Huber et al., 2012). L'explication de cet effet paradoxal semble être liée à une majoration de l'inflammation colique au cours de l'administration du DSS en l'absence d'IL-22. Finalement, l'injection de tissu tumoral de CRC humain à des souris NSG (*NOD Shi-scid IL-2Rnull*), ne produisant pas de lymphocytes innés ou adaptatifs, conduit à la formation de tumeurs dans le colon dont le développement est fortement dépendant de l'IL-22 produits par les TILs (Kryczek et al., 2014). Dans cette étude, les auteurs montrent que l'IL-22 favorise l'expression de gènes conférant des propriétés de cellules souches aux cellules tumorales. L'IL-22 induit l'activation de STAT3 qui permet l'expression du gène codant pour la méthyltransférase DOT1L (*disruptor of telomeric silencing 1-like*) et de son cofacteur AFF4. DOT1L permet de diméthyliser la lysine en position 79 de l'histone 3. Ces modifications épigénétiques permettent alors l'expression de gènes clefs dans la biologie des cellules souches, tels que *NANOG*, *SOX2* et *POU5F1* (Kryczek et al., 2014).

b) Cancers gastriques et du pancréas

Une infiltration des tumeurs gastriques par des lymphocytes T CD4⁺ IL-22⁺ (Th22, Th17 et Th1) est retrouvée, d'autant plus que le stade TNM est élevé, et semble de plus mauvais pronostic (Zhuang et al., 2012). Des conclusions analogues sont également portées à partir de l'analyse des lymphocytes T CD4⁺ du sang périphérique (Liu et al., 2012). Finalement, il a été proposé que l'IL-22 soit aussi produite par les fibroblastes gastriques associés à la tumeur (Fukui et al., 2014). La stimulation de lignées de cancer de l'estomac par de l'IL-22 recombinante induit leur production de MMP7 et MMP13 et accroît leur capacité d'envahissement. Des effets similaires sont obtenus lorsque les fibroblastes associés à la tumeur sont incubés en présence des cellules tumorales mais sont abolis en présence d'un anticorps neutralisant l'IL-22 (Fukui et al., 2014). Une infiltration par des lymphocytes Th22 est également décrite dans les tumeurs du pancréas dont l'importance corrèle à nouveau avec le stade TNM (Xu et al., 2014c).

2.7.4.2 Carcinome hépatocellulaire

A l'image des observations faites dans les tumeurs du tractus digestif, une infiltration de lymphocytes T CD4⁺ IL-22⁺, et dans une moindre mesure CD8⁺ IL-22⁺, est retrouvée dans le CHC (Jiang et al., 2011). A nouveau, la production d'IL-22 est d'autant plus forte que le stade TNM est élevé. Par ailleurs, des concentrations sériques élevées sont associées à une réduction de la survie à 2 ans (Waidmann et al., 2014). Le transfert adoptif de cellules d'une lignée tumorale en présence de TILs issus de patients atteints de CHC dans la capsule sus-rénale de souris *nude* induit le développement de CHC (Jiang et al., 2011). Ces tumeurs sont caractérisées par une forte expression de la Cycline D1 et des molécules anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL. Les TILs IL-22⁺ favorisent également l'envahissement métastatique du fait d'une induction plus forte de l'expression de VEGF dans les tumeurs (*vascular endothelial growth factor*). *In vitro* la culture de cellules tumorales en présence de TILs IL-22⁺ favorise leur prolifération et leur survie et s'accompagne d'une augmentation de l'expression de la Cycline D1, de Bcl-2 et de Bcl-xL (Jiang et al., 2011). Finalement, la formation de tumeurs hépatiques dans le modèle de CHC induit par l'injection de DEN (diéthylnitrosamine) est très nettement atténuée chez les souris déficientes pour l'IL-22 (Jiang et al., 2011). Au contraire, les souris IL-22Tg présentent un développement tumoral accéléré et caractérisé par un nombre de tumeurs nettement plus important (Park et al., 2011).

2.7.4.3 Cancer du poumon

L'IL-22 est fortement exprimée dans les tumeurs pulmonaires et les épanchements pleuraux malins, où elle est majoritairement produite par des lymphocytes T CD4⁺ (Kobold et al., 2013; Ye et al., 2012; Zhang et al., 2008). Étonnamment, une expression d'IL-22 a été détectée dans la lignée tumorale de carcinome du poumon non à petites cellules A549. De plus, la transfection de ces cellules, ainsi que celles de la lignée PG, avec le gène codant pour l'IL-22 les rend plus résistantes à l'apoptose induite par la chimiothérapie. Ces effets passent par l'activation de l'IL-22R et de STAT3 et sont bloqués lorsqu'un anticorps neutralisant l'IL-22R est ajouté dans la culture (Zhang et al., 2008). Il faut noter que l'expression d'IL-22 par la lignée A549 n'a pas été retrouvée dans une autre étude (Kobold et al., 2013). Cependant, la stimulation de cette lignée ainsi que 3 autres par de l'IL-22 recombinante induit bien l'activation de STAT3 (Kobold et al., 2013). Dans cette étude, l'IL-22 induit la prolifération des cellules tumorales mais ne présente par contre pas d'effet sur la résistance à la chimiothérapie. L'IL-22 semble également augmenter la capacité de migration et d'adhérence des cellules tumorales *in vitro* (Ye et al., 2012).

2.7.4.4 Hémopathies malignes

Une expression aberrante de l'IL-22R a pu être observée à la surface des lymphocytes tumoraux au cours du lymphome du manteau (Gelebart et al., 2011) et du lymphome anaplasique à grandes cellules positif pour les phosphatases alcalines (ALK⁺ ALCL : *anaplastic lymphoma kinase⁺ anaplastic large cells lymphomas*) (Bard et al., 2008; Savan et al., 2011), les rendant ainsi sensibles à l'IL-22. Au cours du lymphome du manteau, l'IL-22 permet la prolifération des tumorales (Gelebart et al., 2011). Dans l'ALK⁺ ALCL, l'expression aberrante de l'IL-22R semble être due à la protéine de fusion oncogène NPM-ALK (*nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase*) issue de la translocation t(2;5)(p23;q35) (Bard et al., 2008). De hauts niveaux sériques sont également décrits dans ce lymphome, indiquant que l'IL-22 peut agir en permanence sur les cellules tumorales, favorisant leur prolifération (Savan et al., 2011). Finalement, une forte production d'IL-22 est retrouvée dans la peau lésionnelle des patients atteints de lymphomes T cutanés et est associée à des concentrations sériques élevées. La production d'IL-22 semble être assurée par les cellules tumorales (Ito et al., 2014; Shimauchi et al., 2013) ainsi que par les lymphocytes T non tumoraux, de façon réactionnelle. La production d'IL-22 pourrait contribuer à entretenir l'inflammation cutanée au niveau de la peau lésionnelle (Miyagaki et al., 2011) ainsi qu'à recruter de nouvelles cellules tumorales (Ito et al., 2014).

2.7.5 Conclusion sur le rôle de l'IL-22 en immunopathologie

Les actions de l'IL-22 dans la peau sont indiscutablement délétères au cours du psoriasis et semblent participer, en conjonction avec l'IL-17, à l'entretien d'une inflammation chronique, ainsi qu'aux différentes altérations cutanées caractéristiques de la maladie. L'échec d'un premier essai thérapeutique évaluant l'efficacité de l'administration unique d'une faible dose d'un anticorps neutralisant l'IL-22 ne doit pas faire négliger l'importance physiopathologique de cette cytokine. Cette dernière a d'ailleurs été clairement renforcée récemment par l'analyse du profil transcriptionnel de peau humaine saine greffée sur une souris immunodéficiente après injection d'IL-22, qui présentait 26% de chevauchement avec celui de la peau lésionnelle de patients psoriasiques (Perera et al., 2014). Cependant, puisque l'IL-20 et l'IL-24 semblent renforcer les altérations cutanées induites par l'IL-22 (Sa et al., 2007), sont exprimées aux cours du psoriasis (Kumari et al., 2013) et peuvent utiliser la chaîne IL-22R1 pour exercer leurs actions (**Tableau 1**), il est probable que les prochains essais thérapeutiques ciblant cet axe s'orientent majoritairement vers le blocage de l'IL-22R1.

L'interprétation de la production continue d'IL-22 par les TILs au cours de différents carcinomes, avec en premier lieu le CRC et le CHC, semble également assez univoque et témoigne d'un rôle pathologique, favorisant la prolifération, la survie et l'envahissement des cellules tumorales. La neutralisation de l'IL-22 ou de son récepteur pourrait donc s'avérer bénéfique. Aucune donnée sur la place de l'IL-22 dans le mélanome n'est pour l'instant disponible. Il serait cependant probablement intéressant d'analyser les effets de sa production éventuelle par les TILs compte-tenu des applications de thérapie cellulaire dont ils font l'objet dans cette maladie (Hinrichs and Rosenberg, 2014).

Finalement, la place de l'IL-22 dans les MICI est plus compliquée à déterminer puisque, d'une part, elle permettrait de renforcer les propriétés de barrière et la régénération de l'épithélium intestinal au cours des poussées inflammatoires, et d'autre part, elle pourrait favoriser la croissance tumorale de cellules malignes dont le développement est favorisé par l'inflammation (Grivennikov et al., 2010). La modulation à la hausse des actions de l'IL-22 dans les MICI devrait donc être strictement contrôlée dans le temps et limitée aux phases aiguës, avec pour objectif d'empêcher l'accumulation des lésions épithéliales qui à terme rendent le recours à la chirurgie inévitable (Pariante et al., 2011b), tout en évitant de favoriser l'émergence de CRC. Cette modulation pourrait passer par l'injection d'IL-22 recombinante ou l'induction de sa synthèse par l'administration de ligands d'AHR, comme il l'a déjà été proposé (Monteleone et al., 2011). Cependant, une augmentation des quantités d'IL-22

induirait invariablement une majoration de ses effets systémiques et très probablement cutanés, particulièrement chez les sujets prédisposés génétiquement. A ce titre, l'apparition de lésions psoriasiformes a déjà été observée après injection d'IL-22 recombinante à des souris (Zelante et al., 2013). Une telle approche semble en outre contre-indiquée pour traiter les MICI associées à la spondylarthrite ankylosante du fait du rôle destructeur de l'IL-22 dans les enthèses et de l'association de cette maladie au psoriasis. Enfin, l'existence de modèles de colites, bien que très spécifiques, dans lesquels l'IL-22 peut présenter des actions pro-inflammatoires destructrices, rappellent de plus l'importance d'une régulation fine et locale de ses actions. Il a déjà été mentionné que ces dernières sont dépendantes de l'environnement cytokinique dans lequel l'IL-22 est produite, puisque certaines cytokines peuvent agir en synergie avec l'IL-22 (Boniface et al., 2005; Eyerich et al., 2011; Liang et al., 2006; Nograles et al., 2008; Sa et al., 2007; Wolk et al., 2004, 2009a), alors que d'autres peuvent augmenter la sensibilité de ses cellules cibles en renforçant l'expression de l'IL-22R1 (Tohyama et al., 2012). L'IL-22 fait de plus partie des rares cytokines, la seule au sein de la famille de l'IL-10, à posséder un inhibiteur soluble spécifique, dénommé **IL-22 binding protein (IL-22BP)**. La preuve de l'importance physiologique de l'IL-22BP est probablement fournie par sa conservation au travers de l'évolution (Dumoutier et al., 2001; Gruenberg et al., 2001; Kim et al., 2012; Kotenko et al., 2001b; Wei et al., 2003; Weiss et al., 2004; Xu et al., 2001). Pour autant, bien que son intégration à l'étude des fonctions de l'axe IL-22/IL-22R semble évidente, la caractérisation et le rôle physiopathologique de l'IL-22BP ont été très peu étudiés et font donc l'objet de cette thèse. Toutefois, avant d'en présenter les objectifs principaux, la prochaine section s'attachera d'abord à dresser l'état des connaissances sur cette protéine au moment de l'initiation du travail.

3 L'interleukine 22 binding protein

3.1 Gène et protéine de l'IL-22BP

3.1.1 L'IL-22BP humaine

La découverte du gène codant pour l'IL-22BP s'est faite en 2001 par 4 groupes indépendants, lors de la recherche d'homologues des protéines de la famille CRF2 sur des banques publiques d'ADNc humain (Dumoutier et al. 2001; Kotenko et al. 2001; Xu et al. 2001). Il a ainsi pu être mis en évidence un nouveau gène localisé sur le chromosome 6q24, codant pour une protéine présentant une homologie significative avec les différents membres de la famille CRF2, et plus particulièrement avec le domaine extracellulaire de l'IL-22R1. La réalisation d'un arbre phylogénétique (**Figure 10A**) a confirmé la relation plus étroite existant entre ce gène et le gène *IL22RA1* (Dumoutier et al., 2001) conduisant au choix de la dénomination *IL22RA2* pour le désigner (Xu et al., 2001). Il est intéressant de souligner que ce gène se trouve à proximité et dans la même orientation transcriptionnelle que les gènes codant pour l'IFN- γ R1 et l'IL-20R1, 2 autres membres de la famille CRF2, et ce d'autant plus qu'il a également été mentionné plus haut l'existence d'une proximité entre les gènes codant pour l'IL-22, l'IFN- γ et l'IL-26 sur le chromosome 12q15.

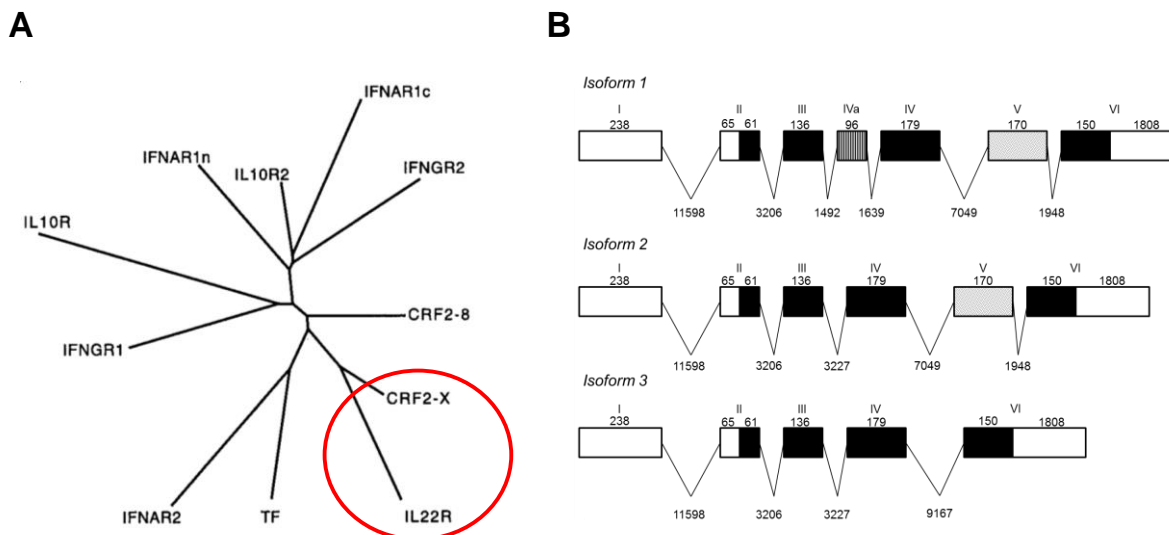


Figure 10: Phylogénie et structure du gène *IL22RA2*. (A) Arbre phylogénétique regroupant les différents membres de la famille CRF2 (d'après Dumoutier et al. 2001). Les gènes *IL22RA1* (*IL22R*) et *IL22RA2* (*CRF2-X*) sont entourés par le cercle rouge. (B) Organisation des jonctions exons-introns des gènes codant pour les 3 isoformes décrites du gène *IL22RA2*. Les boîtes noires représentent les exons codants, les boîtes blanches les régions non traduites et les lignes les introns. La boîte gris foncé représente l'exon additionnel présent dans l'isoforme 1. La boîte gris clair représente l'exon excisé dans l'isoforme 3.

La structure du gène *IL22RA2* comprend 6 exons et s'étend sur environ 30 kilobases (kb). Son organisation est similaire à celles des gènes codant pour l'IFN- γ R1 et l'IL-20R1 (**Figure 10B**). Elle comprend une région 5' non traduite (5'UTR pour *untranslated region*) codée par l'exon 1 et la première partie de l'exon 2 ; le reste de l'exon 2 code pour un peptide signal de 21 AA, nécessaire à l'adressage de la protéine dans les compartiments cellulaires ; les exons 3 à 5 et la première partie de l'exon 6 codent pour la protéine mature ; le reste de l'exon 6 correspond au 3'UTR.

L'ensemble de la région codante conduit à la production d'une protéine de 231 AA présentant 33% d'identités avec la portion extracellulaire de l'IL-22R1. Par ailleurs, l'absence de domaines intra-cytoplasmique et transmembranaire, normalement présents chez les membres conventionnels de la famille CRF2, implique que l'IL-22BP est une protéine sécrétée. La structure de l'IL-22BP associée à l'IL-22 a également pu être résolue par des expériences de cristallographie (de Moura et al., 2009; Trivella et al., 2010) (**Figure 11**). La protéine mature se replie pour prendre une structure en forme de L caractérisée par la présence de 2 domaines FBN-III associés en tandem, nommés D1 (domaine N-terminal correspondant aux résidus 29 à 121) et D2 (domaine C-terminal correspondant aux résidus 126 à 225) respectivement (de Moura et al., 2009). Ces 2 domaines sont reliés par une hélice 3_{10} et espacés d'un angle de 125° . Chaque domaine FBN-III est constitué de 2 feuillets β antiparallèles organisés en sandwich, comprenant les brins A, B, E et C, C' et G respectivement. Les expériences de cristallographie ont confirmé les similarités structurales présentes entre l'IL-22BP et l'IL-22R1 et ont en outre indiqué qu'elles étaient plus particulièrement marquées pour leurs domaines D1 respectifs (résidus 29-121 pour l'IL-22BP et 20-113 pour l'IL-22R1) (de Moura et al., 2009). Ceci est concordant avec le fait que les identités en AA sont plus fortes pour les domaines D1 que D2 (48% vs. 21%) et suggère que le domaine D1 est plus important pour la liaison à l'IL-22.

La masse moléculaire prédite de l'IL-22BP est de 27 kDa mais la migration de la protéine purifiée sur un gel de SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel*) a retrouvé une bande proche de 35-45 kDa (Kotenko et al., 2001) voir de 65 kDa (Gruenberg et al., 2001). Ces expériences sont en faveur de la présence de glycosylations et sont en accord avec l'existence de 5 sites potentiels de N-glycosylation (N-X-T/S où N désigne un résidu asparagine ; T, thréonine ; S, sérine et X n'importe quel AA) prédits par les analyses bio-informatiques. De façon surprenante, une étude a retrouvé une masse moléculaire de 20kDa pour une protéine recombinante produite dans *E.coli* et conjuguée au marqueur Nus, ce qui est inférieur à la masse moléculaire théorique (Wei et al., 2003).

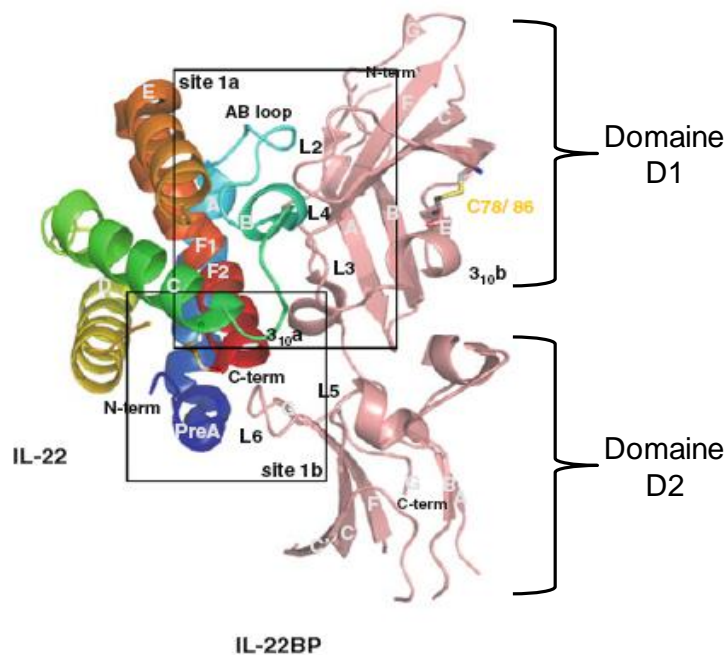


Figure 11: Structure cristallographique du complexe issu de l'interaction entre l'IL-22BP et l'IL-22 (Trivella et al. 2010).

Trois isoformes de l'IL-22BP issues d'épissages alternatifs ont été décrites chez l'homme (**Figure 10B**) (Dumoutier et al., 2001; Gruenberg et al., 2001; Kotenko et al., 2001b; Xu et al., 2001). Ces 3 isoformes codent pour des protéines de 263, 231 et 130 AA et sont désignées sous les termes d'isoformes 1, 2 ou 3 respectivement. Il est important de souligner que seule l'isoforme 2 est capable de se lier efficacement à l'IL-22 et est recouverte sous la dénomination IL-22BP. L'isoforme la plus longue (isoforme 1) correspond à l'ajout d'un exon (exon 4a) de 96 nucléotides entre les exons 3 et 4 de l'isoforme 2 (**Figure 10B**). Cette insertion correspond à une séquence terminale longue répétée (ou LTR pour *long terminal repeat*) d'un rétrotransposon ayant envahi le gène *IL22RA2* au cours de l'évolution, très probablement avant la séparation des singes des Ancien et Nouveau Mondes (Piriyapongsa et al., 2007). La protéine résultante comprend ainsi un insert de 32 AA à proximité de la région importante pour la reconnaissance de l'IL-22, ce qui corrèle avec son incapacité à bloquer les actions de la cytokine (Dumoutier et al., 2001). Il est intéressant de remarquer que cette isoforme est exprimée à de hauts niveaux dans le placenta (Gruenberg et al., 2001), ce qui suggère qu'elle puisse y jouer un rôle, en s'associant à d'autres ligands que l'IL-22. Il est aussi envisageable que cette isoforme représente un moyen de contrôle transcriptionnel de la production d'IL-22BP (Dumoutier et al., 2001). A l'opposé, l'isoforme 3 résulte quant à elle de l'excision de l'exon 5 et code pour une protéine de 130 AA pour laquelle rien n'est connu à l'heure actuelle, mais dont la structure suggère qu'elle ne puisse lier aucun ligand (Kotenko et al., 2001b).

3.1.2 L'IL-22BP de souris et de rat

L'IL-22BP murine a également été caractérisée par 2 groupes indépendants (Wei et al., 2003; Weiss et al., 2004). Le gène *Il22ra2* est localisé au niveau du chromosome 10A3 et recouvre une région d'environ 11 kb, à nouveau intercalée entre les gènes *Ifngr1* et *Il20r1*. L'organisation du gène est similaire à sa contrepartie humaine avec 5 exons codants (Weiss et al., 2004). L'IL-22BP murine comprend 230 AA, dont les 21 premiers correspondent au peptide signal, et est également sécrétée. Sa masse moléculaire prédite est de 24,1 kDa mais elle présente 6 sites potentiels de N-glycosylations. Son alignement avec la protéine humaine retrouve 66% d'identités (Weiss et al., 2004). Aucune autre isoforme n'a pu être identifiée jusqu'à présent.

L'IL-22BP de rat est localisée sur le chromosome 1p12 (Weiss et al., 2004) et recouvre une région de 13 kb, toujours entre les gènes *Ifngr1* et *Il20r1*. La structure du gène est similaire à celles humaine et murine. La protéine comprend 229 AA dont les 20 premiers correspondent au peptide signal. La masse moléculaire prédite de la protéine est de 24,5 kDa mais elle présente 5 sites de N-glycosylation. La protéine mature présente 72% et 84% d'identités avec les protéines humaine et murine respectivement. Comme chez la souris, l'isoforme 1 ne semble pas exister et la séquence additionnelle de 96 nt n'est pas retrouvée dans le génome. Ceci est en accord avec les données indiquant que l'insertion de la séquence LTR aurait eu lieu plus tard dans l'évolution (Piriyapongsa et al., 2007). En revanche, contrairement à la souris, l'équivalent de l'isoforme 3 semble exister chez le rat (voir résultats **article 1**). L'organisation des gènes codant pour l'IL-22BP de souris et de rat en comparaison de celle humaine est présentée dans la **Figure 11**.

Pour finir, le gène *IL22RA2* a récemment été identifié chez le poulet (Kim et al., 2012). A nouveau, ce gène est localisé entre les gènes *IFNGR1* et *IL20R1* et correspond à l'isoforme 2 humaine, c'est-à-dire celle présentant les propriétés inhibitrices de l'IL-22. La grande conservation de l'IL-22BP à travers l'évolution souligne donc la nécessité de l'existence d'une régulation étroite des actions de l'IL-22 par son inhibiteur soluble et par là même une fonction physiologique importante de l'IL-22BP.

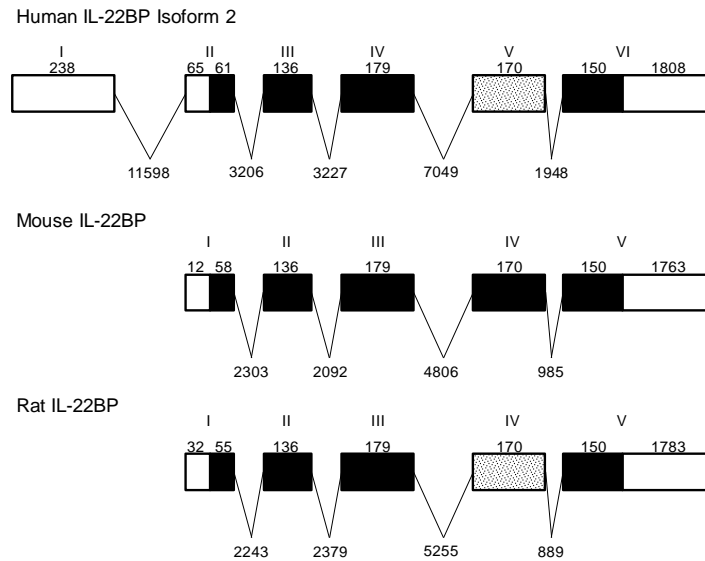


Figure 11: Organisation des jonctions exons-introns des gènes codant pour l'IL-22BP humaine, murine et de rat. Les boîtes noires représentent les exons codant, les boîtes blanches les régions non traduites et les lignes les introns. La boîte tachetée représente l'exon excisé conduisant à la génération de l'isoforme courte chez l'homme et le rat.

3.2 Distribution tissulaire de l'IL-22BP

Chez l'homme, l'expression constitutive de l'isoforme 2 du gène *IL22RA2* a principalement été détectée dans le placenta, le sein, les organes lymphoïdes (thymus, rate, ganglion), le tractus gastro-intestinal (intestin grêle, colon), les poumons et la peau (Dumoutier et al. 2001; Xu et al. 2001). L'isoforme 1 a uniquement été détectée dans le placenta et la distribution tissulaire de l'isoforme 3 n'est pas connue. L'expression de l'IL-22BP a également été évaluée chez la souris dans quelques tissus et semble corroborer les données obtenues chez l'homme. Dans cette étude, l'expression la plus forte est retrouvée au niveau des ganglions lymphatiques (Weiss et al. 2004).

3.3 Sources cellulaires d'IL-22BP

Lorsque ce travail de thèse a été initié, très peu d'études avaient clairement fait état des sources cellulaires d'IL-22BP, que ce soit chez l'homme ou l'animal. En 2001 Xu et al. avaient suggéré que chez l'homme, les monocytes ainsi que les lymphocytes B et T activés pouvaient constituer une source d'IL-22BP, sans pour autant présenter les données (Xu et al. 2001). Deux ans plus tard, Wei et al. suggéraient également que les monocytes murins activés par du lipopolysaccharide (LPS) étaient capables d'exprimer le gène *Il22ra2*. Cependant, dans

ce travail l'expression la plus forte était retrouvée pour une lignée cellulaire, les auteurs n'effectuaient en outre aucune comparaison avec d'autres types cellulaires que les monocytes obtenus par adhérence à partir de la rate. Il apparaissait donc dans ce cas difficile d'évaluer l'importance réelle des niveaux d'expression détectés (Wei et al. 2003). Une expression d'IL-22BP avait également été retrouvée dans les PNN obtenus à partir du liquide broncho-alvéolaire d'un patient en syndrome de détresse respiratoire aiguë (Whittington et al., 2004). Cependant la pureté des PNN ainsi que la technique employée pour leur isolement n'étaient pas présentées. Finalement, une seule étude visant à caractériser les sources cellulaires de l'IL-22BP avait réellement été réalisée (Nagalakshmi et al. 2004). Ce travail mené RT-qPCR sur différentes banques d'ADNc, n'avait retrouvé aucune expression par les monocytes, activés ou non. Des signaux très faibles étaient observés dans les lymphocytes T et B, ainsi que dans les mastocytes activés par du LPS, mais les données n'étaient pas montrées. Aucune expression n'était détectée dans PBMC, ni dans différentes lignées de cellules épithéliales et stromales. En revanche des niveaux d'expression significatifs étaient observés dans les cellules dendritiques dérivées des monocytes (MoDC pour *monocyte-derived dendritic cells*). Cette expression chutait fortement lorsque les cellules étaient activées par du LPS. En conclusion, les sources cellulaires d'IL-22BP étaient donc passablement obscures, les arguments les plus forts portant tout de même sur une expression importante des MoDC.

3.4 Propriétés physico-chimiques de l'IL-22BP

Dès les premiers travaux, il a pu être démontré que l'incubation d'IL-22BP avec l'IL-22 empêchait cette dernière d'exercer ses effets biologiques *in vitro* (Dumoutier et al. 2001; Kotenko 2001b; Xu et al. 2001). Ainsi qu'il l'a été mentionné plus haut, ces propriétés inhibitrices ne concernent que l'isoforme 2 humaine et ont également été confirmées chez la souris (Wei et al. 2003). Le rôle inhibiteur de l'IL-22BP a ensuite été rattaché à ses propriétés physico-chimiques. Il a en effet été déterminé que l'affinité de l'IL-22BP pour l'IL-22 est nettement supérieure à celle de l'IL-22R1 pour l'IL-22 (1pM vs 1nM). L'IL-22BP est par ailleurs incapable de lier aux autres cytokines de la famille de l'IL-10, soulignant sa spécificité pour l'IL-22 (Logsdon et al. 2002). La comparaison des complexes cristallographiques IL-22/IL-22BP et IL-22/IL-22R1 a de plus permis d'établir que les sites d'interactions sont similaires pour les 2 protéines (Trivella et al. 2010), confirmant les résultats de Wu et al. qui indiquaient que l'IL-22BP empêchaient la liaison de l'IL-22R1 à l'IL-22 (Wu et al. 2008). La cristallisation du complexe IL-22BP/IL-22 a de plus caractérisé les sites et la conformation nécessaires à une interaction optimale avec l'IL-22. Les résidus

Y67 et R119, situés dans le domaine D1 (**Figure 11**), sont obligatoirement requis pour l'interaction avec l'IL-22. En accord avec ceci, des expériences de mutagenèse dirigée ont montré que le remplacement de l'un ou l'autre de ces résidus par une alanine abolit complètement l'interaction avec la cytokine (de Moura et al. 2009). Ces résidus sont d'ailleurs conservés sur l'IL-22R1. Cependant l'IL-22BP établit plus d'interactions polaires avec l'IL-22 et présente un large groupement hydrophobe absent de l'IL-22R1. Ces différences structurales entre IL-22BP et IL-22R1 permettent d'expliquer les affinités différentes de ces 2 protéines pour l'IL22. Pour finir, ces expériences de cristallisation ont également permis de montrer que le coefficient stœchiométrique de l'interaction IL-22BP/IL-22 est de 1, conduisant donc à la formation d'un hétérodimère.

En résumé, l'IL-22BP est capable d'établir des interactions de hautes affinités avec l'IL-22 tout en empêchant cette dernière de se lier à son récepteur membranaire. Le complexe IL-22BP/IL-22 est très stable et ne semble pas pouvoir être dissocié une fois formé. Ces données, associées aux résultats expérimentaux obtenus lors des études initiales, affirment donc le caractère inhibiteur de l'IL-22BP, suggérant ainsi un rôle de régulateur négatif des propriétés biologiques de l'IL-22.

3.5 Données biologiques sur l'IL-22BP

Le rôle physiologique de l'IL-22BP reste encore assez mal connu et lors de l'initiation de ce projet de thèse, aucune étude n'avait spécifiquement étudié ses fonctions *in vivo*. En 2008, Sugimoto et al. avaient cependant établi pour la première fois une preuve que l'IL-22BP pouvait inhiber les actions de l'IL-22 *in vivo*. Dans leur étude, les auteurs montraient que l'induction d'une production localisée d'IL-22BP par la micro-injection pressurisée d'un vecteur non viral contenant le gène *Il22ra2*, permettait d'inhiber les effets protecteurs de l'IL-22 au cours d'une colite induite par le DSS. L'expression de l'IL-22BP, détectée par RT-qPCR, restait localisée au niveau du site de l'injection, de même que ses effets inhibiteurs, indiquant que la diffusion tissulaire de l'IL-22BP semble limitée. (Sugimoto et al. 2008). Une autre étude avait par ailleurs évoqué un rôle délétère de l'IL-22BP au cours de la maladie de Verneuil. D'étiologie encore inconnue, cette pathologie se caractérise par une occlusion du follicule pilo-sébacé conduisant à une inflammation secondaire ainsi qu'à des suppurations liées à des surinfections bactériennes. Bien que l'IL-22 fût induite dans la peau lésionnelle, ses niveaux d'expression étaient plus faibles que dans le psoriasis. Au contraire, l'expression d'IL-22BP était quant à elle plus forte. Ces résultats avaient conduit les auteurs à supposer

que l'IL-22BP pourrait donc inhiber l'IL-22 et entraver l'induction de l'expression de PAMs (Wolk et al. 2010).

La régulation de l'expression du gène *Il22ra2* n'était, elle non plus, pas très étudiée. Ainsi qu'il l'a déjà été précisé, l'expression importante de l'IL-22BP par les MoDC immatures chutait après leur activation par le LPS (Nagalakshmi et al. 2004). Plusieurs travaux indiquaient également une diminution de l'expression de l'IL-22BP au cours de colites induites par le DSS (Wolk et al. 2007; Sugimoto et al. 2008). A l'inverse, une expression accrue au niveau de l'appendice inflammatoire, ainsi que dans des carcinomes ovariens étaient observées chez l'homme (Xu et al. 2001). Une induction était par ailleurs décrite dans le foie au cours de différents modèles d'infections par des schistosomes, mycobactéries et *Toxoplasma gondii* (Wilson et al. 2010), ainsi que dans la rate et le rein dans un modèle de péritonite polymicrobienne (Weber et al. 2007). Dans cette étude, les auteurs suggéraient de plus que les effets délétères de l'IL-22 observés dans ce modèle étaient atténués par l'injection d'IL-22BP recombinante. Finalement, une induction importante de l'expression du gène *Il22ra2* était notée dans les articulations inflammatoires des souris *Il1ra*^{-/-} (Marijnissen et al. 2011).

Pour conclure, deux études avaient aussi décrit l'association de SNPs du gène *IL22RA2* à des formes plus sévères de sclérose en plaque (Beyeen et al., 2010; Vandembroeck et al., 2011), et une avait identifié un SNP associé à la progression de la leucémie lymphoïde chronique (Wade et al. 2011).

Objectifs du projet

L'étude des propriétés biologiques de l'IL-22 révèle qu'il s'agit d'une cytokine aux actions puissantes, particulièrement importantes pour renforcer les propriétés de barrière et la régénération épithéliale au cours d'infections ou de lésions tissulaires sévères. La contrepartie de ces actions protectrices réside dans le caractère hautement délétère que peuvent renfermer une exacerbation et/ou une prolongation de ses effets, et justifie donc la mise en place d'un système de contrôle rigoureux. Une compréhension plus précise des fonctions biologiques et immunopathologiques de l'IL-22 semble ainsi devoir intégrer l'étude de ces mécanismes de contrôle dont l'IL-22BP représente probablement un des éléments les plus importants. Pour autant, au-delà de sa nature sécrétée et de ses propriétés hautement inhibitrices sur les actions de l'IL-22 *in vitro*, l'IL-22BP est une protéine encore assez peu caractérisée. Par conséquent, ce travail de thèse a eu pour objectif de tenter de mieux appréhender certains des aspects principaux concernant la biologie de l'IL-22BP chez l'homme et le rongeur.

L'objectif de ce travail aura ainsi été triple :

1. Identifier les sources cellulaires d'IL-22BP chez l'homme et le rongeur.

Pour ce faire, une analyse de l'expression d'IL-22BP par RT-qPCR a été réalisée sur cellules triées par cytométrie en flux, particulièrement à partir des différents compartiments du système immunitaire muqueux intestinal, où des niveaux d'expression constitutifs élevés sont détectés (**articles 1&2 ; Figure 12**). Une analyse de la production d'IL-22BP au niveau protéique a également pu être réalisée *in situ* dans les muqueuses iléale et colique humaines saines, ainsi que dans la muqueuse colique inflammatoire de patients atteints de MICI, par des expériences de double immunomarquages en IFI (**article 2**).

2. Caractériser la régulation d'expression de l'IL-22BP

L'étude de la régulation d'expression de l'IL-22BP a d'abord été réalisée *in vitro*, en utilisant des MoDC humaines qui l'expriment fortement. L'expression a été analysée par des expériences de RT-qPCR et d'IFI (**article 1**). La régulation de l'expression d'IL-22BP a ensuite été effectuée *in vivo* par des expériences de RT-qPCR chez le rat, dans les modèles de colite induite par le DSS et de lésions psoriasiformes induites par l'application topique d'Aldara® (**article 2 ; Figure 13**). Finalement, l'expression d'IL-22BP a été analysée par RT-

qPCR, IHC et IFI dans les MICI, sur des prélèvements réalisés en parallèle au niveau des muqueuses saines et inflammatoires de patients atteints de MC et de RCH, ainsi que sur des muqueuses saines de témoins.

3. Définir la place de l'IL-22BP en immunopathologie

Afin de déterminer le rôle que l'IL-22BP pourrait jouer en immunopathologie, des rats déficients pour l'IL-22BP ont été générés en utilisant les *zinc-finger nucleases*, et analysés dans les modèles de colite induite par le DSS (**article 2**) et de lésions psoriasiformes induites par l'application topique d'Aldara[®] (**Figures 13&14**). Le retentissement de sa régulation différentielle entre la MC et la RCH a également été évalué par l'analyse de l'expression de gènes induits par l'IL-22 sur des prélèvements réalisés en parallèle au niveau des muqueuses saines et inflammatoires (**article 2**).

Résultats

Article 1 : « L'IL-22BP est exprimée constitutivement par une sous-population de cellules dendritiques et est fortement induite par l'acide rétinoïque »

Résumé :

L'interleukine 22 (IL-22) est principalement produite au niveau des tissus de barrière, par les lymphocytes T et les cellules lymphoïdes innées du groupe 3, où elle exerce des rôles majeurs dans le maintien de l'intégrité épithéliale. Cependant, des actions dérégulées de l'IL-22 peuvent s'avérer extrêmement dangereuses et sont impliquées dans le psoriasis, l'inflammation intestinale et certains cancers. L'IL-22 *binding protein* (IL-22BP) est un inhibiteur soluble de l'IL-22 et constitue probablement un régulateur clef des actions de l'IL-22. Nous montrons dans ce travail, que chez la souris comme chez le rat, la source principale d'IL-22BP est représentée par une sous-population de cellules dendritiques conventionnelles (cDCs) dans les tissus épithéliaux et lymphoïdes. Dans l'intestin de souris, l'IL-22BP est exprimé spécifiquement par les cDCs CD103⁺ CD11b⁺ de la *lamina propria*. Chez l'homme, l'IL-22BP est exprimée par les cellules dendritiques dérivées des monocytes. Son expression peut par ailleurs être fortement induite par l'acide rétinoïque mais chute considérablement au cours de la maturation. Nos résultats suggèrent donc qu'une sous-population de cDCs immatures participe activement à la régulation des actions de l'IL-22, notamment dans l'intestin, grâce à la production de hauts niveaux d'IL-22BP.

Interleukin-22 binding protein (IL-22BP) is constitutively expressed by a subset of conventional dendritic cells and is strongly induced by retinoic acid

JCJ Martin¹⁻⁴, G Bériou^{1,2}, M Heslan^{1,2}, C Chauvin^{1,2}, L Utriainen⁵, A Aumeunier⁵, CL Scott⁵, A Mowat⁵, V Cerovic⁵, SA Houston⁵, M Leboeuf⁶, FX Hubert^{1,2,4}, C Hémont¹⁻⁴, M Merad⁶, S Milling⁵ and R Josien¹⁻⁴

Interleukin-22 (IL-22) is mainly produced at barrier surfaces by T cells and innate lymphoid cells and is crucial to maintain epithelial integrity. However, dysregulated IL-22 action leads to deleterious inflammation and is involved in diseases such as psoriasis, intestinal inflammation, and cancer. IL-22 binding protein (IL-22BP) is a soluble inhibitory IL-22 receptor and may represent a crucial regulator of IL-22. We show both in rats and mice that, in the steady state, the main source of IL-22BP is constituted by a subset of conventional dendritic cells (DCs) in lymphoid and non-lymphoid tissues. In mouse intestine, IL-22BP was specifically expressed in lamina propria CD103⁺ CD11b⁺ DC. In humans, IL-22BP was expressed in immature monocyte-derived DC and strongly induced by retinoic acid but dramatically reduced upon maturation. Our data suggest that a subset of immature DCs may actively participate in the regulation of IL-22 activity in the gut by producing high levels of IL-22BP.

INTRODUCTION

Interleukin 22 (IL-22) is a member of the IL-10 cytokine family.¹ IL-22 signals through the class 2 cytokine receptor family member (CRF2) IL-22 receptor (IL-22R) consisting of IL-10Rβ1 and IL-22R1 chains. IL-22R1 expression is restricted to epithelial cells, hepatocytes, and acinar cells of the pancreas,²⁻⁴ while IL-10Rβ1 expression is ubiquitous. By contrast, IL-22 is produced by a broad variety of immune cells. Innate sources of IL-22 are principally innate lymphoid cells (ILCs),¹ mainly lymphoid tissue inducer (LTi)-like cells and the recently described ILC22, which shares characteristics with LTi and natural killer (NK) cells, and specialize in IL-22 production. Adaptive IL-22 sources are exclusively T lymphocytes.¹

The IL-22/IL-22R expression pattern makes IL-22 an important cytokine mediating the cross-talk between

leucocytes and epithelia, particularly at barrier surfaces. Indeed, IL-22 is critical in reinforcing innate immune defences of epithelial cells in gut and lung infectious models.^{5,6} IL-22 is also important in the promotion of tissue repair.^{3,7-9} Nevertheless, numerous studies have also demonstrated that IL-22 can be a potent inducer of pathological inflammation. Indeed, IL-22 can promote tissue inflammation and self-destruction¹⁰⁻¹³ and is involved in the pathophysiology of several immune-mediated inflammatory diseases, such as psoriasis and rheumatoid arthritis. These paradoxical effects of IL-22 are dependent on the context of IL-22 production,¹³ as IL-22 can synergistically act with other inflammatory cytokines, including IL-17 and tumor necrosis factor-α.^{13,14} A tight regulation of the IL-22/IL-22R axis appears therefore critical in maintaining the beneficial effects of IL-22 and avoiding deleterious inflammatory effects.

¹INSERM Center of Research in Transplantation and Immunology, UMR1064, Nantes, France. ²CHU Nantes, Institut de Transplantation Urologie Néphrologie (ITUN), Nantes, France. ³CHU Nantes, Laboratoire d'immunologie, Nantes, France. ⁴Faculté de Médecine, Université de Nantes, Nantes, France. ⁵Centre for Immunobiology, Institute of Infection, Immunity and Inflammation, College of Medical, Veterinary and Life Sciences, University of Glasgow, Glasgow, UK. ⁶Department of Gene and Cell medicine and the Department of Medicine, Mount Sinai School of Medicine, New York, New York, USA. Correspondence: R. Josien (Regis.josien@univ-nantes.fr)

Received 17 October 2012; accepted 8 April 2013; published online 8 May 2013. doi:10.1038/mi.2013.28

ARTICLES

IL-22 is the only member of the IL-10 cytokine family to have a soluble-secreted receptor, called IL-22 binding protein (IL-22BP, also known as IL22RA2).^{15–17} IL-22BP specifically binds to IL-22¹⁸ and is also a CRF2 member. Among the CRF2 members, IL-22BP shares the highest structural homology with the IL-22R1 chain. Nevertheless, IL-22BP exhibits a much higher affinity for IL-22 than the transmembrane IL-22R.¹⁹ Crystallization experiments revealed the molecular basis of the affinity differences between the IL-22/IL22BP and IL-22/IL-22R1 complexes.²⁰ IL-22BP inhibits IL-22 biological effects *in vitro*^{15–17} and *in vivo*⁸ and is constitutively expressed in secondary lymphoid organs (SLO), breast, and epithelial tissues, such as gut, lung, and skin.¹⁵ Taken together, these results suggest that IL-22BP acts as a natural regulator of IL-22, preventing exaggerated effects of the cytokine. Understanding IL-22BP biology may allow a better assessment of IL-22 paradoxical effects mentioned above. However, very little is known regarding IL-22BP cellular sources, regulation, and properties *in vivo*.

Dendritic cells (DCs) are rare cells of hematopoietic origin, widely distributed in the majority of tissues and specialized in capture, processing, and presentation of antigens to naive T cells.²¹ Depending on the type of DC and its activation state, the DC/T cell interaction leads to the initiation of an immune response or to T-cell tolerance. DCs are classified as conventional, plasmacytoid, or inflammatory DCs.²² Conventional DCs (cDCs) include non-lymphoid resident tissue DCs that migrate to draining lymph nodes (LNs) and lymphoid resident DCs. Both are equipped with various pathogen-recognition receptors allowing them to sense the environment and recognize pathogen-associated molecular patterns.²³ Before encountering a pathogen, DCs are present in an immature state and specialize in sampling the environment. After pathogenic antigen capture and recognition, cDCs undergo maturation and express high levels of major histocompatibility complex (MHC) and co-stimulatory molecules, allowing them to activate naive T cells. By this process, cDCs are able to elicit specific adaptive immune responses making them the necessary link between innate and adaptive immunity. In the absence of maturation signals, cDCs present antigens in an immature state, leading to T-cell tolerance. cDCs therefore also contribute to the maintenance of peripheral tolerance to self-antigens.

In this study, we show that the constitutive production of IL-22BP in lymphoid and gut tissues results from a production by a subset of cDCs at an immature state. We identify retinoic acid (RA) as a potent inducer of IL-22BP expression in DCs and show that IL-22BP expression is dramatically downregulated upon DC maturation.

Our results suggest a new role for cDCs in the maintenance of tissue homeostasis by participating in the IL-22-mediated dialogue between immune and epithelial cells.

RESULTS

Tissue expression pattern of IL-22BP in the rat

We first assessed the expression of IL-22BP mRNA in rat tissues and organs. The highest levels of IL-22BP were found in SLO,

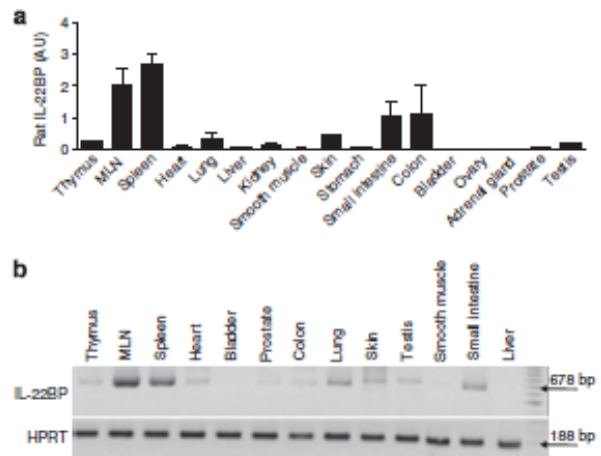


Figure 1 Tissue expression pattern of interleukin-22 binding protein (IL-22BP) in the rat. (a) IL-22BP gene expression was analyzed by quantitative reverse transcriptase–PCR (RT-qPCR). Bars represent the mean \pm s.e.m. ratio of IL-22BP gene to HPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) expression as determined by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method of relative quantification from two experiments. (b) IL-22BP gene expression was analyzed by RT-PCR using primers allowing amplification of whole *il22ra2* mRNA. Values indicate expected molecular mass of PCR products. Data are representative of two independent experiments. AU, arbitrary units; MLN, mesenteric lymph node.

i.e., spleen and mesenteric, axillary and cervical LNs (Figure 1a and Supplementary Figure S1A online). Lower levels of expression were found in thymus and several epithelial tissues, including gut, lungs, skin, and testis. This expression pattern was in agreement with those reported in human and mouse.^{15,17,24} However, although we confirmed that IL-22BP mRNA was strongly expressed in LN in mouse, it was expressed at very low levels in spleen (Supplementary Figure S1B), suggesting species- or strain-specific variation in the pattern of IL-22BP expression.

Three isoforms of IL-22BP exist in human^{15–17} but only isoform 2 efficiently binds and inhibits IL-22.^{15,16} The physiological roles of the other isoforms remain undetermined. Interestingly, only the human isoform 2 counterpart was identified in mouse,²⁴ suggesting that IL-22 regulation by IL-22BP is an evolutionarily conserved process. Only one band, corresponding to human isoform 2, was detected in rat tissues (Figure 1b). The absence in the rat *il22ra2* gene of a sequence corresponding to human exon 4a¹⁶ suggested that isoform 1 did not exist in rat. In agreement with this observation, human isoform 1 was shown to be the result of a long terminal repeat insertion in the ape lineage.²⁵ Finally, rat counterpart of human isoform 3 was not detected in these samples.

IL-22BP is highly expressed in rat spleen by a subset of resident cDCs in the steady state

High expression of *il22ra2* gene in SLO suggested a hematopoietic origin of IL-22BP cellular sources. To test this hypothesis, different populations of hematopoietic cells were isolated from rat spleen by cell sorting, including the three

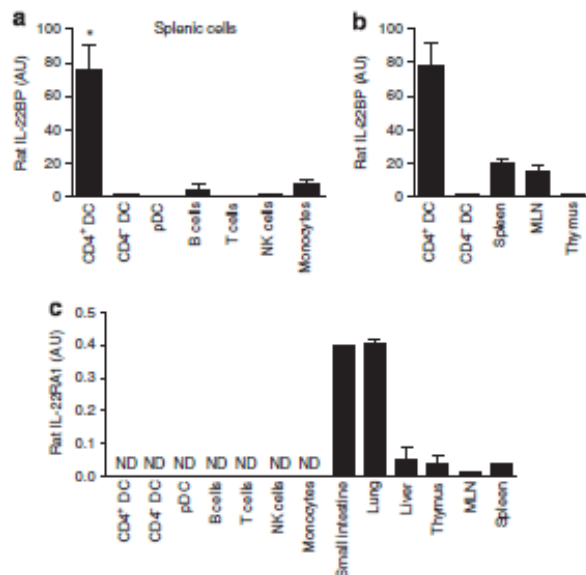


Figure 2 Interleukin-22 binding protein (IL-22BP) is highly expressed in the spleen by a subset of resident conventional dendritic cells (DCs). (a) The different populations of splenic hematopoietic cells were isolated by cell sorting. IL-22BP gene expression was analyzed by quantitative reverse transcriptase-PCR (RT-qPCR) and normalized relative to HPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) expression ($n=4$ for DCs; $n=5$ for B cells; $n=3$ for T cells, natural killer (NK) cells, and monocytes). (b) IL-22BP gene expression was compared by RT-qPCR for DCs ($n=3$) in spleen, mesenteric lymph node (MLN), and thymus ($n=2$). In a and b, bars represent mean \pm s.e.m. of IL-22BP gene to HPRT expression as determined by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method of relative quantification. (c) Hematopoietic cells were isolated by cell sorting. IL-22RA1 gene expression was analyzed by RT-qPCR with several tissues being used as positive controls ($n=3$ for cell sample; $n=2$ for tissue samples). Bars represent mean \pm s.e.m. ratio of IL-22RA1 gene to HPRT expression as determined by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method of relative quantification. * $P<0.05$. AU, arbitrary units; ND, not detected; pDC, plasmacytoid dendritic cell.

subsets of DCs we have previously described (plasmacytoid DCs, CD172a⁺ CD4⁺, and CD172a⁻ CD4⁻ cDCs).^{26,27} Quantitative PCR (qPCR) analysis revealed high IL-22BP expression by the CD172a⁺ CD4⁺ cDC subset (referred thereafter as CD4⁺ splenic DCs (spDCs)), whereas other populations only showed low levels of expression (Figure 2a). Moreover, CD4⁺ spDCs presented a fivefold higher expression of IL-22BP than whole spleen (Figure 2b), strongly suggesting that these cells are the major source of IL-22BP in spleen in the steady state.

IL-22BP protein expression was evaluated by immunofluorescence staining of sorted DCs. IL-22BP staining was detected in virtually all CD4⁺ spDCs, whereas fluorescence observed in CD4⁻ spDCs was not different from that obtained after staining with secondary antibody only (Figure 3).

Finally, we did not detect any expression of the IL-22RA1 transmembrane receptor in the various splenic hematopoietic cell subsets, including CD4⁺ spDCs (Figure 2c).

Taken together, our data suggest a role for CD4⁺ spDCs in the regulation of IL-22 biological effects in the steady state via IL-22BP secretion.

A subset of intestinal DCs expresses high levels of IL-22BP in the steady state

We hypothesized that cDCs might also be a constitutive source of IL-22BP in epithelial tissues, and particularly in the gut where significant levels of IL-22BP expression were detected (Figure 1). We first analyzed IL-22BP expression by migrating intestinal rat cDC subsets. For this purpose, intestinal lymph DCs (iLDCs) were obtained by lymph collection after thoracic duct cannulation of mesenteric lymphadenectomized rats.²⁸ MHCII^{hi} CD103⁺ lymph DC subsets were then sorted into three subsets based on their differential expression of CD172a and CD11b, as previously described.^{28,29} High levels of IL-22BP mRNA expression were found in the CD172a^{high} iLDC subset (referred thereafter as CD172a^{high} iLDCs). This expression was about 50-fold higher than IL-22BP expression in small intestine (SI) and colon (Figure 4a). High expression of IL-22BP was also observed in CD172a⁺ CD4⁺ DCs from rat mesenteric LNs (MLNs; Figure 4b and Supplementary Figure S2) and Peyer patches (data not shown). In addition, *in vitro* DC depletion abolished IL-22BP expression in rat MLN (Figure 4c).

Interestingly, detailed phenotypical, functional, and transcriptomic analysis of CD172a^{high} iLDCs vs. CD172a⁺ CD4⁺ spDCs indicated that they have very strong similarities (R Josien and S Milling, unpublished observations) and most likely represent the same DC subset. This suggests that high IL-22BP expression is an intrinsic property of this subset of cDCs. Of note, IL-22BP expression was fivefold higher in CD172a^{high} iLDCs than in CD4⁺ spDCs (Figure 4a). Thus, even if IL-22BP expression is a characteristic of these cells, factors present in the gut environment are also likely to promote higher levels of IL-22BP expression.

To determine whether such a functional specialization of cDC subsets regarding IL-22BP expression also holds true in mice, we first analyzed data from mouse cDNA microarrays obtained from the Immunological Genome Project (available from the ImmGen website: www.immgen.org). High levels of IL-22BP expression in steady state were observed in one small intestinal lamina propria (LP) DC subset, namely CD103⁺ DCs. We confirmed IL-22BP expression by the LP CD103⁺ CD11b⁺ subset by qPCR (Figure 4d). By contrast, only low levels could be detected in CD103⁺ CD8 α ⁺ LPDCs and intestinal LP macrophages. In MLN, MHCII^{high} CD103⁺ DCs, which are known to be migrating DCs,³⁰ were sorted in CD11b⁺ and CD11b⁻ DCs; IL-22BP expression was much stronger in CD11b⁺ DCs as compared with CD11b⁻ (Figure 4e). Moreover, IL-22BP expression was also significantly diminished in the colon of mice deficient for Fms-like tyrosine kinase 3 (Flt3L), which are known to lack CD103⁺ DC (Figure 4f). Unexpectedly, SI from Flt3L^{-/-} mice expressed similar levels of IL-22BP mRNA as compared with wild-type mice.

Finally, no IL-22BP expression was found among the different populations of human peripheral blood cells, including polymorphonuclear neutrophils, eosinophils, and basophils, lymphocytes, monocytes, as well as BDCA1⁺ and BDCA3⁺ cDCs and plasmacytoid DCs (data not shown).

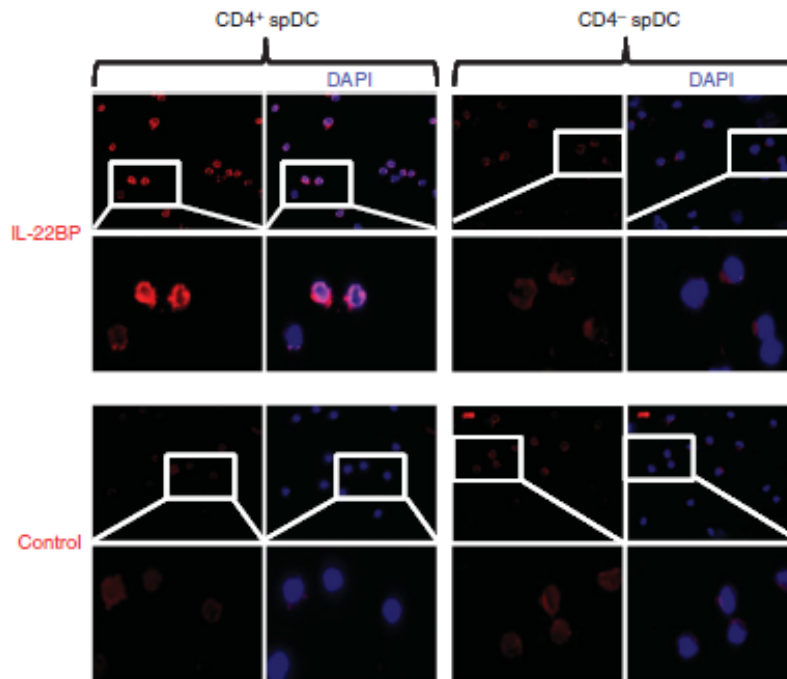


Figure 3 Interleukin-22 binding protein (IL-22BP) staining on sorted subsets of rat splenic conventional DCs. The two subsets of rat conventional spleen DCs (spDCs) were isolated by cell sorting and let to adhere on poly-L-Lysine pre-coated slides for 30 min in the presence of Brefeldin A and monensin. Slides were then stained with a goat anti-rat IL-22BP pAb followed by a donkey anti-goat immunoglobulin G-Alexa fluo 568. Controls were performed using the secondary antibody alone. Data are representative of two independent experiments. DAPI, 4,6-diamidino-2-phenylindole.

Taken together, our results highly support the hypothesis that natural production of IL-22BP results mainly from a constitutive expression by a subset of cDCs both in SLO and in epithelial tissues.

Rat CD4⁺ spDCs express a counterpart of the human short isoform of IL-22BP

PCR experiments revealed the presence of two transcripts in rat CD4⁺ spDCs (Figure 5), the longest and the most intense one corresponding to the expected 678 bp mRNA, as further confirmed by sequencing. Translation of the nucleotide sequence obtained after sequencing gave a putative protein of 229 AA (data not shown), showing 72% identity with the human isoform 2 of IL-22BP, i.e., the isoform inhibiting IL-22 effects. Interestingly, sequencing of the PCR product corresponding to the shorter band identified a shorter isoform of rat IL-22BP. Like in human, the sequence of this isoform presented a complete excision of exon 5. Alignment of the rat short isoform with its human counterpart revealed 80% identity (Supplementary Figure S3A). Translation of the sequence gave a putative protein of 135 AA, showing 73% identity with human isoform 3 (Supplementary Figure S3B). Expression of this shorter isoform probably results from an alternative mRNA splicing and its physiological significance is unknown. Two important residues for IL-22 binding, Y65 and R117, which are the rat counterparts of human Y67 and R119, are

conserved in this short isoform. These two residues have been demonstrated to be independently crucial for IL-22 binding,²⁰ suggesting that the rat IL-22BP short isoform may also be able to bind IL-22, although probably less efficiently.

IL-22BP is expressed in human monocyte-derived DCs

To study in more detail the regulation of IL-22BP expression in DCs, we analyzed its expression in monocyte-derived dendritic cells (MDDCs). As shown in Figure 6a,b, IL-22BP mRNA expression was strongly induced during DC differentiation. IL-22BP expression at the protein level was confirmed by indirect immunofluorescence stainings experiments (Figure 6c). Moreover, no clear IL-22BP induction was detected when monocytes were differentiated in other conditions than granulocyte macrophages colony-stimulating factor (GM-CSF) and IL-4-supplemented media (Supplementary Figure S4). Finally, we found that both IL-22BP isoforms 1 and 2 were expressed by MDDCs (Figure 6d) as further confirmed by sequencing (data not shown). Isoform 3 was not detected in human MDDCs.

RA is a potent inducer of IL-22BP expression by DCs

As IL-22BP expression was fivefold higher in rat intestinal DCs than in splenic DCs (Figure 4a), we hypothesized that inducers of IL-22BP expression could be present in the gut environment. We thus analyzed IL-22BP expression by MDDCs cultured with various molecules present in high amounts in the gut.

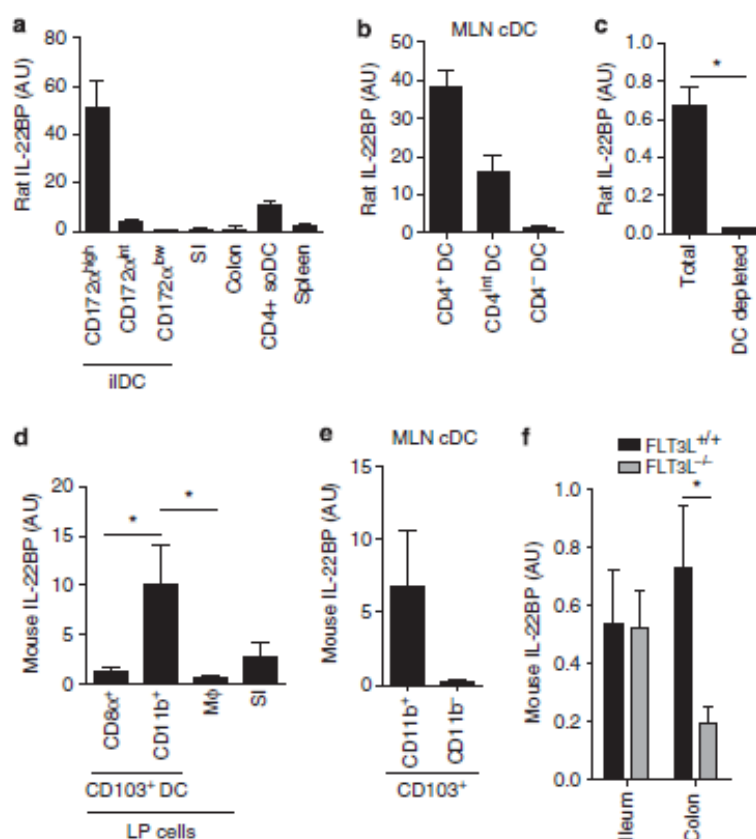


Figure 4 A subset of intestinal dendritic cells (DCs) expresses high levels of interleukin-22 binding protein (IL-22BP) in the steady state. (a) Constitutively migrating intestinal lymph DCs (iIDCs) subsets were obtained by lymph collection after thoracic duct cannulation of mesenteric lymphadenectomized rat and cell sorting. IL-22BP gene expression was analyzed by quantitative reverse transcriptase-PCR (RT-qPCR) for the three subsets of iIDCs and compared with intestinal tissues and its CD4⁺ DC spleen counterpart ($n=3$ for iIDCs; $n=2$ for tissues). (b) The three subpopulations of rat mesenteric lymph node (MLN)-DCs were isolated by cell sorting and analyzed for IL-22BP expression by RT-qPCR ($n=3$). (c) Total DCs were depleted from total MLN cells by fluorescence-activated cell sorter depletion of CD103⁺ cells. IL-22BP gene expression was analyzed by RT-qPCR ($n=3$). (d) Mouse CD8⁺ and CD11b⁺ CD103⁺ DC subsets and macrophages were isolated from intestinal lamina propria (LP) by cell sorting. IL-22BP gene expression was analyzed by RT-qPCR ($n=3$ for DCs and small intestine (SI) tissue; $n=2$ for macrophages (Mφ)). (e) Mouse MLN CD103⁺ DCs were separated into CD11b⁺ and CD11b⁻ by cell sorting and analyzed for IL-22BP expression by RT-qPCR ($n=3$). (f) IL-22BP gene expression was analyzed by RT-qPCR in SI and colon of wild-type ($n=3$) and Flt3L^{-/-} (Fms-like tyrosine kinase 3; $n=3$) mice. In a–c (rat), e and f (mouse), bars represent mean \pm s.e.m. ratio of IL-22BP gene to HPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) expression as determined by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method of relative quantification. In d (mouse), bars represent mean \pm s.e.m. ratio of IL-22BP gene to GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) expression as determined by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method of relative quantification. * $P<0.05$. AU, arbitrary units; cDC, conventional dendritic cell.

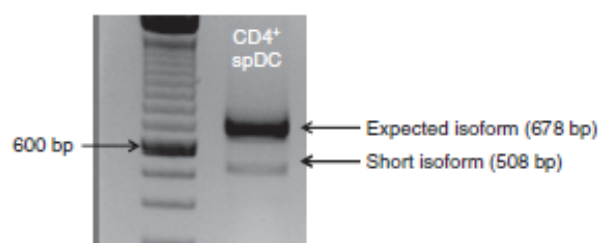


Figure 5 Rat CD4⁺ dendritic cells (DCs) express a counterpart of the human short isoform of interleukin-22 binding protein (IL-22BP). Spleen CD4⁺ conventional DCs were isolated by cell sorting. IL-22BP gene expression was analyzed by reverse transcriptase-PCR using primers allowing amplification of whole *il22ra2* mRNA. spDC, spleen dendritic cell.

When added during the last 2 days of DC culture, transforming growth factor- β (TGF- β), thymic stromal lymphopietin, IL-13, and IL-10 had no effect on IL-22BP mRNA expression (Figure 7). By contrast, a strong upregulation (eightfold) of IL-22BP expression was induced by AM580, an agonist of RA receptor alpha (RAR α) (Figure 7), suggesting that RA can enhance IL-22BP expression in DCs.

The effects of the RAR α agonist AM580 were even stronger when added on day 0 of MDDC differentiation. AM-DCs (AM580 added on d0) exhibited a strong upregulation of IL-22BP mRNA and protein expression (Figure 8a–c). Interestingly, AM-DCs not only upregulated IL-22BP expression but also acquired a different phenotype characterized

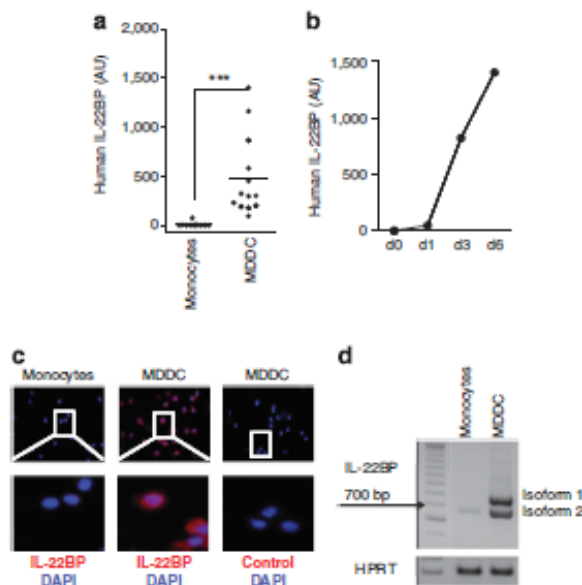


Figure 6 Interleukin-22 binding protein (IL-22BP) is expressed in human monocyte-derived dendritic cells (MDDCs). Human monocytes from peripheral blood of healthy donors were differentiated into DCs in complete medium with granulocyte macrophages colony-stimulating factor and IL-4 for 6 days. (a) On day 6, IL-22BP gene expression was analyzed by quantitative reverse transcriptase-PCR (RT-qPCR). Each point represents the ratio of IL-22BP gene to HPRT (hypoxanthine phosphoribosyltransferase) expression, as determined by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method of relative quantification, for an individual healthy donor ($n=14$). (b) Cells were collected at the indicated times during MDDC differentiation and IL-22BP gene expression analyzed by RT-qPCR. Each point represents the ratio of IL-22BP gene to HPRT expression as determined by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method of relative quantification. Data are representative of two independent experiments. (c) Monocytes and MDDCs were let to adhere on poly-L-Lysine pre-coated slides for 30 min in the presence of Brefeldin A and monensin and then stained with a mouse immunoglobulin G1 (IgG1) anti-human IL-22BP as primary antibody followed by goat anti-mouse IgG1-Alexa fluor 568. Controls were performed using the secondary antibody alone. Data are representative of four independent experiments. (d) IL-22BP gene expression was analyzed by RT-PCR using primers allowing amplification of whole *il22ra2* mRNA. Data are representative of three independent experiments. *** $P<0.001$. DAPI, 4,6-diamidino-2-phenylindole.

by CD103 and CD1d expression, and loss of CD1a expression (Figure 8d), confirming previously published results.^{31,32} The same results were obtained when RA itself was added in the culture (Figure 8e and data not shown). Moreover, experiments using selective inhibitors of RA nuclear receptor revealed that RA effects on IL-22BP, CD103, and CD1d expression induction by MDDCs mostly involved RAR α signaling (Figure 8e and data not shown).

RA is the active metabolite of dietary vitamin A. Vitamin A is first oxidized into retinal by several enzymes, including alcohol dehydrogenase, then retinal is oxidized into RA by specific dehydrogenases, including retinal dehydrogenase 2 (RALDH2).³³ GM-CSF and IL-4 induce the expression of RALDH2 in human MDDCs³⁴ early during differentiation (Supplementary Figure S5A,B), which endows them with the

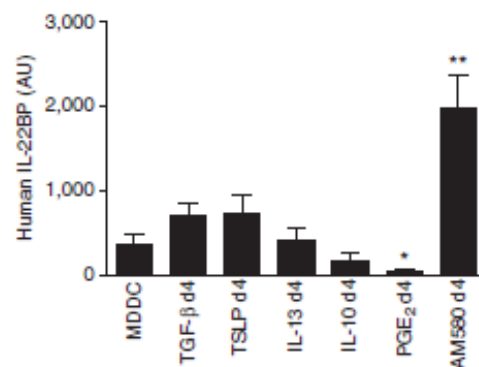


Figure 7 Retinoic acid is a potent inducer of interleukin-22 binding protein (IL-22BP) expression by dendritic cells (DCs). Human monocytes from peripheral blood of healthy donors were differentiated into DCs in complete medium with granulocyte macrophages colony-stimulating factor and IL-4 for 6 days. When indicated, ligands were added at day 4 of culture. On day 6, IL-22BP gene expression was analyzed by quantitative reverse transcriptase-PCR. Bars represent mean \pm s.e.m. ratio of IL-22BP gene to HPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) expression as determined by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method of relative quantification from seven independent experiments. ** $P<0.01$; * $P<0.05$. MDDC, monocyte-derived dendritic cell; PGE₂, prostaglandin E₂; TGF, transforming growth factor; TSLP, thymic stromal lymphopoietin.

capacity to metabolize retinal into RA. IL-22BP expression was upregulated by addition of retinal during DC differentiation. This induction was significantly diminished by a RALDH2 reversible inhibitor, diethylaminobenzaldehyde (DEAB; Figure 8f). These findings implied that specific metabolism of retinal by human MDDCs allows RA production, which in turn induces IL-22BP expression, probably in an autocrine fashion.

Interestingly, addition of PGE₂ (prostaglandin E₂), which was recently described as a RALDH2 inhibitor,³⁴ abolished the expression of IL-22BP in MDDCs (Figure 7). This suggests that constitutive expression of IL-22BP by MDDCs could be due to low levels of RA production, from retinal present in the serum added in the culture media. However, MDDCs differentiated in serum-free media or in serum-supplemented media with the RAR α antagonist also expressed IL-22BP (data not shown and Supplementary Figure S5C), indicating that IL-22BP production is not totally dependent on DC's ability to produce RA.

RALDH2 expression in MDDCs peaked after 20 h and progressively decreased until day 6 (Supplementary Figure S5B), which could suggest that RA exerts its effects on MDDCs at early stages of the differentiation. We therefore examined the effect of delayed addition of the RAR α inhibitor on MDDC differentiation in the presence of RA. CD103 induction was inhibited when the RAR α inhibitor was added at days 0, 1, 2, and 3 of the culture but not later (Supplementary Figure S5D). The effects on CD1d were even more pronounced as inhibition was only observed when the inhibitor was added at the beginning of the culture. This indicated that RA effects on the AM-DC phenotype occur early during the differentiation.

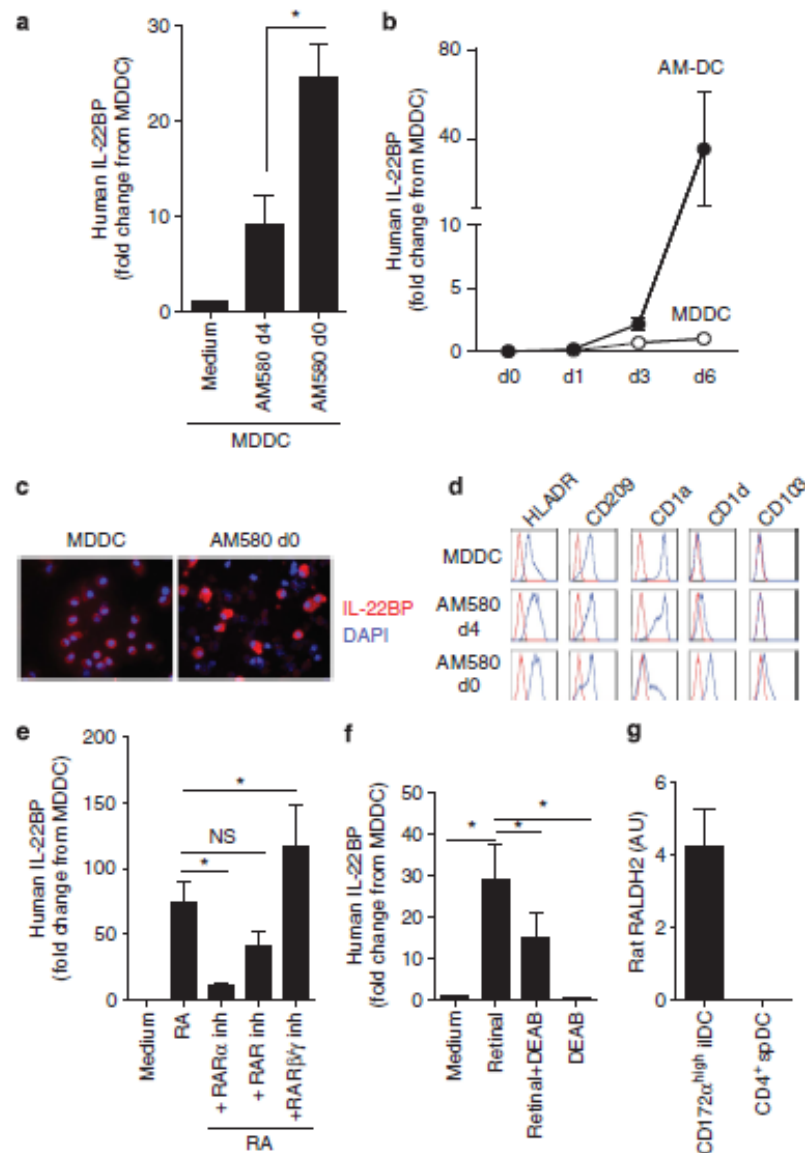


Figure 8 AM580-induced differentiation of monocyte-derived dendritic cells (MDDCs) enhances interleukin-22 binding protein (IL-22BP) expression. (a) MDDCs were differentiated in the absence or presence of AM580 added at day 0 or day 4 of culture. IL-22BP gene expression was analyzed by quantitative reverse transcriptase–PCR (RT-qPCR). Bars represent mean \pm s.e.m. of fold change compared with GM-CSF (granulocyte macrophages colony-stimulating factor)/IL-4-derived MDDCs, of IL-22BP gene to HPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) expression as determined by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method of relative quantification ($n=4$). (b) Cells were harvested at the indicated times during MDDC differentiation in the presence or the absence of AM580 added at day 0. IL-22BP gene expression was analyzed by RT-qPCR. Each point represents mean \pm s.e.m. of fold change compared with GM-CSF/IL-4-derived MDDCs, of IL-22BP gene to HPRT expression as determined by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method of relative quantification ($n=4$). (c) MDDCs and AM580-differentiated MDDCs were stained for IL-22BP as described in Figure 6. (d) MDDCs were differentiated in the absence or presence of AM580 added at day 0 (AM-DCs) or day 4 of culture. Cell surface markers were analyzed by flow cytometry. Red histograms, isotype control staining; blue histograms, antibody staining. Data are representative of at least four independent experiments. (e) MDDCs were differentiated in the absence or presence of retinoic acid (RA) and specific inhibitors of RA nuclear receptors added at d0. IL-22BP gene expression was analyzed by RT-qPCR. Bars represent mean \pm s.e.m. of fold change, compared with GM-CSF/IL-4-derived MDDCs, of IL-22BP gene to HPRT expression as determined by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method of relative quantification ($n=4$). (f) MDDCs were differentiated in the presence or not of retinal and/or diethylaminobenzaldehyde (DEAB), a selective inhibitor of RALDH2. IL-22BP gene expression was analyzed by RT-qPCR. Bars represent mean \pm s.e.m. of fold change, compared with GM-CSF/IL-4-derived MDDCs, of IL-22BP gene to HPRT expression as determined by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method of relative quantification ($n=3$). (g) RALDH2 gene expression was analyzed by RT-qPCR in rat CD172⁺ CD4⁺ splenic DCs (spDCs) and CD172^{high} intestinal lymph DCs (iIDCs). Bars represent mean \pm s.e.m. of IL-22BP gene to HPRT expression as determined by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method of relative quantification ($n=3$). * $P < 0.05$. DAPI, 4,6-diamidino-2-phenylindole; raldh2, retinal dehydrogenase 2; RAR α , retinoic acid receptor alpha; RXR, retinoic X receptor.

This likely reflects the effects of RA on blood pre-DCs entering the gut mucosa, which enter a specific differentiation program and consequently display unique functional properties, as confirmed by previous studies. By contrast, IL-22BP expression was inhibited even when the RAR α inhibitor was added at day 5 of the culture (Supplementary Figure S5E), indicating that RA-induced IL-22BP expression required continuous signaling through RAR.

Altogether, these data identify RA as a potent inducer of IL-22BP expression in DCs. This suggests that the higher expression of IL-22BP by rat CD172a⁺ iDCs as compared with CD4⁺ spDCs is due to the ability of the former cells to produce RA. In agreement with this, *aldh1a2* gene expression (encoding for RALDH2) was detected in iDCs and not in spleen cDCs (Figure 8g). Thus, the higher levels of IL-22BP expression of rat intestinal DCs compared with their splenic counterpart are likely to be the consequence of a permanent exposure to RA, explained notably by their ability to produce it.

IL-22BP is downregulated when DCs undergo maturation

IL-22BP expression appears to be a constitutive property of a subset of cDCs at an immature state in SLO and epithelial tissues. We then assessed whether IL-22BP expression was modulated upon DC maturation. Spontaneous maturation, which occurs when DCs are cultured without any stimulators, induced a rapid and dramatic downregulation of IL-22BP expression in rat CD4⁺ spDCs and MLN-DCs (Figure 9a and Supplementary Figure S6). This downregulation persisted for up to 48 h. Stimulation by CpG ODN2006, a ligand for Toll-like receptor 9 (TLR9), did not affect this downregulation of IL-22BP expression (Figure 9a). Similar results were obtained after stimulation of DCs by other TLR ligands (including ligands for TLRs 1–6, 7, and 8) (data not shown).

In human MDDCs and AM-DCs, lipopolysaccharide (LPS) and LPS + IFN γ (interferon- γ)-induced maturation was associated with a dramatic decrease of IL-22BP expression (Figure 9b). Similar results were obtained with ligands of TLR3 (polyinosinic-polycytidylic acid) or TLR5 (flagellin) (data not shown). Altogether, these data indicate that constitutive expression of IL-22BP by DCs at an immature state is lost upon DC maturation. This is concordant with previous studies describing a downregulation of IL-22BP expression in inflammatory conditions, notably in mouse DSS (dextran sodium sulfate)-induced colitis.^{8,19} Interestingly, AM580 could partly restore IL-22BP expression by rat CD4⁺ spDCs after spontaneous maturation (Figure 9c), again supporting a role for RA as a positive regulator of IL-22BP expression. The incomplete restoration of IL-22BP expression in mature DCs probably reflects that RAR α signaling is not sufficient to fully counteract the maturation-induced downregulation of IL-22BP. Similar observations of RA and maturation impacts on IL-22BP expression could be made in mouse bone marrow-derived DCs (Supplementary Figure S7), even if IL-22BP expression levels were low in this model.

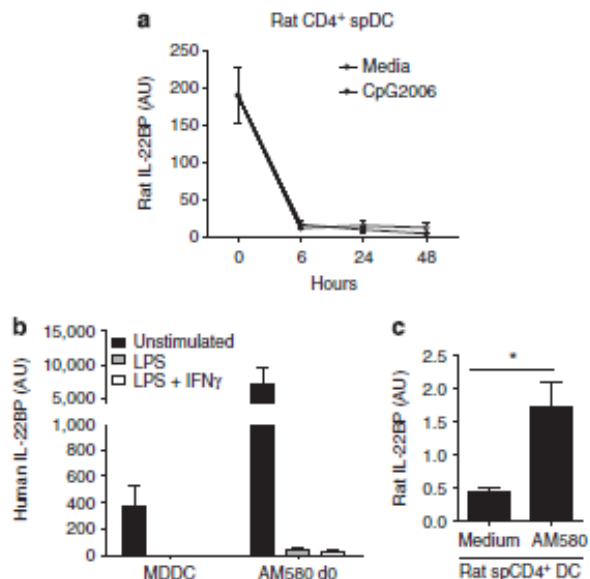


Figure 9 Interleukin-22 binding protein (IL-22BP) is downregulated when dendritic cells (DCs) undergo maturation. (a) Rat spleen CD4⁺ DCs were isolated by cell sorting and cultured for the indicated times in complete medium, in the absence or presence of the Toll-like receptor 9 (TLR9) ligand CpG (cytidine-phosphate-guanosine) ODN2006. IL-22BP gene expression was analyzed by quantitative reverse transcriptase-PCR (RT-qPCR; $n=3$). (b) Lipopolysaccharide (LPS) or LPS + IFN γ (interferon- γ) was added at day 6 on human MDDCs. IL-22BP gene expression was analyzed by RT-qPCR after 24 h ($n=2$). (c) Rat spleen CD4⁺ conventional DCs were isolated by cell sorting and cultured for 24 h in the absence or presence of AM580. IL-22BP gene expression was analyzed by RT-qPCR ($n=3$). Data are presented as mean \pm s.e.m. of ratios of IL-22BP gene to HPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) expression as determined by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method of relative quantification (Rat, a and c; Human, b). AU, arbitrary units; MDDC, monocyte-derived dendritic cell; spDC, splenic DC.

DISCUSSION

Since its first description in 2000, the actions of IL-22 in mediating the cross-talk between the immune and epithelial systems were extensively described. By its ability to reinforce innate immunity of epithelial cells, notably by inducing antimicrobial peptide production, IL-22 has been demonstrated to be crucial in the resolution of *Enterobacteriaceae* gut and lung infections.^{5,6} Combined with the capacity of IL-22 to promote tissue repair in several inflammatory conditions,^{3,7–9} IL-22 properties seem necessary in the maintenance of tissue homeostasis. However, excessive actions of IL-22 may be particularly deleterious for epithelial tissues,^{10–12} suggesting that IL-22 needs to be tightly regulated to prevent unwarranted tissue damage and dysregulated epithelial cell proliferation. This regulation may be partly achieved by IL-22BP, given its specific inhibitory properties on IL-22 actions.^{8,15–17}

Our study strongly suggests that the natural production of IL-22BP, observed in SLO and epithelial tissues, may be principally achieved by a subset of cDCs. These data extend the recent report by Huber *et al.*,³⁵ which showed in mice that IL-22BP-producing cells in colon were mainly MHCII⁺

CD11c⁺ cDCs. IL-22BP production by rat spCD4⁺ cDCs was observed at an immature state, whereas maturation induces a dramatic downregulation of IL-22BP expression. Consistent with previous studies,^{8,19} these results suggest that IL-22BP production is prominent in the steady state, but not in inflammatory conditions, which lead to DC maturation. Nevertheless, IL-22BP upregulation has been observed in several infectious models, particularly in acute polymicrobial peritonitis, and after orally administration of *Toxoplasma gondii*.^{36,37} Interestingly, IL-22 was shown to be detrimental during these processes and led to uncontrolled deleterious inflammation. This suggests that control of IL-22 effects requires a tight regulation of IL-22BP production by cDCs. cDCs may produce high levels of IL-22BP at physiological state, when IL-22 actions are not desired, then, depending on the stimuli, IL-22BP production could be further enhanced or stopped. In our study, we could not induce an upregulation of IL-22BP expression by stimulating spCD4⁺ cDCs with several TLR ligands. In addition, inflammasome activation was recently shown to have an important role in the downregulation of IL-22BP expression in mouse colon during inflammation.³⁵ Moreover, *in vitro* spontaneous maturation of cDCs and MDDCs also downregulated IL-22BP expression. Spontaneous maturation of mouse BMDCs was shown to result from the disruption of E-cadherin-mediated adhesion of DCs within each other, inducing the activation of the β -catenin signaling pathway.³⁸ This process is characterized by a specific transcriptional profile and supposed to favour the generation of tolerogenic DCs *in vivo*. However, during the early phase of maturation, spontaneous and TLRs matured DCs exhibit a similar expression profile. Because IL-22BP is rapidly and equally downregulated in spontaneously and TLR-matured DCs (Figure 9a), it is likely that the *i22ra2* gene belongs to this common program of matured DCs. Consequently, it remains to determine which cells can produce IL-22BP under inflammatory conditions.

The significance of the high levels of IL-22BP in SLO remains elusive. Indeed, only low levels of IL-22R1 expression are found in SLO. Moreover, IL-22 is not likely to act on immune cells in SLO as they do not express IL-22R1 at all² (Figure 2c). One possible explanation could be that the constitutive expression of IL-22BP by resident cDCs, which are highly represented in SLO, reflects ontogeny-related specializations similar to epithelial tissue cDCs. Indeed, high IL-22BP expression in rat CD4⁺ spDCs and CD172a⁺ iLDCs might reflect a specific gene signature of this particular subset, similar to other genes such as SIRP α or DCIR1 for instance. DC subsets are classified on the basis of distinct cell-surface markers and display a specific gene signature explaining some functional specializations.³⁹ Although IL-22R1 is not expressed by normal immune cells, aberrant expression by transformed lymphocytes has been described.⁴⁰ Actions of IL-22 on these cells contributed to the pathogenesis of mantle cell leukemia and anaplastic large cell lymphoma.^{40,41} Therefore, high IL-22BP production in SLO could be necessary to prevent IL-22 actions on tumor cells, thus limiting the installation of these malignancies.

Strikingly, IL-22BP expression was about fivefold higher in the rat intestinal CD172a^{high} iLDCs compared with their splenic counterparts, suggesting that the gut environment is likely to favour IL-22BP production by these cells. We found that RA was a potent inducer of IL-22BP expression *in vitro* in human MDDCs. Moreover, MDDCs can oxidize retinal into RA, due to their expression of RALDH2.³⁴ *De novo* production of RA could further enhance IL-22BP expression by these cells, probably in an autocrine fashion.

Interestingly, in mouse, a subset of intestinal DCs expressing CD103 constitutively expresses RALDH2. This subset mainly resides in the SI-LP and constitutively migrates toward draining LNs.³⁰ Mouse intestinal CD103⁺ DCs derive from a DC precursor continuously seeding the SI-LP from the circulation.⁴² Differentiation of this precursor toward the CD103⁺ DC subset is likely due to environmental factors present in the SI-LP,⁴³ including RA itself.

Our data suggest that, in mouse, the CD103⁺ CD11b⁺ subset of cDCs represent a constitutive source of IL-22BP in the gut. Notably, although Huber *et al.*³⁵ reported much lower expression of IL-22BP in SI vs. colon, we found similar expression in both segments. Our finding that IL-22BP expression was strongly reduced in large intestine from Flt3L^{-/-} mice suggests that Flt3L-dependent cDCs are indeed a major source of IL-22BP in large intestine that is consistent with data from Huber *et al.*³⁵ The apparent normal expression of IL-22BP mRNA we found in SI from Flt3L-deficient mice (Figure 4f) was more surprising and suggests that IL-22BP could be expressed by Flt3L-independent DCs or by other cells than DCs in SI, either constitutively or due to compensation process. These hypotheses need to be tested *in vivo*. Rat CD172a^{high} iLDCs, which express very high levels of IL-22BP, display similar properties to the mouse CD103⁺ DC subset, including CD103 expression, constitutive migration from the intestinal mucosa towards the draining mesenteric LNs, and constitutive expression of RALDH2 (Figure 8g). Therefore, the CD172a^{high} iLDC subset is likely to be the rat counterpart of the mouse CD103⁺ CD11b⁺ DCs. Further study will be required to identify IL-22BP protein-producing cells in the LP as well as in SLO, as we did not succeed in staining tissue with commercially available mAbs. In fact, there is no information in the current literature, including in the recent paper from Huber *et al.*,³⁵ about IL-22BP protein expression *in vivo*.

Maintenance of gut homeostasis is complex and implicates the establishment of equilibrium between the host and the commensal microbiota, while maintaining the ability to fight against invading pathogens. The gut immune system has an important role in this equilibrium and needs to be tightly regulated to avoid unbalanced reactions leading to inflammatory bowel diseases. Interestingly, the CD103⁺ DC subset seems to actively participate in maintenance of the gut homeostasis due to its unique functional properties, conserved between mice and humans.⁴² These properties include the ability of imprinting gut-homing receptors on naive

ARTICLES

lymphocytes, the induction of CD4⁺ naive T cells differentiation into FOXP3⁺ (forkhead box P3) regulatory T cells, and the differentiation of immunoglobulin A-secreting B cells. All these properties result from the ability of these cells to efficiently produce RA from retinal.⁴⁴

Regulation of inflammatory cytokine production is also crucial in the maintenance of gut homeostasis. High IL-22 production by LTi cells was observed in the mouse fetus and before weaning.⁴⁵ This high production of IL-22, concomitant with IL-17, is thought to be necessary to promote a local pro-inflammatory milieu at birth enabling the containment of the colonizing microbiota and the selection of appropriate flora.⁴⁶ After birth, downmodulation of IL-22 production is observed for both LTi and ILC22 cells, following the integration of negative signals from the commensal flora.⁴⁵ Interestingly, intestinal DCs appear to be involved in this regulation by responding to microbiota-induced IL-25 produced by epithelial cells.⁴⁵ IL-25-responding DCs could further moderate IL-22 production by ILCs, in a contact-dependent way. However, whether these DCs corresponded to the CD103⁺ subset was not analyzed in this study. Our results further suggest that CD103⁺ DCs could also regulate IL-22 actions by constitutively producing high levels of its natural soluble inhibitory receptor, reinforcing the importance of DCs in intestinal immune regulation.⁴⁴

Only two studies addressed the role of IL-22BP *in vivo*. In a mouse model of acute DSS colitis, Sugimoto *et al.*⁸ demonstrated that beneficial effects of IL-22 on epithelium regeneration were abolished in the presence of IL-22BP. This study was the first to demonstrate effects of IL-22BP on IL-22 actions described *in vivo*. However, IL-22BP was shown to be down-regulated during the acute phase of colitis, when IL-22 is highly produced. Thus, the model remained artificial as IL-22BP overexpression was induced by a local gene-delivery system. Moreover, neither the cellular source of native IL-22BP nor its protein expression *in vivo* were addressed in this study. A second study was published during the reviewing process of our manuscript by Flavell and colleagues. In this paper, the authors used a model of IL-22BP^{-/-} mice.³⁵ They confirmed the coordinated regulation of IL-22 and IL-22BP during DSS colitis and showed that IL-22BP is crucial in the control of IL-22 proliferative effects on epithelial cells. This control was particularly important to limit the tumorigenesis in a chronic colitis-associated colon cancer model. Importantly, the authors demonstrated that the increased tumorigenesis in IL-22BP^{-/-} mice was directly linked to the lack of IL-22 control, leading to prolonged deleterious actions of the cytokine. Thus, the authors showed, for the first time, the need for a tight regulation exerted by IL-22BP on IL-22 *in vivo*. However, IL-22BP^{-/-} mice did not show any phenotype in the steady state thus questioning the significance of constitutive IL-22BP expression in lymphoid tissues and intestine. Moreover, the authors also suggested in their study that DCs represent the major source of IL-22BP in mouse colon, a finding we confirmed here and further detailed by showing that only a subset of cDCs was expressing IL-22BP.

These data indicate that a tight, timely, and local regulation of IL-22 actions, likely by IL-22BP-expressing DCs, is critical in inflammatory conditions. Nonetheless, IL-22 also has a crucial role in the protection of the host from gut pathogens.⁵⁶ During infection, strong upregulation of IL-22 is observed. IL-23 seems to be the main inducer of IL-22 production, principally by ILCs, which constitutively express IL-23R.⁴⁷ Interestingly, mouse CD103⁺ CD11b⁺ SI-LP DCs were recently shown to mediate rapid IL-22 production by ILC upon TLR5 triggering, through production of IL-23.⁴⁷ CD103⁺ CD11b⁺ DCs also promote the differentiation of Thelper type 17 cells, which are known to produce IL-22,¹⁴ after TLR5 stimulation.⁴⁸ Interestingly, TLR5 expression is a unique feature of these cells and also appears to be RA dependent.⁴⁹ Combined with our data, this strongly suggests that the same subset is also the major source of IL-22BP in the intestine in the steady state, therefore reinforcing the central role of this DC subset in the control of IL-22. Finally, this subset of mouse CD103⁺ DCs was recently proposed to be the source of IL-23 in the thymus after injury. Again, IL-23 induced IL-22 production by ILCs. This IL-22 production was crucial for thymic recovery after injury but not for thymic development.⁵⁰ IL-22BP expression by these cells was not explored but the low levels of IL-22BP expression in the thymus compared with SLO and gut suggest that the supposed IL-22BP production by CD103⁺ thymic DCs would probably be less important.

In conclusion, our study identified a subset of immature cDCs as a constitutive source of IL-22BP in the steady state in SLO and gut. Together with the recent report from Huber *et al.*, these data strongly suggest that DC-produced IL-22BP has an important role in controlling IL-22 effect on epithelial cells. Moreover, our study suggests that the regulation of IL-22 by IL-22BP in the gut could be enhanced by RA. An unsolved crucial point concerns the constitutive secretion of IL-22BP by DCs that has never been demonstrated so far. The lack of an accurate and sensitive enough assay impeded our measurement of IL-22BP levels in culture supernatants. A better understanding of IL-22BP protein production and regulation by DCs and its importance in IL-22 regulation in the gut is necessary to establish the relationship between the observed beneficial and deleterious effects of the cytokine. It will also be important to confirm these data in human. This could be of importance in understanding the role played by IL-22 in inflammatory bowel diseases, which still remains ambiguous today.^{8,9,51}

METHODS

Animals. Sprague Dawley (SPD) rats were obtained from the Centre d'Élevage Janvier (Le Genest-St Isle, France) and were used when 6–10-weeks old. All animal experiments were performed under specific pathogen-free conditions in accordance with the European Union Guidelines. All animal studies were conducted according to the guidelines of the French Agriculture Ministry. The studies were approved by the Veterinary Departmental Services committee (No. E.44011).

Reagents. Cells were cultured in complete RPMI 1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Recombinant human GM-CSF, IL-4, and IL-10 were

from CellGenix (Fribourg-en-Brisgau, Germany), recombinant human TGF- β and IL-13 were from Peprotech (Neuilly-sur-Seine, France), recombinant IFN- γ was from R&D Systems Europe (Lille, France). PGE₂, RA, AM580, retinal, DEAB, and LPS were from Sigma Aldrich (St Louis, MI). CpG ODN2006 was from Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany). Selective RA nuclear receptor inhibitors BMS 195314 (RAR α inhibitor), UVI 3003 (retinoic X receptor inhibitor), and CD 2665 (RAR β / γ inhibitor) were from Tocris bioscience (Lille, France).

Cell sorting. *Rat splenic cells.* Rat conventional and plasmacytoid DCs subsets were isolated as previously described.^{26,52,53} For lymphocytes and monocytes, cells were first separated by Ficoll-Paque Plus (GE HealthCare Life Sciences, Uppsala, Sweden) gradient centrifugation. For lymphocytes, cells were stained with T-cell receptor- $\alpha\beta$ (TCR $\alpha\beta$)-biotin (clone R7.3), CD45R-phycoerythrin (PE; clone HIS24), CD45RA-FITC (fluorescein isothiocyanate; clone OX33), NKR-P1-Alexa647 (clone 3-2-3) mAbs, and then with streptavidin-PE-Cy7. Live TCR $\alpha\beta$ ⁺ (T cells), TCR $\alpha\beta$ ⁻ CD45R⁺ CD45RA⁺ NKR-P1⁻ (B cells), and TCR $\alpha\beta$ ⁻ CD45R⁻ CD45RA⁻ NKR-P1⁺ (NK cells) were FACS-sorted. For monocytes, cells were stained with MHC II-PE (clone OX6), CD172 α -biotin (clone OX41), CD103-Alexa647 (clone OX62), and CD11b/c-Alexa488 (clone OX42) mAbs, and then with streptavidin PE-Cy7. Live CMH-II⁺ CD103⁻ CD172 α ⁺ CD11b/c⁺ (monocytes) were FACS-sorted.

Rat iDCs. Lymph was collected from male animals using previously described methods.^{28,29} Briefly, mesenteric lymphadenectomy was performed on 5–6-week-old animals. At least 5 weeks later, a cannula (3Fr, Harvard Apparatus, Kent, UK) was inserted into the thoracic duct at laparotomy. Lymph was collected for up to 48 h on ice. Red blood cells were lysed from lymph, and the single-cell suspensions were enriched for DCs using magnetic beads specific for CD103 (Miltenyi Biotec, Paris, France) according to the manufacturer's protocol. Enriched cells were stained with antibodies for MHCII (OX-6, BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, France), CD103 (OX-62, in house), CD11b (OX-42, BD Biosciences), and CD172a (OX-41, in house), and the three L-DC subsets were flow sorted using BD FACS Aria Cell sorter. RNA was isolated from sorted cells using Qiagen RNeasy Mini Kit according to the manufacturer's instructions. Complementary DNA (cDNA) was reverse-transcribed from RNA using Superscript First-Strand Synthesis System for reverse transcriptase-PCR (Invitrogen).

Rat MLN cDCs. MLN were harvested from adult SPD rats, dilacerated using 26 G needles and digested for 25 min with Collagenase D, in the presence of DNase I. Cells were collected and low density cells were prepared using a 14.5% Nycodenz gradient. Cells were then stained with anti-TCR $\alpha\beta$ (clone R7/3), anti-CD45R (clone HIS24), anti-CD103 (clone OX62) and anti-CD4 (clone W3/25) and sorted on a FACS Aria into TCR $\alpha\beta$ ⁻ CD45R⁻ CD103⁺ CD4⁺ /int⁻ cDCs. Purity was routinely >95%.

Mouse LP cells. SIs were flushed with HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) 2% fetal calf serum and the Peyer's patches excised. The intestines were opened longitudinally and cut into 0.5-cm segments, which were incubated twice in HBSS with 2 mM EDTA at 37 °C while shaking for 20 min. Supernatants were discarded and the tissue digested with 1 mg ml⁻¹ of collagenase VIII (Sigma-Aldrich) at 37 °C with shaking for 15 min. Cells were passed through a 40- μ m cell strainer and stained for flow cytometry. DCs (Live CD45⁺ MHCII⁺ CD11c⁺ F4/80⁻ CD103⁺ CD11b^{+/+}) and Macrophages (Live CD45⁺ MHCII⁺ F4/80⁺ CD11b⁺) were sorted using a FACSaria I (purity was routinely >95%).

Mouse MLN CD103⁺ cDCs. MLN were digested using liberase (0.4 Wunsch Units ml⁻¹; Roche, Meylan, France) and DNase (50 μ g ml⁻¹; Roche) for 45 min at +37 °C. Single-cell suspensions were stained for flow cytometry with MHCII IA/IE (clone M5/114.15.2) antibody from ebioscience (San Diego, CA) and CD11b (clone M1/70), B220 (clone RA3-6B2), CD103 (clone 2E7), CD11c (clone N418) antibodies from Biologend (London, UK).

Human cell preparation. Human blood was obtained from healthy donors upon informed consent in accordance with our Institutional Review Board. Peripheral blood mononuclear cells were separated by density gradient centrifugation over Ficoll (PAA, Pasching, Austria). CD14⁺ monocytes were isolated by positive selection (Miltenyi Biotec) and differentiated into DCs with 1,000 U ml⁻¹ GM-CSF and 200 U ml⁻¹ IL-4 for 6 days. When indicated, cells were treated with AM580 or RA (100 nM), IL-10 (50 ng ml⁻¹), IL-13 (10 ng ml⁻¹), TGF- β (10 ng ml⁻¹), PGE₂ (10 ng ml⁻¹), retinal (100 nM), DEAB (150 μ M), LPS (1 μ g ml⁻¹), IFN- γ (50 ng ml⁻¹), BMS 195314 (5 μ mol ml⁻¹), UVI 3003 (5 μ mol ml⁻¹), or CD 2665 (5 μ mol ml⁻¹).

Flow cytometry analysis. Human MDDCs were stained with HLA-DR-APC (clone L243 (G46-6)), CD209-PE (clone DCN46), CD1d-PE (clone CD1d42) and CD103-FITC (cloneBer-ACT8), all from BD Biosciences, or isotype-matched control antibodies. Cells were analyzed on a BD FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences). Data were analyzed using Flowjo software (Treestar, Ashland, OR).

Real-time quantitative reverse transcriptase-PCR. Total RNA was isolated using Trizol reagent (Invitrogen) or Qiagen RNeasy Mini Kit according to the manufacturers' instructions. Reverse transcription was performed using Murine Moloney Leukemia Virus Reverse Transcriptase (Invitrogen) or Superscript First-Strand Synthesis System for reverse transcriptase-PCR (Invitrogen), following the manufacturer's instructions. For rat IL-22BP, IL-22RA1, ALDH1A2, mouse IL-22BP, and human ALDH1A2 gene expression, Power Sybr Green 2 \times reagent was used (Applied Biosystems, Foster City, CA). Real-time PCR was performed using the Viia 7 Real Time PCR system (Applied Biosystems). Primers (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany) are summarized in **Supplementary Table S1**. For human IL-22BP gene expression, TaqMan Fast Advanced Master Mix 2 \times reagent was used (Applied Biosystems). Primers and probes were from Applied Biosystems. Real-time PCR was performed using the StepOne Plus system (Applied Biosystems). For both human and rat, relative expression was normalized from HPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) and calculated using the 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} method. For mouse, relative expression was normalized from GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase). Results were expressed in arbitrary units.

Whole IL-22BP cDNA amplification. In order to identify IL-22BP isoforms, whole cDNA amplification was performed in both human and rat samples. Primers used for rat and human IL-22BP are summarized in **Supplementary Table S2**. Amplification was performed using HERCULASE II Fusion Enzyme (Agilent, Santa Clara, CA).

Indirect immunofluorescence. Cells were let to adhere on poly-L-Lysine pre-coated slides for 30 min (Sigma Aldrich). Fixation was performed for 5 min in -20 °C pre-cold acetone. After rehydration, a 30 min step saturation was made with phosphate-buffered saline/bovine serum albumin 1%/serum10%. Primary antibody (anti-IL-22BP from R&D Systems for human MDDCs or anti-rat IL-22BP from Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA for rat cDCs) was incubated at room temperature for 2 h. Secondary antibodies were then incubated for 1 h at room temperature.

Statistical analysis. Data are represented as means \pm s.e.m. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism Software (GraphPad Software, San Diego, CA). Means comparisons were performed using

ARTICLES

the Mann-Whitney *U* test or the Kruskal-Wallis test with Dunn's post test. *P*-values <0.05 were considered statistically significant.

SUPPLEMENTARY MATERIAL is linked to the online version of the paper at <http://www.nature.com/mi>

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Professor JC Renaud (Université Catholique de Louvain, Belgium) for critically reading the manuscript.

DISCLOSURE

The authors declare no conflict of interest.

© 2014 Society for Mucosal Immunology

REFERENCES

1. Sonnenberg, G. F., Fouser, L. A. & Artis, D. Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. *Nat. Immunol.* **12**, 383–390 (2011).
2. Wolk, K. et al. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* **21**, 241–254 (2004).
3. Radaeva, S., Sun, R., Pan, H.-N., Hong, F. & Gao, B. Interleukin 22 (IL-22) plays a protective role in T cell-mediated murine hepatitis: IL-22 is a survival factor for hepatocytes via STAT3 activation. *Hepatology* **39**, 1332–1342 (2004).
4. Aggarwal, S., Xie, M. H., Maruoka, M., Foster, J. & Gurney, A. L. Acinar cells of the pancreas are a target of interleukin-22. *J. Interferon Cytokine Res.* **21**, 1047–1053 (2001).
5. Zheng, Y. et al. Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat. Med.* **14**, 282–289 (2008).
6. Aujla, S. J. et al. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat. Med.* **14**, 275–281 (2008).
7. Simonian, P. L. et al. $\gamma\delta$ T cells protect against lung fibrosis via IL-22. *J. Exp. Med.* **207**, 2239–2253 (2010).
8. Sugimoto, K. et al. IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J. Clin. Invest.* **118**, 534–544 (2008).
9. Zanewicz, L. A. et al. Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease. *Immunity* **29**, 947–957 (2008).
10. Zheng, Y. et al. Interleukin-22, a T β 17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature* **445**, 648–651 (2007).
11. Geboes, L. et al. Proinflammatory role of the Th17 cytokine interleukin-22 in collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice. *Arthritis Rheum.* **60**, 390–395 (2009).
12. Muñoz, M. et al. Interleukin (IL)-23 mediates *Toxoplasma gondii*-induced immunopathology in the gut via matrix metalloproteinase-2 and IL-22 but independent of IL-17. *J. Exp. Med.* **206**, 3047–3059 (2009).
13. Sonnenberg, G. F. et al. Pathological versus protective functions of IL-22 in airway inflammation are regulated by IL-17A. *J. Exp. Med.* **207**, 1293–1305 (2010).
14. Liang, S. C. et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J. Exp. Med.* **203**, 2271–2279 (2006).
15. Dumoutier, L., Lejeune, D., Coliau, D. & Renaud, J. C. Cloning and characterization of IL-22 binding protein, a natural antagonist of IL-10-related T cell-derived inducible factor/IL-22. *J. Immunol.* **166**, 7090–7095 (2001).
16. Kotenko, S. V. et al. Identification, cloning, and characterization of a novel soluble receptor that binds IL-22 and neutralizes its activity. *J. Immunol.* **166**, 7096–7103 (2001).
17. Xu, W. et al. A soluble class II cytokine receptor, IL-22RA2, is a naturally occurring IL-22 antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 9511–9516 (2001).
18. Logsdon, N. J., Jones, B. C., Josephson, K., Cook, J. & Walter, M. R. Comparison of interleukin-22 and interleukin-10 soluble receptor complexes. *J. Interferon Cytokine Res.* **22**, 1099–1112 (2002).
19. Wolk, K. et al. IL-22 induces lipopolysaccharide-binding protein in hepatocytes: a potential systemic role of IL-22 in Crohn's disease. *J. Immunol.* **178**, 5973–5981 (2007).
20. De Moura, P. R. et al. Crystal structure of a soluble decoy receptor IL-22BP bound to interleukin-22. *FEBS Lett.* **583**, 1072–1077 (2009).
21. Banchereau, J. & Stehman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245–252 (1998).
22. Shortman, K. & Naik, S. H. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 19–30 (2007).
23. Villadangos, J. A. & Schnorrer, P. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets *in vivo*. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 543–555 (2007).
24. Weiss, B. et al. Cloning of murine IL-22 receptor alpha 2 and comparison with its human counterpart. *Genes Immun.* **5**, 330–336 (2004).
25. Pinyasongsa, J., Polavarapu, N., Borodovsky, M. & McDonald, J. Exonization of the LTR transposable elements in human genome. *BMC Genomics* **8**, 291 (2007).
26. Trinité, B., Voline, C., Yagita, H. & Josien, R. A subset of cytolytic dendritic cells in rat. *J. Immunol.* **165**, 4202–4208 (2000).
27. Turnbull, E. & MacPherson, G. Immunobiology of dendritic cells in the rat. *Immunol. Rev.* **184**, 58–68 (2001).
28. Milling, S. & MacPherson, G. Isolation of rat intestinal lymph DC. *Methods Mol. Biol.* **595**, 281–297 (2010).
29. Milling, S. W. F., Jenkins, C. & MacPherson, G. Collection of lymph-borne dendritic cells in the rat. *Nat. Protoc.* **1**, 2263–2270 (2006).
30. Milling, S., Yrild, U., Cerovic, V. & MacPherson, G. Subsets of migrating intestinal dendritic cells. *Immunol. Rev.* **234**, 259–267 (2010).
31. Ilev, I. D. et al. Human intestinal epithelial cells promote the differentiation of tolerogenic dendritic cells. *Gut* **58**, 1481–1489 (2009).
32. Szatmari, I. et al. PPAR γ controls CD11d expression by turning on retinoic acid synthesis in developing human dendritic cells. *J. Exp. Med.* **203**, 2351–2362 (2006).
33. Iwata, M. & Yokota, A. Retinoic acid production by intestinal dendritic cells. *Vitam. Horm.* **66**, 127–152 (2011).
34. Stock, A., Booth, S. & Cerundolo, V. Prostaglandin E2 suppresses the differentiation of retinoic acid-producing dendritic cells in mice and humans. *J. Exp. Med.* **208**, 761–773 (2011).
35. Huber, S. et al. IL-22BP is regulated by the inflammasome and modulates tumorigenesis in the intestine. *Nature* **491**, 259–263 (2012).
36. Weber, G. F. et al. Inhibition of interleukin-22 attenuates bacterial load and organ failure during acute polymicrobial sepsis. *Infect. Immun.* **75**, 1690–1697 (2007).
37. Wilson, M. S. et al. Redundant and pathogenic roles for IL-22 in mycobacterial, protozoan, and helminth infections. *J. Immunol.* **184**, 4378–4390 (2010).
38. Jang, A. et al. Disruption of E-cadherin-mediated adhesion induces a functionally distinct pathway of dendritic cell maturation. *Immunity* **27**, 610–624 (2007).
39. Merad, M., Sathe, P., Helit, J., Miller, J. & Morthé, A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu. Rev. Immunol.* **31**, 563–604 (2013).
40. Gelebart, P., Zak, Z., Dien-Bard, J., Anand, M. & Lal, R. Interleukin 22 signaling promotes cell growth in mantle cell lymphoma. *Transl. Oncol.* **4**, 9–19 (2011).
41. Savan, R. et al. A novel role for IL-22R1 as a driver of inflammation. *Blood* **117**, 575–584 (2011).
42. Jaensson, E. et al. Small intestinal CD103⁺ dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans. *J. Exp. Med.* **205**, 2139–2149 (2008).
43. Scott, C. L., Aumeunier, A. M. & Mowat, A. M. Intestinal CD103⁺ dendritic cells: master regulators of tolerance? *Trends Immunol.* **32**, 412–419 (2011).
44. Agace, W. W. & Persson, E. K. How vitamin A metabolizing dendritic cells are generated in the gut mucosa. *Trends Immunol.* **33**, 42–48 (2011).
45. Sawa, S. et al. ROR γ (⁺) innate lymphoid cells regulate intestinal homeostasis by integrating negative signals from the symbiotic microbiota. *Nat. Immunol.* **12**, 320–326 (2011).
46. Eberl, G. Development and evolution of ROR γ (⁺) cells in a microbial world. *Immunol. Rev.* **245**, 177–188 (2012).

47. Kinnebrew, M. A. *et al.* Interleukin 23 production by intestinal CD103(+) CD11b(+) dendritic cells in response to bacterial flagellin enhances mucosal innate immune defense. *Immunity* **36**, 276–287 (2012).
48. Uematsu, S. *et al.* Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat Immunol* **9**, 769–776 (2008).
49. Cho, H.-Y. *et al.* All-trans retinoic acid induces TLR-5 expression and cell differentiation and promotes flagellin-mediated cell functions in human THP-1 cells. *Immunol. Lett.* **136**, 97–107 (2011).
50. Dudakov, J. A. *et al.* Interleukin-22 drives endogenous thymic regeneration in mice. *Science* **336**, 91–95 (2012).
51. Brand, S. *et al.* IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **290**, G827–G838 (2006).
52. Anjubault, T. *et al.* Constitutive expression of TNF-related activation-induced cytokine (TRANCE)/receptor activating NF- κ B ligand (RANK)-L by rat plasmacytoid dendritic cells. *PLoS ONE* **7**, e33713 (2012).
53. Hubert, F.-X., Volshe, C., Louvet, C., Heslan, M. & Josien, R. Rat plasmacytoid dendritic cells are an abundant subset of MHC class II+ CD4+ CD11b- CX62- and type I IFN-producing cells that exhibit selective expression of Toll-like receptors 7 and 9 and strong responsiveness to CpG. *J. Immunol.* **172**, 7485–7494 (2004).

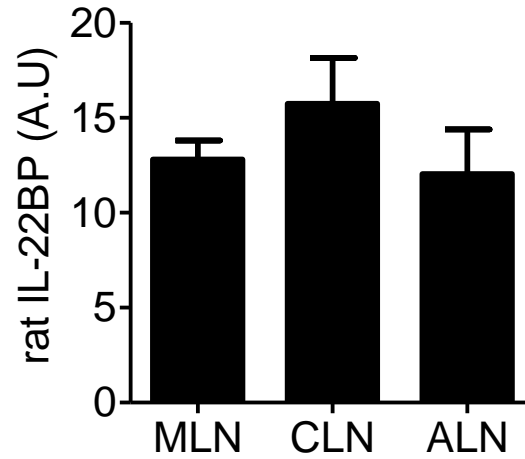
Supplementary Tables

Gene	Forward	Reverse
Rat HPRT	CCTTGGTCAAGCAGTACAGCC	TTCGCTGATGACACAAACATGA
Rat IL-22BP	GGCAAAGGGATCTCTCTGTTCT	TAGGAGAGGCAGTGTAGTTCGC
Rat IL-22R1	GTCCAGCAACTTTGAAAACATCTT	CGGGTCTCCACAGTCAGGTT
Rat ALDH1A2	GGGGTTCAAGATGTCTGGA	GGAGAGTCAGGCTTGCTTCAC
Human ALDH1A2	GAGGAGTTTGTGAGAAGAAGCGT	CTGTGGGCTCAATGAAAAACC
Mouse IL-22BP	TCA GCAGCAAAGACAGAAGAAAC	GTGTCTCCAGCCCAACTCTCA
Mouse GAPDH	CTACAGCAACAGGGTGGTGG	TATGGGGTCTGGGATGG

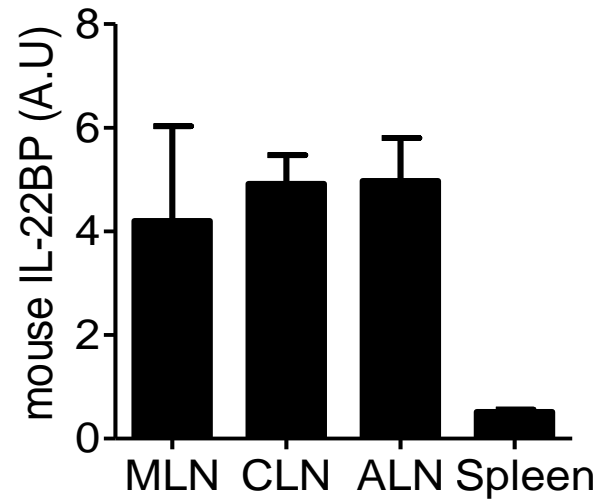
Gene	Forward	Reverse
Rat IL-22BP	ATGCCTAAGCACTGCTTTC	CACACATCTCTCCTTGCTTC
Human IL-22BP	GGCTTCCTCATCAGTTTCTTCC	TTCCACACATCTCTTCACTTCTC

Supplementary Results

Supplementary Figure S1

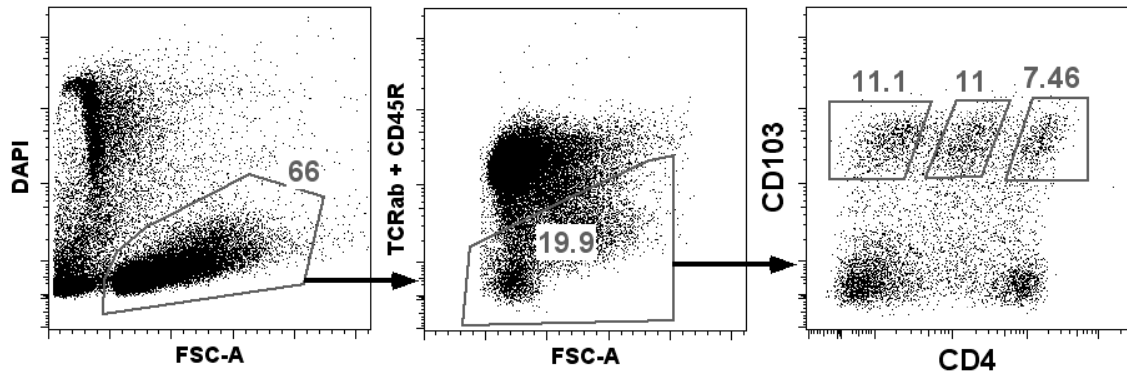


Supplementary Figure S1A: IL-22BP expression in rat lymph nodes. IL-22BP gene expression was analyzed by RT-qPCR. Bars represent mean \pm SEM ratio of IL-22BP gene to HPRT expression as determined by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method of relative quantification (n=3). MLN: Mesenteric Lymph Nodes; CLN: Cervical Lymph Nodes; ALN: Axillary Lymph Nodes.



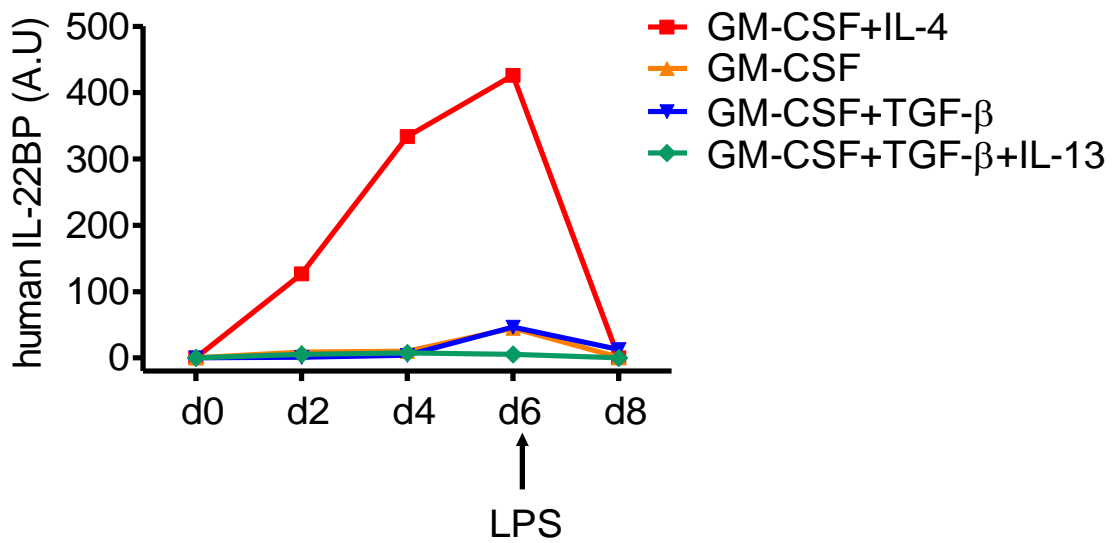
Supplementary Figure S1B: IL-22BP expression in mouse SLOs. IL-22BP gene expression was analyzed by RT-qPCR. Bars represent mean \pm SEM ratio of IL-22BP gene to HPRT expression as determined by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method of relative quantification (n=2). MLN: Mesenteric Lymph Nodes; CLN: Cervical Lymph Nodes; ALN: Axillary Lymph Nodes.

Supplementary Figure S2



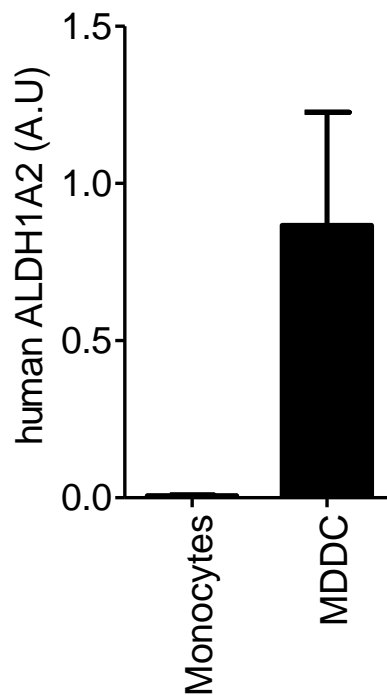
Supplementary Figure S2: Cell sorting of rat MLN cDCs. MLN were harvested from adult SPD rats, dilacerated using 26G needles and digested for 25 min with Collagenase D, in the presence of DNase I. Cells were collected and low density cells were prepared using a 14,5% Nycodenz gradient. Cells were then stained with anti-TCR $\alpha\beta$, anti-CD45R, anti-CD103 and anti-CD4 and sorted on a FACS Aria with the gating strategies illustrated above. Purity was routinely >95%. The figure is representative of 3 independent experiments.

Supplementary Figure S4

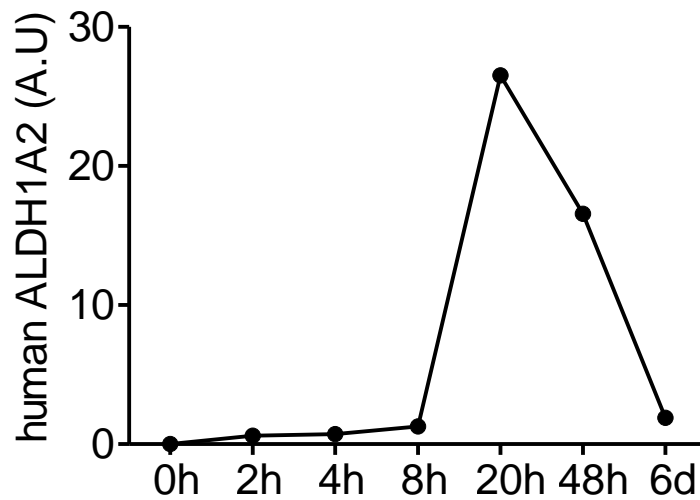


Supplementary Figure S4: Human monocytes from peripheral blood of healthy donors were differentiated into DCs in complete medium with the indicated ligands for 6 days. LPS was added on day 6. Cells were collected at the indicated times during differentiation and IL-22BP gene expression analyzed by RT-qPCR. Each point represents the ratio of IL-22BP gene to HPRT expression as determined by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method of relative quantification. Data are representative of two independent experiments.

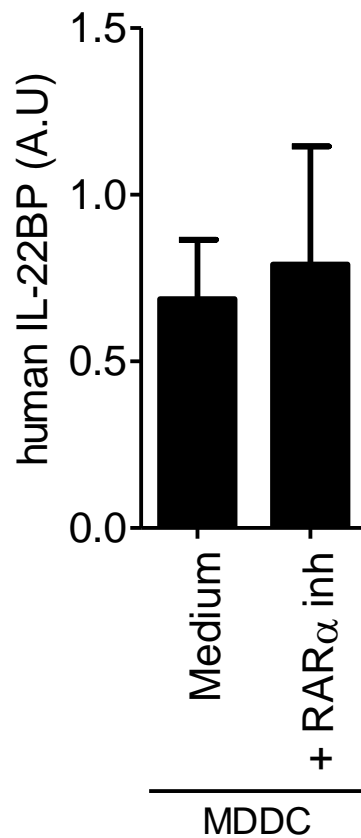
Supplementary Figure S5



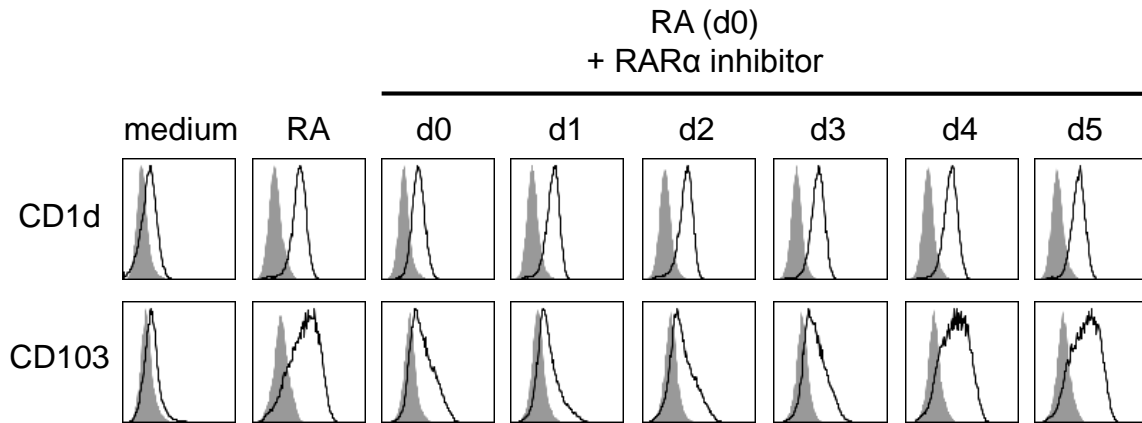
Supplementary Figure S5A: Human MDDC express RALDH2. Human monocytes from peripheral blood of healthy donors were differentiated into DCs in complete medium with GM-CSF and IL-4 for 6 days. RALDH2 gene expression was analyzed by RT-qPCR and normalized relative to HPRT expression. Bars represent mean \pm SEM ratio of RALDH2 gene to HPRT expression as determined by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method of relative quantification (n=3).



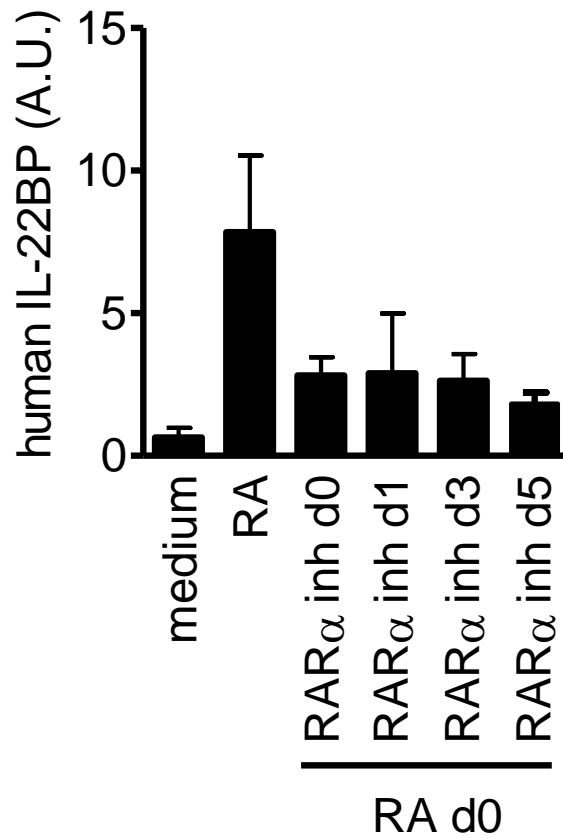
Supplementary Figure S5B: Kinetic of RALDH2 expression during human MDDC differentiation. Human monocytes from peripheral blood of healthy donors were differentiated into DCs in complete medium with GM-CSF and IL-4 for 6. At indicated time points cells were harvested and RALDH2 gene expression was analyzed by RT-qPCR. Each point represents the ratio of RALDH2 gene to HPRT expression as determined by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method of relative quantification. Data are representative of 2 independent experiments.



Supplementary Figure S5C: RA signalling is not required for constitutive expression of IL-22BP by MDDC. Human monocytes from peripheral blood of healthy donors were differentiated into DCs in complete medium with GM-CSF and IL-4 for 6 days, in the presence or not of RAR α inhibitor BMS 195314. IL-22BP gene expression was analyzed by RT-qPCR and normalized relative to HPRT expression. Bars represent mean \pm SEM ratio of IL-22BP gene to HPRT expression as determined by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method of relative quantification (n=4).

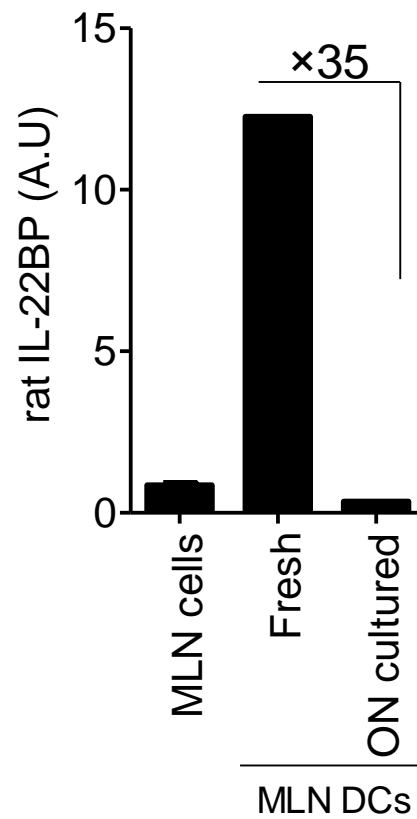


Supplementary Figure S5D: Effects of RAR α inhibitor on MDDC differentiation in the presence of RA. Human monocytes from peripheral blood of healthy donors were differentiated into DCs in complete medium with GM-CSF and IL-4 for 6 days. The RAR α inhibitor BMS 195314 was added in the culture well at the indicated day during differentiation. Cell surface markers were analyzed by flow cytometry. Grey histograms, isotype control staining; empty histograms, antibody staining. Data are representative of 2 independent experiments.



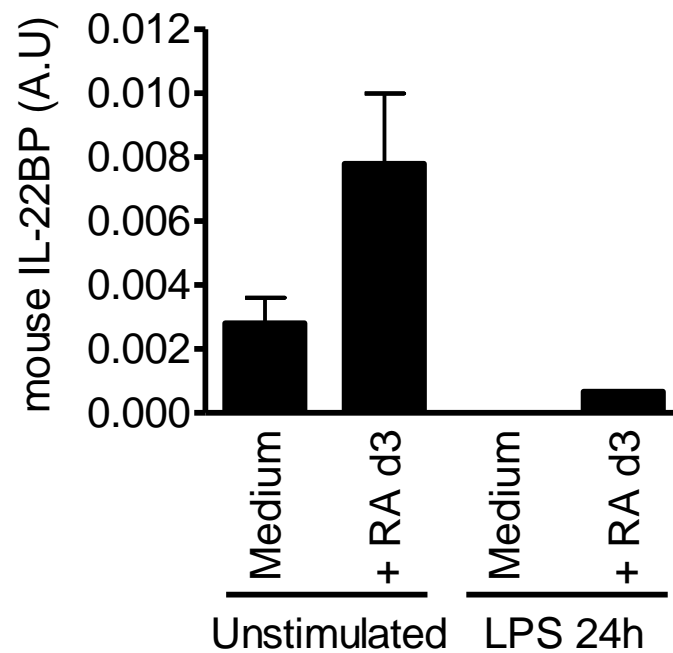
Supplementary Figure S5E: Effects of RAR α inhibitor on IL-22BP expression by MDDC. Human monocytes from peripheral blood of healthy donors were differentiated into DCs in complete medium with GM-CSF and IL-4 for 6 days. When indicated, the RAR α inhibitor BMS 195314 was added in the culture well. IL-22BP gene expression was analyzed by RT-qPCR. Bars represent mean \pm SEM ratio of IL-22BP gene to HPRT expression as determined by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method of relative quantification (n=2).

Supplementary Figure S6



Supplementary Figure S6: IL-22BP expression is lost when rat MLN-DCs undergo spontaneous maturation. Total MLN-DCs were isolated and analyzed for IL-22BP gene expression by RT-qPCR, before and after ON culture in complete culture medium. Bars represent mean \pm SEM ratio of IL-22BP gene to HPRT expression as determined by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method of relative quantification (n=2).

Supplementary Figure S7



Supplementary Figure S7: IL-22BP expression is induced by RA and down-regulated by LPS in mouse BMDC. BMDC were differentiated by GM-CSF from total bone marrow cells cultured in complete medium for 8 days, in the presence or not of RA added at day 3. When indicated, cells were harvested and cultured 24h in complete medium, with or without LPS. BMDC were analyzed for IL-22BP gene expression by RT-qPCR. Bars represent mean \pm SEM ratio of IL-22BP gene to HPRT expression as determined by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method of relative quantification (n=2).

Résultat complémentaire de l'article 1

Dans l'article 1, l'analyse de l'expression d'IL-22BP par les cDCs de la *lamina propria* intestinale de rat n'avait pas été réalisée. Nous avons depuis trié les cDCs du colon de rat et analysé leur niveau d'expression d'IL-22BP en regard du reste des cellules isolées. Les cellules ont ainsi été séparées en cellules CMH-II⁺ CD103⁺, correspondant aux cDCs ; CMH-II⁺ CD103⁻ ; CMH-II⁻. Les cellules épithéliales, récupérées après incubation de la muqueuse colique à 37°C sous agitation rotatoire dans une solution d'EDTA, ont également été analysées. Seules les cDCs présentaient des niveaux d'expression significatifs d'IL-22BP, confirmant les résultats obtenus dans les ganglions mésentériques et la rate (**Figure 12**).

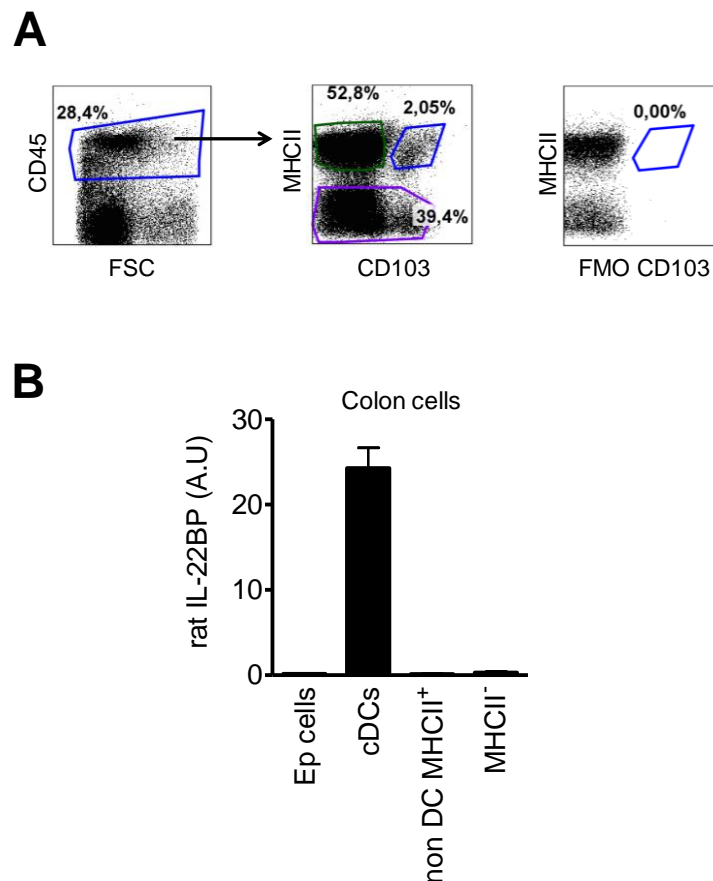


Figure 12: L'IL-22BP est fortement exprimée par les cDCs du colon de rat. (A) Les cellules de la *lamina propria* colique ont été triées en cellules CMH-II⁺ CD103⁺ (cDCs), CMH-II⁺ CD103⁻ (non DC MHCII⁺) et CMH-II⁻ (MHCII⁻). (B) L'expression de l'IL-22BP a été analysée par qPCR et normalisée par rapport à l'HPRT. Les barres représentent la moyenne \pm s.e.m des ratios d'expression de l'IL-22BP par rapport à l'HPRT, déterminés par la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (n=2).

Article 2: “L’interleukine 22 *binding protein* endogène inhibe les actions protectrices de l’interleukine 22 au cours de la colite aigüe ”

Résumé

La maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH), les deux formes de maladies inflammatoires chroniques de l’intestin (MICI) définies cliniquement, sont des pathologies inflammatoires du tractus digestif résultant de réponses immunitaires anormales à l’encontre de la flore digestive commensale. Bien que plusieurs études aient reporté des niveaux de production élevés d’IL-22 dans la muqueuse inflammatoire des patients atteints de MC et de RCH, le rôle physiopathologique de la cytokine dans ces maladies reste encore mal défini. De plus, puisque les actions de l’IL-22 sont contrôlées par son inhibiteur soluble, dénommé IL-22BP, une compréhension plus juste du rôle de l’IL-22 au cours des MICI devrait aussi tenir compte de la régulation de l’IL-22BP. Dans ce travail, nous montrons que, même si, à l’image de ce que nous avons précédemment décrit chez le rongeur, une expression forte de l’ARNm de l’IL-22BP est retrouvée dans les cDCs, les polynucléaires éosinophiles représentent en fait la source la plus abondante d’IL-22BP dans l’intestin humain. Par ailleurs, la production d’IL-22BP par les éosinophiles est augmentée spécifiquement au cours de la MC colique en comparaison de la RCH. Ces données suggèrent donc que la régulation des actions de l’IL-22 pourrait être différente dans ces deux maladies. En accord avec cette hypothèse, l’induction de la production de PAMs, dont l’expression est dépendante de l’IL-22, est nettement plus faible dans la MC que dans la RCH. Finalement, nous montrons à l’aide de rats déficients pour l’IL-22BP que la production endogène de cette dernière gène les actions protectrices de l’IL-22 au cours du modèle de colite induite par le DSS. En conclusion, ce travail fournit de nouvelles perspectives sur le rôle de l’axe IL-22/IL-22R en suggérant qu’il puisse être différent dans la MC et la RCH, du fait de la régulation différente de la production d’IL-22BP. L’inhibition des actions de l’IL-22 par l’IL-22BP produite par les éosinophiles au cours de la MC pourrait favoriser un défaut d’expression de PAMs dans la muqueuse inflammatoire affaiblissant ainsi la barrière épithéliale, et permettant les translocations bactériennes. De plus, ces résultats indiquent que l’IL-22BP pourrait constituer une cible thérapeutique de manière à moduler les actions de l’IL-22 au cours de la MC.

Endogenous IL-22 binding protein suppresses IL-22 beneficial action during acute colitis

Jérôme C. Martin^{1,2,3}, Gaëlle Bériou¹, Michèle Heslan¹, Céline Bossard^{2,4,5}, Anne Jarry⁴, Philippe Hulin⁶, Séverine Ménoret¹, Reynald Thinard¹, Ignacio Anegon¹, Cédric Jacqueline⁷, Ahmed Abidi¹, Bernard Lardeux⁸, Jean-Christophe Renault^{9,10}, Arnaud Bourreille^{8,11}, Régis Josien^{1,2,3}

¹ INSERM UMR1064, ITUN, Nantes, F-44000, France

² Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F-44000, France

³ CHU Nantes, Laboratoire d'Immunologie, Nantes, F-44000, France

⁴ EA4273 Biometadys, Nantes, F-44000, France

⁵ CHU Nantes, Laboratoire d'anatomopathologie, Nantes, F-44000, France

⁶ Plateforme MicroPICell, SFR santé, Nantes, F-44000, France

⁷ EA3826, Nantes, F-44000, France

⁸ Institut des Maladies de l'Appareil Digestif – IMAD, INSERM UMR913, Nantes, F-44000, France

⁹ Ludwig Institute for Cancer Research, B-1200 Brussels, Belgium

¹⁰ Institut de Duve, Université catholique de Louvain, B-1200 Brussels, Belgium

¹¹ Institut des Maladies de l'Appareil Digestif – IMAD, INSERM CIC-04, CHU Nantes, Nantes, F-44000, France

Short title: IL-22BP impairs IL-22 actions during colitis

Corresponding author:

Pr Régis Josien

INSERM UMR1064-ITUN

CHU Nantes Hôtel Dieu

30, Boulevard Jean Monnet

44093 Nantes Cedex 1, France

email : regis.josien@univ-nantes.fr

Tel: +332420087413

Fax: +33240087411

Grant support

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 is also supported by Nantes Métropole and the Pays de la Loire Region. This work was also supported by a grant from CHU Nantes (Appel d'offre interne 2013 # RC14_0042) to JM. JM also received support from CHU de Nantes through "Année Supplémentaire d'Internat". GB was supported by the Région Pays de la Loire through the IMBIO-DC network.

Disclosures

All the authors have nothing to disclose

Author contributions

JM and RJ conceived the project, designed experiments, interpreted the data and wrote the paper; JM, GB, MH and AJ designed and performed experiments, interpreted the data; CB performed histological analyses; PH performed confocal microscopy analyses; SM, RT and IA helped in generating *Il22ra2^{-/-}* rats; CJ and AB performed experiments; BL and AB handle the biobank and selected patients; JCR provided reagents.

Acknowledgments

The authors thank Prof. DL Baeten (Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands) for critically reviewing the manuscript.

Abstract

Background & aims: Interleukin 22-binding protein (IL-22BP, aka *IL22RA2*) is a soluble and powerful inhibitor of IL-22. Whether it plays a role in limiting IL-22 beneficial actions in inflammatory bowel diseases is unclear. **Methods:** We investigated IL-22BP cellular sources in human healthy gut using quantitative polymerase chain reaction (qPCR) on Facs-sorted lamina propria cells and double immunofluorescence (IF) stainings on frozen colon sections. We assessed IL-22BP regulation and cellular sources in Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) using qPCR, immunohistochemistry and IF on paired samples from inflamed and uninfamed colon mucosa. Antimicrobial peptides (AMPs) expression was assessed using qPCR. To assess the role of IL-22BP during colitis, we generated IL-22BP-deficient rats and compared them to wild-type during dextran sulfate sodium (DSS)-induced acute colitis. **Results:** We showed that eosinophils represent the most abundant IL-22BP-producing cells in human healthy gut. IL-22BP protein production by eosinophils was greater in active colonic CD than in UC suggesting a differential regulation of IL-22 actions in these diseases. Accordingly, we observed a lower induction of IL-22-inducible AMPs in CD as compared to UC. Finally, IL-22BP deficient rats were protected against DSS-induced colitis and this protection was associated with increased actions of IL-22 on the gut epithelium and less bacterial translocations. **Conclusion:** This work provides new insights on the cellular sources and the role of IL-22BP at blocking IL-22 in the gut during colitis and suggest that impairment of IL-22 actions in CD by IL-22BP-producing eosinophils may contribute to the defective AMPs induction and thus to epithelial barrier defect and bacterial translocations.

Introduction

Etiology of inflammatory bowel diseases (IBDs) is still not fully understood but it is now widely acknowledged that they result from inappropriate and/or deregulated immune responses to the commensal gut microbiota, in genetically predisposed individuals and under the influence of environmental lifestyle factors¹. Both Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) are characterized by intestinal inflammation and epithelial injury and are mediated by shared and distinct inflammatory pathways involving cytokines¹.

IL-22 is an IL-10 cytokine family member² strongly expressed in both CD and UC³⁻⁶. IL-22 is induced by various environmental and endogenous signals², such as IL-23. Importantly, the identification of IL23R as a susceptibility gene by several genome-wide association studies suggests an important role of this pathway in IBDs⁵. In IBDs, IL-22 is mostly produced by CD4⁺ T lymphocytes⁷ and group 3 innate lymphoid cells (ILC3)⁸. IL-22 binds to a heterodimeric membrane receptor (IL-22R) whose expression is restricted to epithelial cells², making IL-22 an important mediator between immune and epithelial systems. Mouse models showed a crucial role for IL-22 in the restoration of intestinal homeostasis during acute inflammatory colitis^{6,9-13}. IL-22 protective actions include first, a reinforcement of epithelium barrier function through inducing antimicrobial peptides (AMPs) expression in epithelial cells¹², mucus production by goblet cells⁶ and restitution of epithelial tight junctions⁴; second, an enhancement of epithelial wound healing through IL-22-induced survival and proliferation of epithelial cells¹⁰. However, exacerbated or uncontrolled actions of IL-22 also sustain pathological conditions, as illustrated in psoriasis and colorectal cancer². IL-22 is thought to be controlled by a soluble, specific and potent inhibitor called IL-22 binding protein (IL-22BP)^{14,15}.

In a colorectal cancer model, IL-22BP was shown to prevent long-lasting proliferative actions of IL-22 on malignant epithelial cells¹⁶. In rodent gut, the source of IL-22BP appeared to be a

subset of immature dendritic cells (cDCs), namely CD103⁺ CD11b⁺ DCs. In addition, we showed that retinoic acid is a potent inducer of its expression in human DCs¹⁷. However, the cellular source of IL-22BP in human gut mucosa and its expression during IBDs have not been assessed. Given the strength and specificity of the IL-22BP-mediated control on IL-22 actions, addressing these issues is important for understanding the relevance of elevated levels of IL-22 observed in IBDs.

In this study, we show that eosinophils represent the most abundant producers of IL-22BP in the normal human intestinal mucosa. Compared to UC, active CD was associated with higher levels of IL-22BP production by eosinophils and lower IL-22-inducible AMPs. Finally, using IL-22BP-deficient rats, we provide first-time evidence that endogenous IL-22BP hinders the protective actions of IL-22 during experimental DSS-induced acute colitis.

Material and methods

Patients

Paired colonic biopsies of involved and uninvolved mucosal areas were obtained from 14 active CD and 14 active UC patients undergoing endoscopy (**Supplementary Table 1** for clinical data). Healthy controls included colonic mucosal biopsy samples from 16 patients screened for dysplasia or colorectal cancer. Biopsies were part of an existing biobank approved by the French Ministry of Education and Research (agreement number DC-2011-1399). For identification of IL-22BP cellular sources, specimens were obtained from patients undergoing resection for colorectal cancer. Normal ileal or colonic tissue samples were taken 10 cm downstream to the. The tissue fragments were processed according to the French guidelines for research on human tissues. Informed patient consent was obtained according to the French bioethics law. Ethical approval was obtained from the local ethics committee.

Animals

Il22ra2^{-/-} and Il22ra2^{+/+} control littermates rats were generated on the Sprague-Dawley background using zinc-finger nucleases (ZFN) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) at our local Rats Transgenesis Platform facility IBISA-CNRS18. ZFN targeted sequences in the exon 3 of Il22ra2 gene (ACCCATACGAGCCATactatgGGAGGGTGATGATGGCCTG; binding sites are underlined). Pronuclear injections of in vitro-transcribed mRNA-encoding ZFN were performed as previously described¹⁸. Mutations in newborn founders (6 out of 28 founders) were detected by PCR using the following primers: 5'-AGCACGCTGGAAACTGG, forward; 5'-ATAGCATCAAGCCAGAGAGCAT reverse. One of the founders that presented a 36bp deletion of the following sequence: ACTATGGAGGGTGATGATGGCCTGGGCTGGAAGCT and a C insertion instead, leading to a frame-shift and a premature stop-codon by the 5th nucleotide in 5' after the deletion was selected. It was mated with a wild-type partner and heterozygous mutated animals were

obtained. Mating between them allowed generation of homozygous $Il22ra2^{-/-}$ rats. Absence of IL-22BP mRNA expression was confirmed by RT-PCR. All animal experiments were performed in accordance with the European Union Guidelines. All animal studies were conducted according to the guidelines of the French Agriculture Ministry. These studies were approved by the Veterinary Departmental Services committee (# E.44011).

DSS-induced colitis

8-10 weeks old $Il22ra2^{+/+}$ or $Il22ra2^{-/-}$ male rats were given 5.5% dextran sodium sulfate (DSS) (molecular weight: 40,000 g/mol) (TdB consultancy, Uppsala, Sweden) ad libitum in the drinking water for 7 days. DSS was then switched to regular water until sacrifice. Body mass was monitored every day and a loss of 20% from initial weight was a criteria of sacrifice. Clinical scoring¹⁹ was also performed every day. At time of sacrifice, colon lengths were measured and samples were taken for histopathological and RT-qPCR analyses. Colonic sections were stained with hematoxylin and eosin or Alcian blue. Histopathological scoring¹⁹ was performed in a blinded fashion by a trained pathologist.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with GraphPad Prism® Software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Means comparisons of unpaired samples were performed using the Mann & Whitney U-test or the Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test. The Wilcoxon signed-rank test was used for paired samples. P-values <0.05 were considered statistically significant.

For additional methods see **Supplementary Methods**.

Results

Eosinophils are the major producers of IL-22BP in normal human gut

IL-22BP mRNA is constitutively expressed in human gut¹⁴ but its cellular sources have never been clearly defined. We therefore assessed IL-22BP mRNA expression in healthy colonic mucosa cells obtained from patients undergoing colectomy for colon cancer. Colon cells were separated into epithelial cells (EpCAM⁺) and lamina propria (LP) leukocytes which were then FACS-sorted (**Figure 1A**). Monocyte-derived dendritic cells (MoDC) were used as a positive control for IL-22BP mRNA expression^{16,17}. Very low, if any, IL-22BP expression was detected in epithelial cells, lymphocytes, CD11c^{low/neg} cells and neutrophils (**Figure 1B**). In contrast, high levels were found in the cDC+macrophage fraction. We previously showed in rodent that IL-22BP expression was restricted to the CD103⁺ CD11b⁺ subset of cDCs¹⁷ and these findings were recently extended to human gut mononuclear phagocytes by another group²⁰. Unexpectedly, eosinophils also expressed significant levels of IL-22BP mRNA (**Figure 1B**). High purity of sorted cells ruled out possible contaminations by cDCs (**Supplementary Figure 1A**). This was further corroborated by a more detailed phenotypic analysis of eosinophils (**Supplementary Figure 1B**). Of note, no SIGLEC-8 expression was detected in cDCs and macrophages (data not shown). MGG staining of sorted cells also confirmed the typical morphology of eosinophils with bright purplish-red granules and bilobed nuclei²¹ (**Figure 1C**). Both cDCs and eosinophils preferentially expressed isoform 2 of IL-22BP mRNA (**Figure 1D**), that is the only one binding to- and inhibiting IL-22. Of note, some expression of the long isoform 1 was also detected in both populations.

We then characterized IL-22BP protein expression in human gut. We showed for the first time that IL-22BP protein is constitutively expressed in the ileal and colonic mucosa (**Figure 2A**). Specificity of the staining was confirmed by isotype control mAb and pre-incubation of the anti-IL-22BP mAb with recombinant IL-22BP protein (**Supplementary Figure 2**), as well as

by western blot (data not shown). In both the ileum and the colon, IL-22BP⁺ cells are scattered throughout the LP (**Figure 2A**). IL-22BP staining located in the cytoplasm which is also concordant with the secreted nature of this protein. Most of IL-22BP⁺ cells displayed a bi-lobed nucleus, a distinctive feature of eosinophils (**Figure 2B**). The large majority of IL-22BP⁺ cells were indeed CD13⁺ CD11c⁺ CD117⁻ HLA-DR⁻ (**Supplementary Figure 3A-D**) and expressed the major basic protein (MBP) which is specifically localized in secondary granules of eosinophils²¹ (**Figure 2C**). These results were confirmed with a second anti-IL-22BP mAb (**Supplementary Figure 4** and data not shown). Additional stainings showed that IL-22BP⁺ cells were also CD45⁺ CD11b⁺ CD16⁻ CD14⁻ CD3⁻ CD4⁻ CD8⁻ Tryptase⁻ and NKp46⁻ (data no shown). Some rare IL-22BP⁺ HLA-DR⁺ DC-SIGN⁺ (CD209) cells likely corresponding to cDCs were also detected (**Supplementary Figure 3E** and data not shown). Taken together, these results indicate that eosinophils, that represent between 10 to 30% of gut LP leucocytes (**Figure 1A**)²¹ and therefore strongly outnumber cDCs, likely constitute the major source of IL-22BP in both human gut mucosa at steady state.

Strong IL-22BP production by eosinophils in CD as compared to UC

Although IL-22 expression is known to be strongly induced in the inflamed colonic mucosa of both CD and UC patients³⁻⁶, its role in human IBDs is still not well understood. Moreover, expression of IL-22BP, which specifically binds to- and potently inhibits IL-22, has not been assessed. We thus analyzed by RT-qPCR the expression of the IL-22/IL-22R/IL-22BP axis in paired biopsies of colonic CD and UC patients (see **supplementary Table 1** for clinical data) taken from sites with endoscopically inflamed and uninfamed mucosa. We first confirmed a strong expression of IL-22 in the inflamed mucosa of both IBDs whereas almost no detection was observed in the uninvolved mucosa or in controls (**Figure 3A**). Similar levels of IL-22R1 were detected in all samples. Although IL-22BP is known to be downregulated during acute

phase of DSS-induced colitis in mouse^{6,16}, an upregulation of IL-22BP mRNA was detected in the inflamed mucosa of both CD and UC patients as compared to controls (**Figure 3C**), with no significant difference between CD and UC. IHC analyses from the same inflamed areas than those analyzed by RT-qPCR showed a similar increase in numbers of IL-22BP⁺ cells in both CD and UC as compared to controls (**Supplementary Figure 5**). However, staining scores revealed a stronger expression of IL-22BP protein in CD as compared to UC patients. In fact, the staining intensity was similar in CD and in controls but weakened in UC (**Figure 3D & 3E**).

Phenotypic analysis revealed that the large majority of IL-22BP⁺ cells in CD were also MBP⁺ (**Figure 4A**) and therefore eosinophils. Again, only rare IL-22BP⁺ HLA-DR⁺ cells were detected (**Figure 4B**) suggesting that cDCs do not represent an important source of IL-22BP in CD. In UC, although characterization of IL-22BP⁺ cells was made difficult by the low levels of IL-22BP expression, our data also suggested that eosinophils were the major source of IL-22BP (data not shown).

Therefore, despite a similar expression of IL-22BP mRNA in inflamed mucosa of CD and UC patients, eosinophils in CD express higher levels of IL-22BP protein than in UC.

Antimicrobial peptides production is defective in Crohn's disease

We hypothesized that IL-22BP production may hinder IL-22 actions and consequently lead to less pronounced effects in CD as compared to UC (**Figure 3D&E**). We thus analyzed in our patients the expression of known IL-22-inducible AMPs: lipocalin-2 (LCN2)²², human beta-defensin 2 (hBD2)^{4,23} and human beta-defensin 3 (hBD3)²³ (and our unpublished data). Very low to no expression of the genes encoding these peptides was detected in controls as well as in the uninvolved mucosa of both IBDs. In contrast, a strong induction was observed in inflamed mucosa of UC whereas it was moderate and significantly lower in CD (**Figure 5A-**

C). These results suggest that during active disease, the IL-22-dependent AMPs expression, resulting from close interactions between the gut mucosal immune system and the microbiota, could be impaired in CD because of concomitant strong levels of IL-22BP production by eosinophils (**Figure 4A**).

IL-22BP-deficient rats are protected during acute DSS colitis

To explore into more details the impact of IL-22 control by IL-22BP during acute colitis, we generated IL-22BP-deficient (*Il22ra2*^{-/-}) rats. In line with a previous report in mice¹⁶, *Il22ra2*^{-/-} rats were healthy and reproduced normally. Phenotypic analyses did not reveal modifications of major immune cells in the spleen and the gut at steady state (**Supplementary Figure 6A**). Histological analysis of the different gut segments was normal and colon length was similar to *Il22ra2*^{+/+} littermate control animals (**Supplementary Figure 6B&C** and data not shown). The absence of detectable IL-22BP expression was confirmed in colon and MLN (**Supplementary Figure 6D&E**). Because protective actions of IL-22 have been well characterized in experimental DSS-induced acute colitis^{6,9-12}, we studied *Il22ra2*^{-/-} rats in this model (**Supplementary Figure 7A-E**). Kinetics analyses in *Il22ra2*^{+/+} rats confirmed the inverse pattern of IL-22 and IL-22BP expressions described in murine acute DSS colitis^{6,16} (**Figure 6A&B**) but surprisingly, and in contrast to previous mouse studies, strong expression of IL-22BP was still present at time of IL-22 induction. This suggested that IL-22BP could hinder the IL-22 protective actions during acute colonic inflammation, particularly during the early phases of colitis.

Consistent with this hypothesis, *Il22ra2*^{-/-} rats presented a strongly attenuated form of colitis as compared to *Il22ra2*^{+/+} controls. Indeed, whereas *Il22ra2*^{+/+} animals started to lose weight at day 5, *Il22ra2*^{-/-} only presented a small reduction of weight gain rates (**Figure 6C**). In addition, disease activity index (DAI) were similar in both groups during the first 3 days of

colitis, but started to be significantly more severe in *Il22ra2*^{+/+} at day 4, coinciding with the peak of IL-22 expression (**Figure 6A&C**). DAI in both groups peaked at day 7 but *Il22ra2*^{-/-} rats rapidly recovered and were almost completely cured at day 10 (**Figure 6C**). Accordingly, histopathological analyses revealed severe signs of colitis in *Il22ra2*^{+/+} rats at day 10, with important inflammatory infiltrates, large epithelial ulcerations, crypt dysplasia and loss of goblet cells, whereas only mild to no signs were present in *Il22ra2*^{-/-} animals (**Figure 6D&E**). Finally, colons were significantly longer in the *Il22ra2*^{-/-} group (**Figure 6F**). Altogether these results indicate that, despite a similar induction in both groups during the first 3 days, *Il22ra2*^{-/-} rats rapidly control the colitis and present an accelerated recovery phase as compared to *Il22ra2*^{+/+} animals. Slowing down of disease progression in *Il22ra2*^{-/-} rats coincided with strong IL-22 induction at day 4 (**Figure 6A**), whereas for *Il22ra2*^{+/+} it started at day 8, coinciding with the removal of DSS and the down-regulation of IL-22BP expression (**Figure 6B**). This suggested that the lack of inhibitory control by IL-22BP during early phases of the colitis allowed more rapidly efficient protective actions of IL-22, leading to attenuated colitis and faster recovery in IL-22BP deficient rats.

IL-22BP deficiency is associated with a more efficient colonic epithelial barrier function during acute colitis

IL-22 protective actions during acute colitis include increased production of mucus and restoration of goblet cells⁶, enhanced AMPs production¹² and epithelial cells proliferation¹⁰. We hypothesized that protection against colitis in *Il22ra2*^{-/-} rats should be associated with an enhancement of these effects in the colon. mRNA levels of the two IL-22-inducible AMPs LCN2 and beta-defensin 2 (BD2) were indeed significantly higher in *Il22ra2*^{-/-} vs. *Il22ra2*^{+/+} rats during acute colitis (**Figure 7A&B**). More MUC2 expression (**Figure 7C**) and complete restoration of goblet cells and mucus production were also selectively observed in *Il22ra2*^{-/-}

animals (**Figure 7D**). Finally, epithelial cells proliferation was increased in IL-22BP-deficient rats (**Figure 7E**). These properties of IL-22 are important in preventing constitutive bacterial translocations from ileum Peyer's Patches²⁴. Similarly, bacterial containment may also be part of the beneficial role of IL-22 during acute colitis. Concordantly, we found significantly less bacterial growth in the liver of *Il22ra2*^{-/-} rats during DSS-induced colitis (**Figure 7F**), accounting for less bacterial translocations. Taken together, these results indicate that the blockade of IL-22 by IL-22BP is effective during acute colitis and impairs the protective actions of the cytokine on the colonic epithelial barrier.

Discussion

Although several studies have reported elevated levels of IL-22 in the inflammatory mucosa of both active CD and UC patients^{3-6,8}, its significance in IBDs remains quite elusive. Moreover, a complete interpretation of the role of IL-22 in IBDs should also take IL-22BP regulation into account. Here we have identified eosinophils as a major source of IL-22BP in human intestine mucosa both at steady state and in CD, and provided evidence that IL-22BP hinders IL-22 beneficial actions on intestinal epithelial cells during acute colitis.

The finding that eosinophils, which account for 10-30% of total gut LP leucocytes²¹ (**Figure 1A**) and consequently largely outnumber cDCs, represent the most abundant source of IL-22BP in human gut mucosa was unexpected as we and others did not previously identify them as IL-22BP-producers in rodents^{16,17}, although analysis of *Flt3^{-/-}* and *Flt3l^{-/-}* mice suggested that other sources of IL-22BP than cDCs could exist¹⁷. Interspecies differences between rodent and human eosinophils can nevertheless not be ruled out and have already been described²⁵. Because human blood eosinophils do not express IL-22BP mRNA¹⁷, its expression is likely induced by specific factors in the gut environment that remain to be identified. We previously showed that retinoic acid is a potent inducer of IL-22BP expression in cDCs¹⁷. Moreover, retinoic acid probably conditions gut eosinophils²⁶. However, retinoic acid did not induce IL-22BP mRNA in blood eosinophils *in vitro* (data not shown). Beyond their role in anti-helminth defenses, eosinophils are thought to exert important homeostatic functions in the gut²¹. Interestingly, accumulating evidence indicates they participate in the regulation of intestinal barrier function by interacting with different components of the mucosal immune system²¹. A recent report showed that constitutive production of TGF- β by eosinophils was critical for IgA class switching and retinoic acid production by CD103⁺ cDCs²⁷. Our study indicates that eosinophils may also regulate the IL-22-mediated dialogue between mucosal immune effectors and epithelial cells through IL-22BP production.

Our data suggest that IL-22 actions may be differentially regulated in CD as compared to UC owing to IL-22BP production by eosinophils. Indeed, despite a similar induction of IL-22BP mRNA in inflamed mucosa of both CD and UC, likely reflecting the increased numbers of eosinophils (**Supplementary Figure 5**) in both diseases as previously shown²⁸, staining intensity of IL-22BP was much higher in CD (**Figure 3D&E**). This suggested post-transcriptional regulation of IL-22BP expression in UC. Interestingly, among the microRNAs (miRNAs) selectively up-regulated in active UC²⁹⁻³¹, *in silico* analyses predicted that miR-24 could bind to the 3'UTR of IL-22BP mRNA (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk>³² and **Supplementary Table 3**), potentially accounting for impairment in IL-22BP translation during active phases of UC. The same analyses did not predict interactions between miRNAs selectively up-regulated in active CD³¹ and IL-22BP mRNA. Additional studies are thus required to clarify the importance of miRNAs in the control of IL-22BP translation in IBDs.

Independently of the underlying mechanism, the defect in IL-22-inducible β -defensins and lipocalin-2 production in colonic CD but not in UC (**Figure 5**), that we and others observed³³, support the hypothesis that IL-22BP hinders IL-22 actions in CD. It has been shown that a lower *DEFB4* gene copy number in the β -defensin locus predisposed to colonic CD through a diminished ability to produce sufficient amounts of human β -defensin-2³⁴. These results were however challenged by another study which suggested that increased copy numbers of the *DEFB4* gene were predisposing to CD³⁵. Moreover, such associations are not observed for the human β -defensin-3 and 4 which are located on the same locus than human β -defensin-2³³. Finally, we also showed that induction of lipocalin-2, another IL-22-inducible AMP whose encoding gene is located on a different chromosome, was also defective (**Figure 5**). Taken together, these data indicate that the AMPs relative deficiency observed in colonic CD cannot

simply rely on particular gene abnormalities but may also result from a more general defect in specific inducer signals like IL-22.

Most of the knowledge on IL-22 actions during acute colitis comes from mouse studies. With the exception of 2 studies in very specific models which showed a potential role for IL-22 in driving acute colitis^{36,37}, a body of evidence indicates that IL-22 is exerting important protective actions to promote colonic epithelial barrier reinforcement and regeneration, and thus to suppress colitis. First, DSS and transfer models of colitis are always associated with more severe intestinal inflammation and tissue damage in IL-22-deficient mice^{9,10}. Second, blocking IL-22 with neutralizing antibodies in immunocompetent mice delays the recovery phase in the DSS model⁶. Third, administering exogenous IL-22 or enhancing its endogenous production^{11,13} dramatically dampens the severity of colitis, even in the TNBS model in which IL-22 is not supposed to be induced¹¹. In the DSS model, mouse studies mostly suggested that IL-22 was important for the recovery phase of the colitis because of the observed delay following anti-IL-22 blockade and lack of difference during early phase⁶. Protective actions were thus linked to IL-22-dependent epithelium regeneration through the induction of numerous wound healing associated genes and the restoration of goblet cells^{6,10}. Concordant with these studies, we found an accelerated regeneration phase in *Il22ra2*^{-/-} rats, leading to an almost complete recovery at day 10 (**Figure 6C**). This meant that despite its down-regulation, IL-22BP still hindered IL-22 regenerative actions. It is also possible that, as our data suggest in human, post-transcriptional mechanisms regulate IL-22BP protein expression in rodent. In addition, we observed early significant clinical differences between *Il22ra2*^{-/-} and *Il22ra2*^{+/+} rats (**Figure 6C**) associated with higher AMPs production and epithelial proliferation at day 6 of the colitis. Together with the fact that blocking IL-22 had no impact in mice before day 8-10⁶ despite significant IL-22 induction as early as day 4^{6,12}, this suggests that endogenous IL-22BP may also impair early protective actions of IL-22. In

agreement with this, low to no weight loss was reported when excess of IL-22 levels was induced by administering recombinant IL-22 from day 0, probably because of an overcoming of IL-22BP inhibitory actions¹³. The IL-22-dependent induction of AMPs in epithelial cells is important for early host defenses during infectious colitis as it allows bacterial containment apart from the epithelium³⁸. We found here that lack of IL-22BP correlated with enhanced epithelial-specific AMPs expression during acute colitis and less bacterial translocation likely contributing to reduced systemic effects. Finally, our results contrast with a previous study using IL-22BP-deficient mice that did not evidence a role for IL-22BP during acute colitis¹⁶. In their study, Huber et al., concluded that an inverse pattern of regulation was responsible for the lack of IL-22BP effects on IL-22. Here, we show that in a different species, a control of IL-22 by IL-22BP actually occurs during acute colitis. These interspecies differences are further suggested by the fact that Huber et al. did not detect significant constitutive IL-22BP expression in the small intestine in mouse whereas this is the case in rats¹⁷ and in human¹⁴. To conclude, this work provides new insights on the role of the IL-22/IL-22R pathway in colonic CD and UC, suggesting possible different actions owing to IL-22BP regulation. Impairment of IL-22 actions in colonic CD by IL-22BP-producing eosinophils may contribute to the defective AMPs induction and thus to the epithelial barrier defect. Furthermore, it suggests that IL-22 actions could be modulated through targeting IL-22BP. CD is a chronic destructive disease and progressive digestive damage accumulates over acute flares³⁹. Enhancing IL-22 actions through targeting IL-22BP during flares might be helpful to sustain epithelial barrier function and regeneration, thus minimizing tissue injury and slowing-down disease progression. Targeting the natural IL-22 inhibitor would probably constitute a safer approach than IL-22 administration, as previously suggested¹¹, because it would limit unwanted long-lasting effects of IL-22, that may lead to malignant epithelial cell

proliferation¹⁶, or systemic dissemination and adverse effects such as psoriasis-like skin lesions, as already observed in mouse⁴⁰.

Legends to figures:

Figure 1: Analysis of IL-22BP mRNA in isolated human normal colonic mucosa cells

(A) Gating and sorting strategies used to isolate colonic *lamina propria* cell populations. (B) IL-22BP gene expression was analyzed by RT-qPCR. Bars represent the mean \pm SEM ratio of IL-22BP gene to HPRT expression (n=3). (C) MGG staining of sorted eosinophils (D) Analysis IL-22BP mRNA isoforms by RT-PCR. Data are representative of two independent experiments. Ep cells: epithelial cells; DCs: dendritic cells; M Φ : macrophages.

Figure 2: Immunofluorescence analysis of IL-22BP in normal human gut

(A) Sections of normal human ileum (left) and colon (right) were stained with anti-IL-22BP mAb (red) and DAPI (blue). Original magnification x 200. Data are representative of at least four independent experiments on different donors. (B) Higher magnification of IL-22BP⁺ cells in the ileum (upper) and colon (lower). (C) Double-immunofluorescence stainings of human ileum (upper) and colon (lower) with anti-MBP mAb (green), anti-IL-22BP mAb (red) and DAPI (blue). Original magnification x 200. Data are representative of at least three independent experiments on different donors. MBP: major basic protein.

Figure 3: Stronger production of IL-22BP in CD as compared to UC

IL-22 (A), IL-22R1 (B) and IL-22BP (C) gene expressions were analyzed by RT-qPCR in colon biopsies from controls (n=16) and paired biopsies of inflamed (Inf) and uninfamed (He) areas of CD (n=14) and UC (n=14) patients. (D) IL-22BP immunohistochemistry of sections from the same inflamed areas of CD (n=10) and UC (n=11) patients, and from controls (n=5). Representative IL-22BP⁺ cells are designated by black arrows. (E) Signal intensity of IL-22BP stainings was scored on a scale from 0 to 3 in a blinded fashion. Each

symbol represents a single patient. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; n.s: non-significant.
MBP: major basic protein.

Figure 4: IL-22BP is produced by eosinophils in CD

Sections of colonic inflamed areas of CD patients were stained with anti-IL-22BP mAb (red), anti-MBP mAb (green) and DAPI (A) or anti-IL-22BP mAb (red), anti-HLA-DR mAb (green) and DAPI. White arrow designates a HLA-DR⁺ mononucleated myeloid cell displaying low levels of IL-22BP expression (B). Data are representative of 4 independent experiments on different donors.

Figure 5: Antimicrobial peptides production is defective in Crohn's disease

Lipocalin-2 (A), human beta-defensin-2 (B) and human beta-defensin-3 (C) gene expressions were analyzed by RT-qPCR in colon biopsies taken from controls (n=16) as well as from paired biopsies of inflamed (Inf) and uninfamed (He) areas of CD (n=14) and UC (n=14) patients. ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$.

Figure 6: IL-22BP-deficient rats are protected during acute DSS colitis

(A&B) Colitis was induced by 5.5% DSS *ad libitum* in the drinking water and rats were sacrificed at indicated time points for IL-22 (A) and IL-22BP (B) gene expression analysis by RT-qPCR. Bars represent the mean \pm SEM ratio of IL-22 or IL-22BP genes to HPRT expression. Pooled data from two independent experiments (day 0, n=8; days 4, 8, 12 and 20, n=6). (C) Weight and clinical score were assessed every day during colitis. Each symbol represents mean of % weight change or clinical score \pm SEM. Pooled data from 6 independent experiments (*Il22ra2*^{+/+}, n=29; *Il22ra2*^{-/-}, n=23). (D-F) Histology score was assessed at day 10 in a blinded fashion by a trained pathologist (D). Representative HES staining of *Il22ra2*^{+/+}

(left) and *Il22ra2*^{-/-} (right) rats colon at day 10 (**E**). Colon length measured at day 10 (**F**). For E-G, data are representative of at least two independent experiments. Each symbol corresponds to one rat. ** p<0.01; *** p<0.001.

Figure 7: IL-22BP deficiency is associated with a more efficient barrier function of the colon of during acute colitis

(**A-C**) *Il22ra2*^{+/+} and *Il22ra2*^{-/-} were given 5.5% DSS *ad libitum* in the drinking water for 6 days and sacrificed. Lipocalin-2 (**A**), rat beta-defensin-2 (**B**) and *Muc2* (**C**) gene expressions were analyzed by RT-qPCR. Bars represent mean ± SEM of indicated gene expression.. Pooled data from 2 independent experiments (*Il22ra2*^{+/+} n=9; *Il22ra2*^{-/-} n=10). (**D**) Representative Alcian blue staining of *Il22ra2*^{+/+} (left) and *Il22ra2*^{-/-} (right) rats colon at day 10 of colitis. Quantification of goblet cells at day 10. Bars represent mean ± SEM of goblet cells per field from two different fields at a magnification of x100. Pooled data from 2 independent experiments (*Il22ra2*^{+/+} n=8; *Il22ra2*^{-/-} n=8). (**E&F**) *Il22ra2*^{+/+} and *Il22ra2*^{-/-} were treated as in A-C. Representative Ki-67 staining of *Il22ra2*^{+/+} (left) and *Il22ra2*^{-/-} (right) rats colon at day 6 (**E**). Bars represent mean ± SEM of colony forming units (CFU) present in homogenates from the liver at day 6 (**F**). Pooled data from two independent experiments (*Il22ra2*^{+/+} n=9; *Il22ra2*^{-/-} n=9). *** p<0.001; ** p<0.01; * p<0.05; n.s: non-significant.

References

1. Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. Inflammatory bowel disease. *Annu. Rev. Immunol.* 2010;28:573–621.
2. Sabat R, Ouyang W, Wolk K. Therapeutic opportunities of the IL-22-IL-22R1 system. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2013;13:21–38.
3. Andoh A, Zhang Z, Inatomi O, et al. Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts. *Gastroenterology* 2005;129:969–984.
4. Brand S, Beigel F, Olszak T, et al. IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2006;290:G827–838.
5. Schmechel S, Konrad A, Diegelmann J, et al. Linking genetic susceptibility to Crohn's disease with Th17 cell function: IL-22 serum levels are increased in Crohn's disease and correlate with disease activity and IL23R genotype status. *Inflamm. Bowel Dis.* 2008;14:204–212.
6. Sugimoto K, Ogawa A, Mizoguchi E, et al. IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J. Clin. Invest.* 2008;118:534–544.
7. Pariente B, Mocan I, Camus M, et al. Activation of the receptor NKG2D leads to production of Th17 cytokines in CD4⁺ T cells of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2011;141:217–226, 226.e1–2.
8. Geremia A, Arancibia-Cárcamo CV, Fleming MPP, et al. IL-23-responsive innate lymphoid cells are increased in inflammatory bowel disease. *J. Exp. Med.* 2011;208:1127–1133.
9. Zenewicz LA, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, et al. Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease. *Immunity* 2008;29:947–957.
10. Pickert G, Neufert C, Leppkes M, et al. STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *J. Exp. Med.* 2009;206:1465–1472.
11. Monteleone I, Rizzo A, Sarra M, et al. Aryl hydrocarbon receptor-induced signals up-regulate IL-22 production and inhibit inflammation in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 2011;141:237–248, 248.e1.
12. Zindl CL, Lai J-F, Lee YK, et al. IL-22-producing neutrophils contribute to antimicrobial defense and restitution of colonic epithelial integrity during colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013;110:12768–12773.

13. Mielke LA, Jones SA, Raverdeau M, et al. Retinoic acid expression associates with enhanced IL-22 production by $\gamma\delta$ T cells and innate lymphoid cells and attenuation of intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* 2013;210:1117–1124.
14. Xu W, Presnell SR, Parrish-Novak J, et al. A soluble class II cytokine receptor, IL-22RA2, is a naturally occurring IL-22 antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001;98:9511–9516.
15. Logsdon NJ, Jones BC, Josephson K, et al. Comparison of interleukin-22 and interleukin-10 soluble receptor complexes. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* 2002;22:1099–1112.
16. Huber S, Gagliani N, Zenewicz LA, et al. IL-22BP is regulated by the inflammasome and modulates tumorigenesis in the intestine. *Nature* 2012;491:259–263.
17. Martin JCJ, Bériou G, Heslan M, et al. Interleukin-22 binding protein (IL-22BP) is constitutively expressed by a subset of conventional dendritic cells and is strongly induced by retinoic acid. *Mucosal Immunol.* 2014;7:101–113.
18. Geurts AM, Cost GJ, Freyvert Y, et al. Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science* 2009;325:433.
19. Maxwell JR, Brown WA, Smith CL, et al. Methods of inducing inflammatory bowel disease in mice. *Curr. Protoc. Pharmacol. Editor. Board SJ Enna Ed.--Chief AI* 2009;Chapter 5:Unit5.58.
20. Watchmaker PB, Lahl K, Lee M, et al. Comparative transcriptional and functional profiling defines conserved programs of intestinal DC differentiation in humans and mice. *Nat. Immunol.* 2014;15:98–108.
21. Jung Y, Rothenberg ME. Roles and Regulation of Gastrointestinal Eosinophils in Immunity and Disease. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2014;193:999–1005.
22. Behnsen J, Jellbauer S, Wong CP, et al. The cytokine IL-22 promotes pathogen colonization by suppressing related commensal bacteria. *Immunity* 2014;40:262–273.
23. Begue B, Verdier J, Rieux-Laucat F, et al. Defective IL10 signaling defining a subgroup of patients with inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* 2011;106:1544–1555.
24. Sonnenberg GF, Monticelli LA, Alenghat T, et al. Innate Lymphoid Cells Promote Anatomical Containment of Lymphoid-Resident Commensal Bacteria. *Science* 2012. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22674331> [Accessed June 8, 2012].

25. Lee JJ, Jacobsen EA, Ochkur SI, et al. Human versus mouse eosinophils: “that which we call an eosinophil, by any other name would stain as red.” *J. Allergy Clin. Immunol.* 2012;130:572–584.
26. Ueki S, Nishikawa J, Yamauchi Y, et al. Retinoic acids up-regulate functional eosinophil-driving receptor CCR3. *Allergy* 2013;68:953–956.
27. Chu VT, Beller A, Rausch S, et al. Eosinophils promote generation and maintenance of immunoglobulin-A-expressing plasma cells and contribute to gut immune homeostasis. *Immunity* 2014;40:582–593.
28. Hogan SP, Waddell A, Fulkerson PC. Eosinophils in infection and intestinal immunity. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2013;29:7–14.
29. Wu F, Zikusoka M, Trindade A, et al. MicroRNAs are differentially expressed in ulcerative colitis and alter expression of macrophage inflammatory peptide-2 alpha. *Gastroenterology* 2008;135:1624–1635.e24.
30. Zahm AM, Hand NJ, Tsoucas DM, et al. Rectal microRNAs are perturbed in pediatric inflammatory bowel disease of the colon. *J. Crohns Colitis* 2014.
31. Dalal SR, Kwon JH. The Role of MicroRNA in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol. Hepatol.* 2010;6:714–722.
32. Dweep H, Sticht C, Pandey P, et al. miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by “walking” the genes of three genomes. *J. Biomed. Inform.* 2011;44:839–847.
33. Wehkamp J, Koslowski M, Wang G, et al. Barrier dysfunction due to distinct defensin deficiencies in small intestinal and colonic Crohn’s disease. *Mucosal Immunol.* 2008;1 Suppl 1:S67–74.
34. Fellermann K, Stange DE, Schaeffeler E, et al. A chromosome 8 gene-cluster polymorphism with low human beta-defensin 2 gene copy number predisposes to Crohn disease of the colon. *Am. J. Hum. Genet.* 2006;79:439–448.
35. Bentley RW, Pearson J, Gearry RB, et al. Association of higher DEFB4 genomic copy number with Crohn’s disease. *Am. J. Gastroenterol.* 2010;105:354–359.
36. Kamanaka M, Huber S, Zenewicz LA, et al. Memory/effector (CD45RB(lo)) CD4 T cells are controlled directly by IL-10 and cause IL-22-dependent intestinal pathology. *J. Exp. Med.* 2011;208:1027–1040.
37. Eken A, Singh AK, Treuting PM, et al. IL-23R+ innate lymphoid cells induce colitis via interleukin-22-dependent mechanism. *Mucosal Immunol.* 2014;7:143–154.

38. Zheng Y, Valdez PA, Danilenko DM, et al. Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat. Med.* 2008;14:282–289.
39. Pariente B, Cosnes J, Danese S, et al. Development of the Crohn's disease digestive damage score, the Lémann score. *Inflamm. Bowel Dis.* 2011;17:1415–1422.
40. Zelante T, Iannitti RG, Cunha C, et al. Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity* 2013;39:372–385.

FIGURE 1

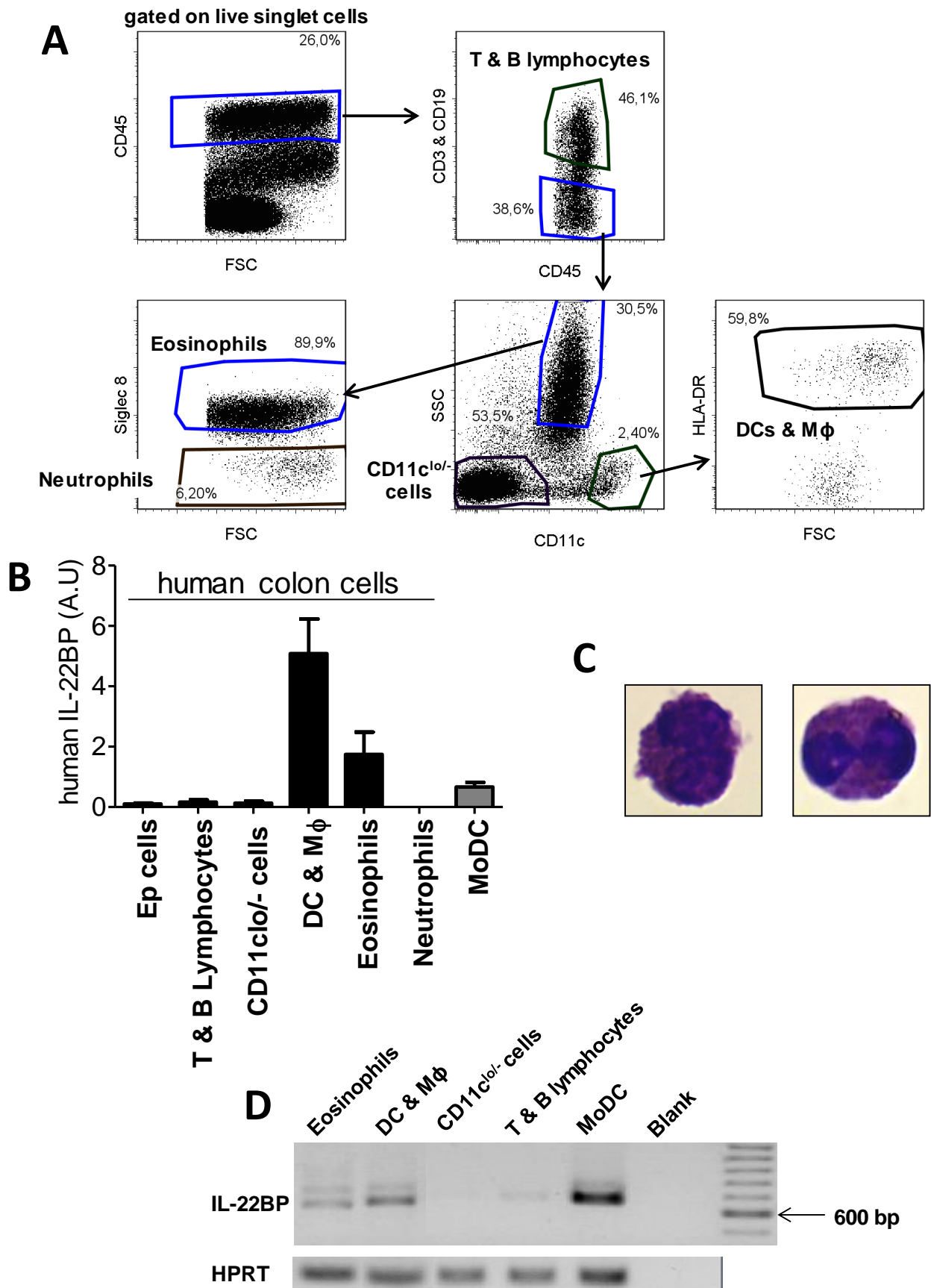
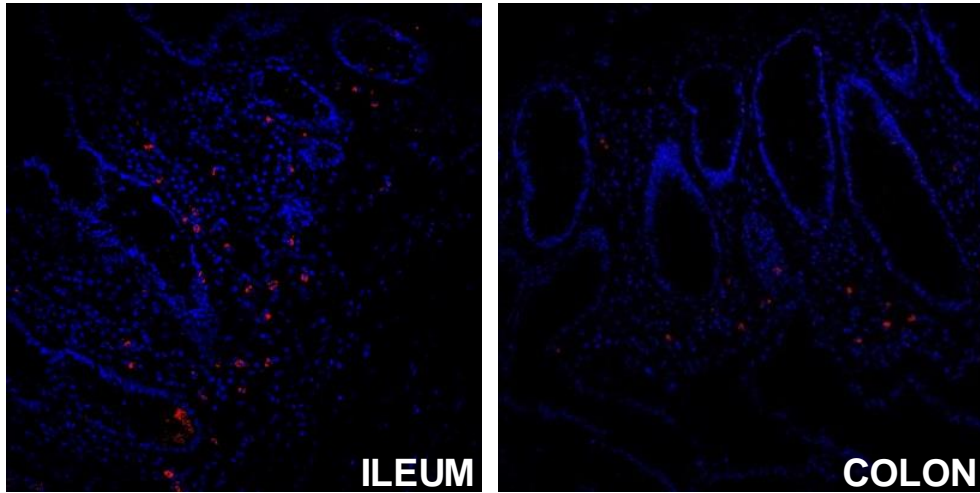


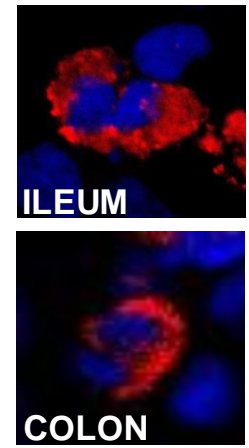
FIGURE 2

A

IL-22BP DAPI



B



C

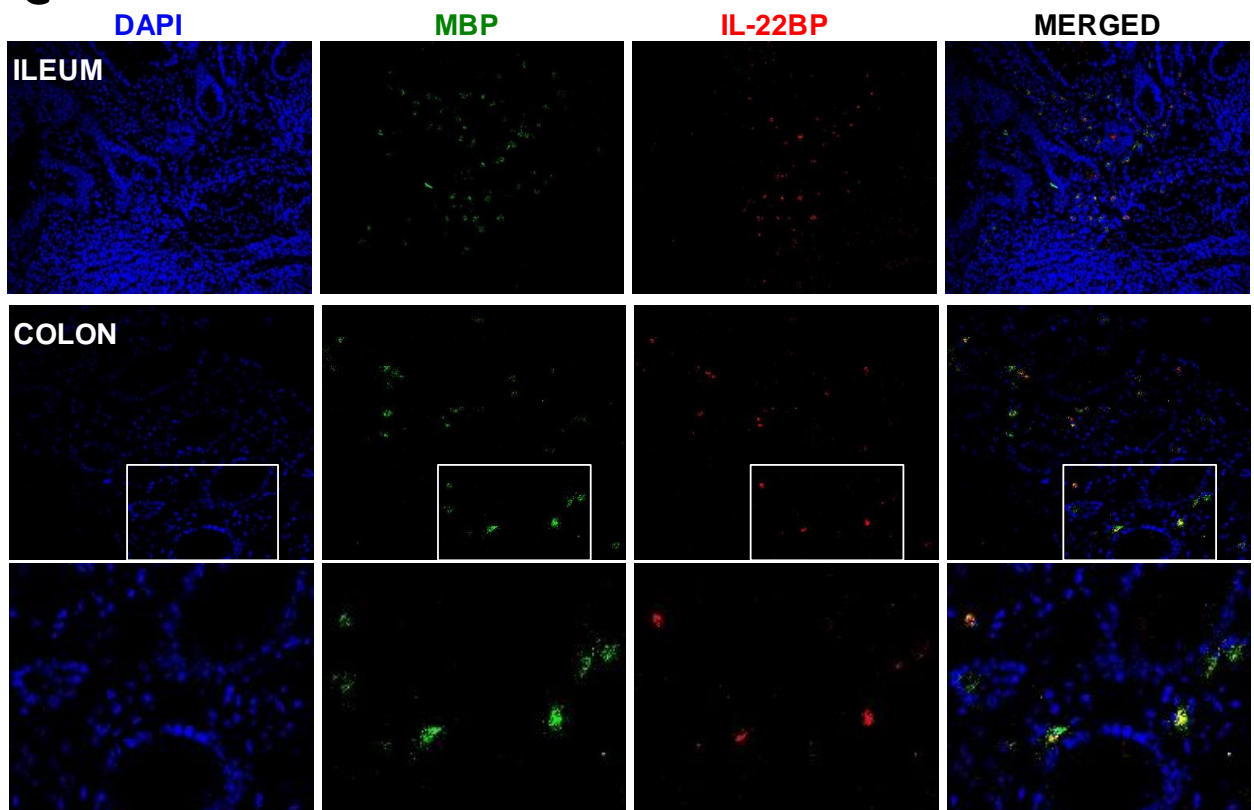


FIGURE 3

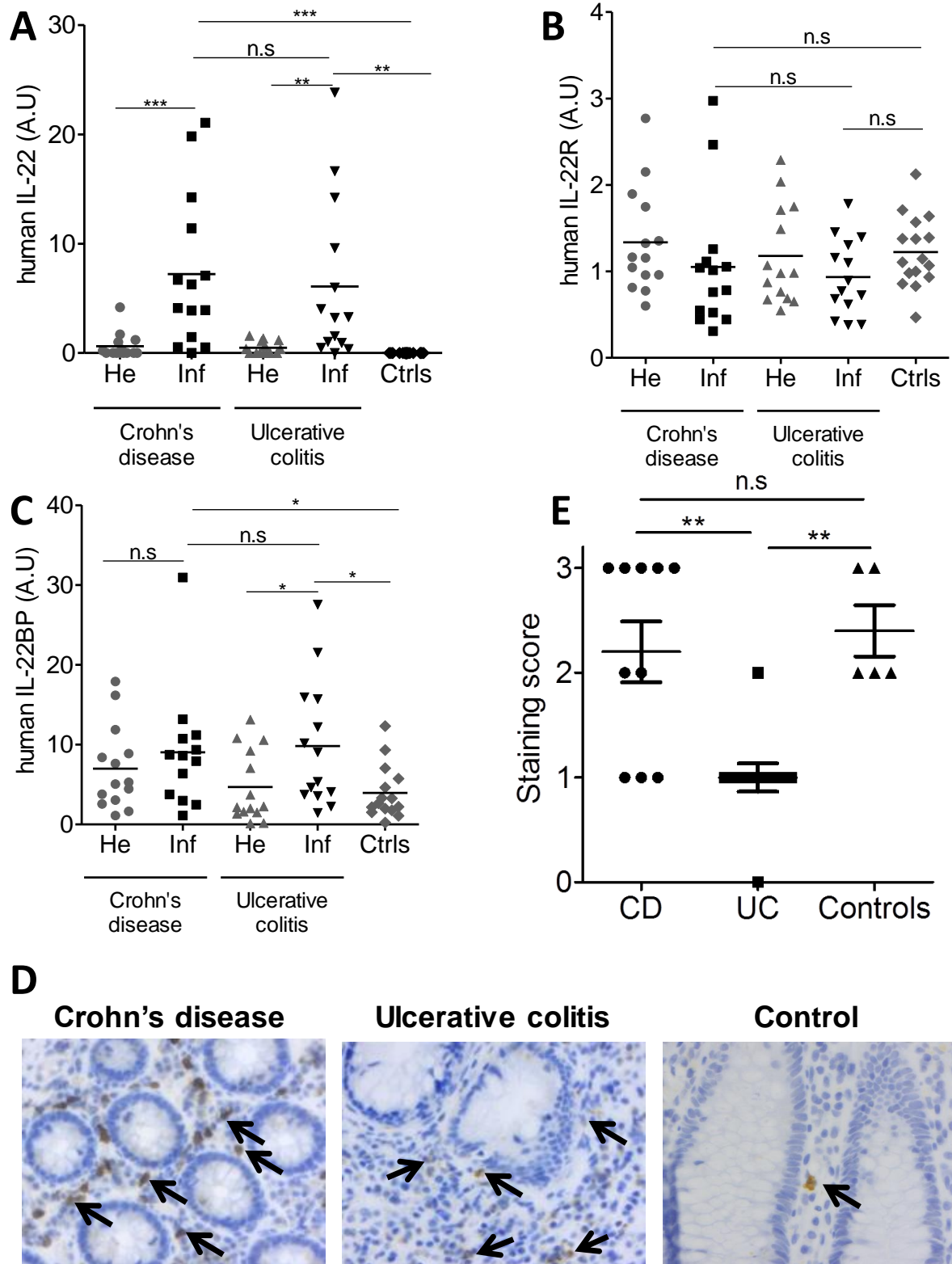


FIGURE 4

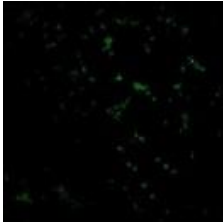
A

Crohn's disease

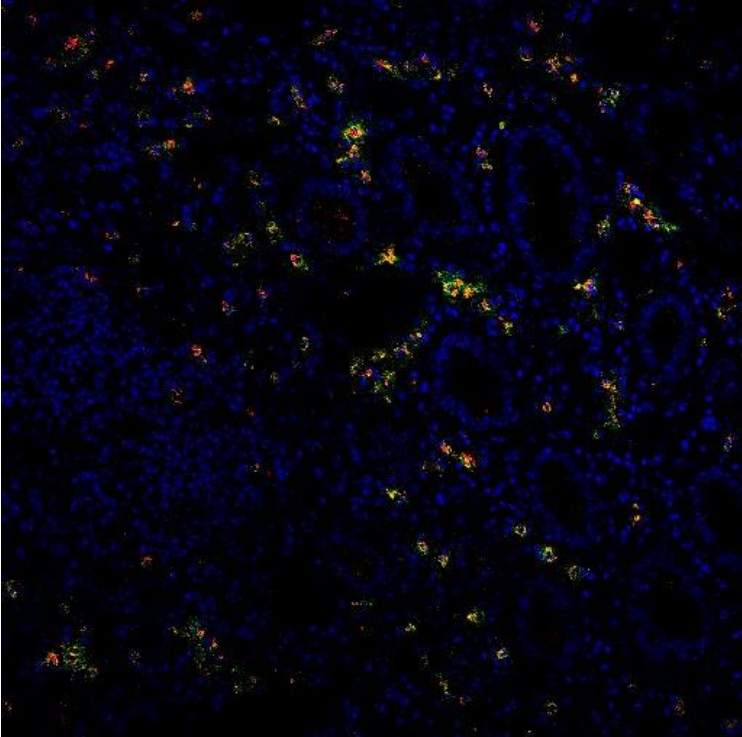
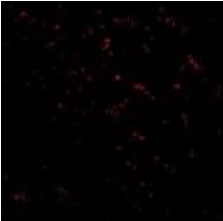
DAPI



MBP

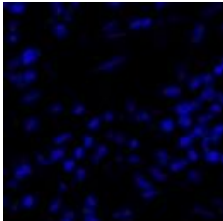


IL-22BP

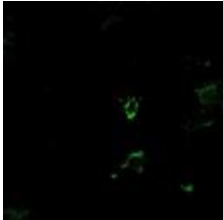


B

DAPI



HLA-DR



IL-22BP

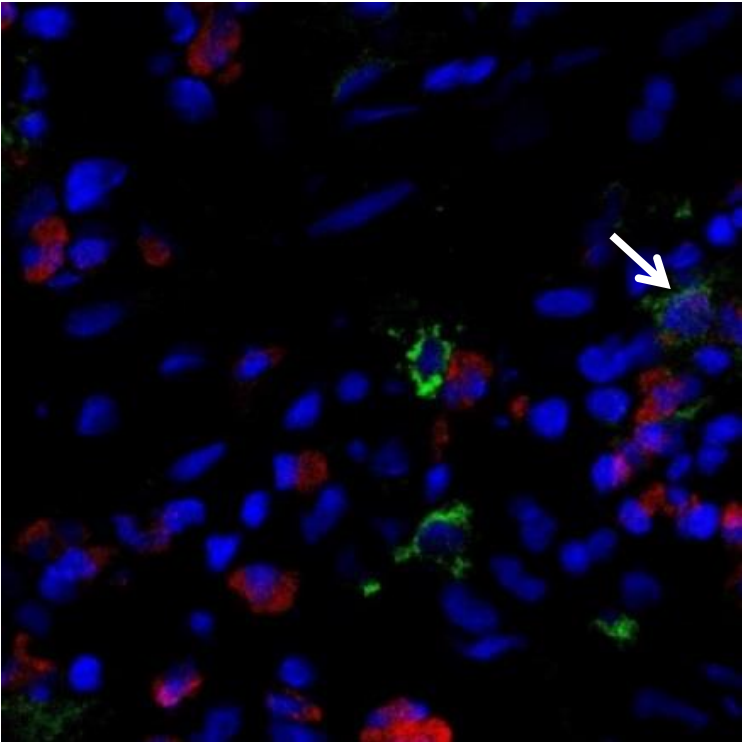
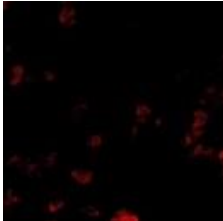


FIGURE 5

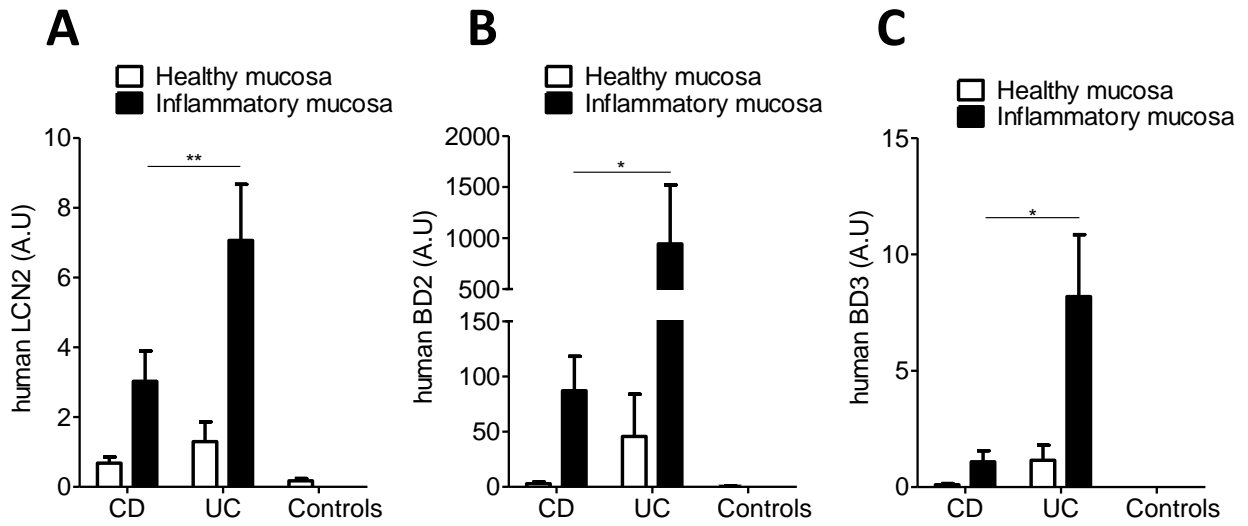


FIGURE 6

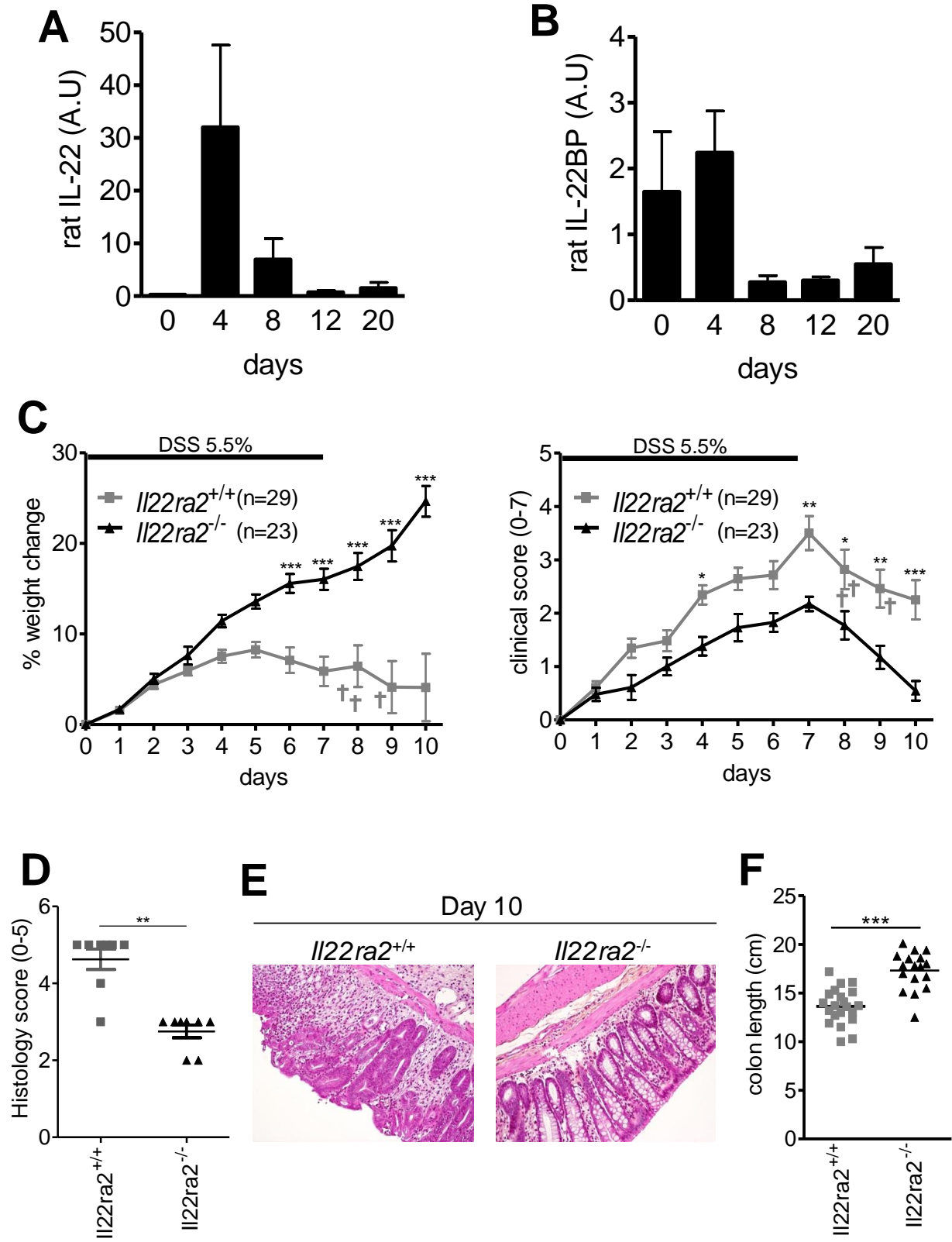
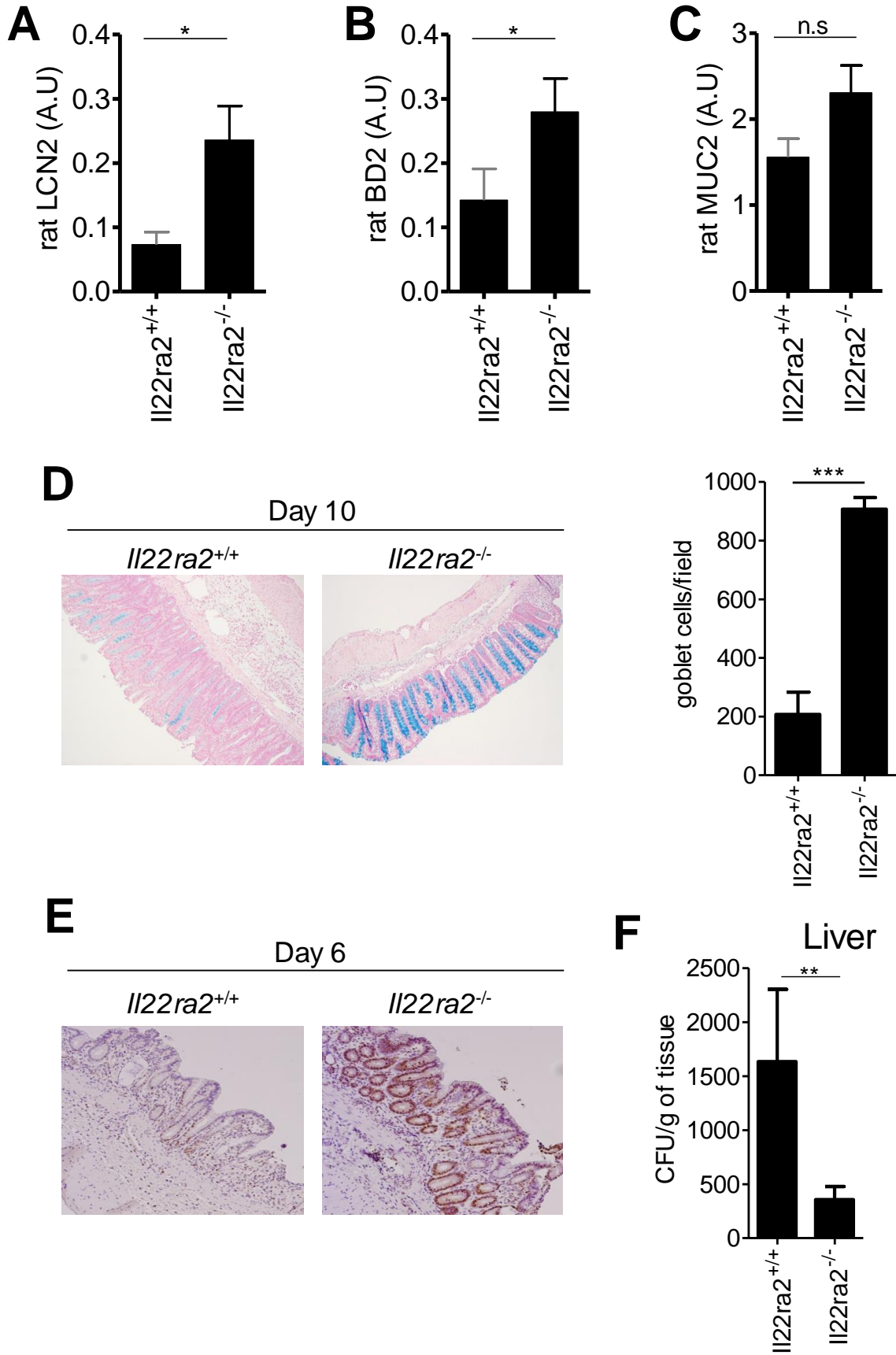


FIGURE 7



Supplementary methods

Measurement of CFU in liver

Livers were sterilely removed at sacrifice and mechanically homogenized in sterile PBS. CFU were determined via serial dilutions on LB agar. Colonies were counted after 2 days of culture at 37°C.

Human colonic lamina propria cells isolation

The mucosa was carefully stripped from the underlying compartment as previously described¹. Epithelial cells were separated by 30min incubation in a Ca²⁺ and Mg²⁺ free solution of EDTA 30mM under slow rotation (100 rpm). Epithelial cells were then filtered through 100-µm pore size cell strainers and transferred into TRIzol[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA) for RT-qPCR analysis. The mucosa was washed in PBS, cut into 5mm pieces and digested 1 h in 10 mL of collagenase D at 2 mg/mL (Roche Diagnostics, Meylan, France) and DNase I at 100 µg/mL (Sigma-Aldrich), under 300 rpm rotation and vortexing every 10 min. Cell suspension was then filtered twice through 100-µm and a 40-µm pore size cell strainers successively (BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, France) and processed for FACS analysis and/or cell sorting.

Flow cytometry analysis

Colon cells were stained as for cell sorting and phenotyping of eosinophils was performed by switching HLA-DR-FITC for one of the following antibodies: CD14 (clone M5E2/FITC), CD16 (clone 3G8/FITC), CD25 (clone M-A251/FITC), CD23 (clone M-L233/FITC), CD123 (clone 7G3/FITC) all from BD Biosciences; CD117 (clone 104D2D1/PC5.5) and CD11b (clone Bear1/FITC) both from Beckman Coulter (Villepinte, France). Cells were analyzed on a BD FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences). Data were analyzed using FlowJo software (Treestar, Ashland, OR).

Cell sorting of colonic lamina propria cells

Human CLP cells were stained with antibodies specific for CD45 (clone HI30/V500), CD3 (clone SK7/PECy7), CD19 (clone SJ25C1 /PECy7), CD11c (clone S-HCL-3 /APC), HLA-DR (clone G46-6/FITC) (BD Biosciences) and SIGLEC-8 (clone 7C9/PE) (BioLegend, San Diego, CA). Dead cells were excluded by gating on 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-negative cells. Cell sorting was performed on a BD FACS Aria Cell sorter (BD Biosciences) using the gating strategies defined in the results section.

Real-time quantitative RT-PCR

Total RNA was isolated using TRIzol[®] reagent (Invitrogen) according to manufacturers' instructions. Reverse transcription was performed using Murine Moloney Leukemia Virus Reverse Transcriptase (Invitrogen) following manufacturer's instructions. Gene expression was assessed with the TaqMan[®] Fast Advanced Master Mix 2× reagent (Applied Biosystems). Primers and probes were purchased from Applied Biosystems (**See supplementary Table 2 for complete list**). Real-time PCR was performed using the StepOne Plus system (Applied Biosystems). For both human and rat, relative expression was normalized to HPRT and calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. Results were expressed in arbitrary units (A.U).

Whole IL-22BP cDNA amplification

In order to identify IL-22BP isoforms, whole cDNA amplification was performed (forward, 5'-GGCTTCCTCATCAGTTTCTTCC; reverse 5'TTCCACACATCTCTTCACTTCTC for human IL-22BP). Amplification was performed using HERCULASE II Fusion Enzyme (Agilent, Santa Clara, CA).

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed on 5µm formalin-fixed, paraffin-embedded sections using an indirect immunoperoxidase method. For rat colonic samples sections, were stained with a rabbit anti-Ki-67 pAb (Merck-Millipore, Darmstadt, Germany). For human colonic

biopsies, sections were stained with a mouse IgG1 monoclonal anti-IL-22BP antibody (clone 214518; R&D Systems Europe, Lille, France). The immunological reaction was visualized with the Envision detection system (Dako, Les Ulis, France) and 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride as a chromogen. Slides were counterstained with Mayer's Hematoxylin solution. Signal intensity was scored on a scale from 0 to 3 in a blinded fashion by a trained pathologist.

Immunofluorescent stainings

Formalin-fixed frozen sections were saturated 30 min with a solution of PBS/BSA1%/Serum10%. For single staining, mouse monoclonal IgG1 anti-IL-22BP (clone 214518, R&D or clone AH22BP9.1, home-made) labelled with the Alexa Fluor® 568 Antibody Labeling Kit following manufacturer's instruction (Invitrogen) was incubated 2 hours at RT. After washing, DAPI was incubated 15 min. Slides were mounted with ProLong® Gold antifade (Invitrogen). For double immunostainings, a second purified antibody was mixed with the anti-IL-22BP antibody except for mouse antibodies of the same isotype which were incubated before the anti-IL-22BP mAb and revealed before a second step of saturation with mouse serum 10%. Purified antibody was revealed with adapted secondary antibodies labelled with Alexa488. Images were obtained with A1 R Si Confocal microscope (Nikon).

Supplementary references

1. Jarry A, Bossard C, Bou-Hanna C, et al. Mucosal IL-10 and TGF-beta play crucial roles in preventing LPS-driven, IFN-gamma-mediated epithelial damage in human colon explants. *J. Clin. Invest.* 2008;118:1132–1142.

Supplementary Table 1: Clinical data

	CD (n=14)	UC (n=14)	Controls (n=16)
Age (years)*	31.7 ± 9.8	42.6 ± 11.1	45.8 ± 13.3
Sex (M/F)	5/9	10/4	7/9
Disease duration before biopsy (years)*	9.0 ± 7.0	7.6 ± 4.9	NA
Involvement			
<i>Ileum + colon</i>	9	-	NA
<i>Colon</i>	5	13	
<i>Rectum</i>	-	1	
Ongoing medications			
<i>Corticosteroids</i>	1	2	
<i>5-aminosalicylic acid (5-ASA)</i>	4	10	NA
<i>Immunosuppressants</i>	6	3	
<i>Anti-TNFα</i>	7	6	

* mean ± s.d

Supplementary Table 2: List of primers and probes used in the study

Target	Gene	Species	Reference	Furnisher
IL-22BP	<i>IL22RA2</i>	Human	Hs00364814_m1	Applied Biosystems
IL-22	<i>IL22</i>	Human	Hs01574154_m1	Applied Biosystems
IL-22R1	<i>IL22RA1</i>	Human	Hs00222035_m1	Applied Biosystems
LCN2	<i>LCN2</i>	Human	Hs01008571_m1	Applied Biosystems
hBD2	<i>DEFB4A</i> <i>DEFB4B</i>	Human	Hs00175474_m1	Applied Biosystems
hBD3	<i>DEF103A</i> <i>DEF103B</i>	Human	Hs00218678_m1	Applied Biosystems
IL-18	<i>IL18</i>	Human	Hs01038788_m1	Applied Biosystems
HPRT	<i>HPRT1</i>	Human	Hs99999909_m1	Applied Biosystems
IL-22BP	<i>Il22ra2</i>	Rat	Rn01766097_m1	Applied Biosystems
IL-22	<i>Il22</i>	Rat	Rn01760432_m1	Applied Biosystems
LCN2	<i>Lcn2</i>	Rat	Rn00590612_m1	Applied Biosystems
BD2	<i>Defb2</i>	Rat	Rn02532184_g1	Applied Biosystems
MUC2	<i>Muc2</i>	Rat	Rn01498196_g1	Applied Biosystems
HPRT	<i>Hprt1</i>	Rat	Rn01527840_m1	Applied Biosystems

Supplementary Table 3: Comparative view of positively predicted miRNA sites on 3' UTR region by 4 prediction programs (from <http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk>)

Gene Name	MicroRNA	StemLoop ID	DIANAmT	miRanda	miRWalk	Targetscan	SUM
IL22RA2	hsa-miR-453	hsa-mir-453	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-769-3p	hsa-mir-769	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-548b-5p	hsa-mir-548b	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-24	hsa-mir-24-1	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-219-2-3p	hsa-mir-219-2	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-617	hsa-mir-617	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-181d	hsa-mir-181d	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-920	hsa-mir-920	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-340	hsa-mir-340	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-548d-3p	hsa-mir-548d-2	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-205	hsa-mir-205	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-510	hsa-mir-510	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-24	hsa-mir-24-2	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-186	hsa-mir-186	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-588	hsa-mir-588	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-622	hsa-mir-622	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-498	hsa-mir-498	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-936	hsa-mir-936	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-330-3p	hsa-mir-330	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-449b	hsa-mir-449b	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-212	hsa-mir-212	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-132	hsa-mir-132	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-376a	hsa-mir-376a-2	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-410	hsa-mir-410	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-300	hsa-mir-300	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-190	hsa-mir-190	1	1	1	1	4

IL22RA2	hsa-miR-548a-3p	hsa-mir-548a-2	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-34c-5p	hsa-mir-34c	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-625	hsa-mir-625	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-525-3p	hsa-mir-525	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-940	hsa-mir-940	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-337-3p	hsa-mir-337	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-411	hsa-mir-411	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-181a	hsa-mir-181a-1	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-137	hsa-mir-137	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-557	hsa-mir-557	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-376b	hsa-mir-376b	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-892a	hsa-mir-892a	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-194	hsa-mir-194-1	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-590-3p	hsa-mir-590	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-34a	hsa-mir-34a	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-524-3p	hsa-mir-524	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-942	hsa-mir-942	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-659	hsa-mir-659	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-218	hsa-mir-218-1	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-559	hsa-mir-559	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-484	hsa-mir-484	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-450b-5p	hsa-mir-450b	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-206	hsa-mir-206	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-636	hsa-mir-636	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-181a	hsa-mir-181a-2	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-944	hsa-mir-944	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-338-5p	hsa-mir-338	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-542-3p	hsa-mir-542	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-218	hsa-mir-218-2	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-142-5p	hsa-mir-142	1	1	1	1	4

IL22RA2	hsa-miR-562	hsa-mir-562	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-450b-3p	hsa-mir-450b	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-593	hsa-mir-593	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-641	hsa-mir-641	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-181b	hsa-mir-181b-1	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-668	hsa-mir-668	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-224	hsa-mir-224	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-143	hsa-mir-143	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-1	hsa-mir-1-1	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-548a-5p	hsa-mir-548a-3	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-181c	hsa-mir-181c	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-516a-3p	hsa-mir-516a-1	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-196b	hsa-mir-196b	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-493	hsa-mir-493	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-889	hsa-mir-889	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-155	hsa-mir-155	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-548a-3p	hsa-mir-548a-3	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-649	hsa-mir-649	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-516a-3p	hsa-mir-516a-2	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-423-5p	hsa-mir-423	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-1	hsa-mir-1-2	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-153	hsa-mir-153-1	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-580	hsa-mir-580	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-494	hsa-mir-494	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-181b	hsa-mir-181b-2	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-607	hsa-mir-607	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-369-3p	hsa-mir-369	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-548d-5p	hsa-mir-548d-1	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-196a	hsa-mir-196a-2	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-153	hsa-mir-153-2	1	1	1	1	4

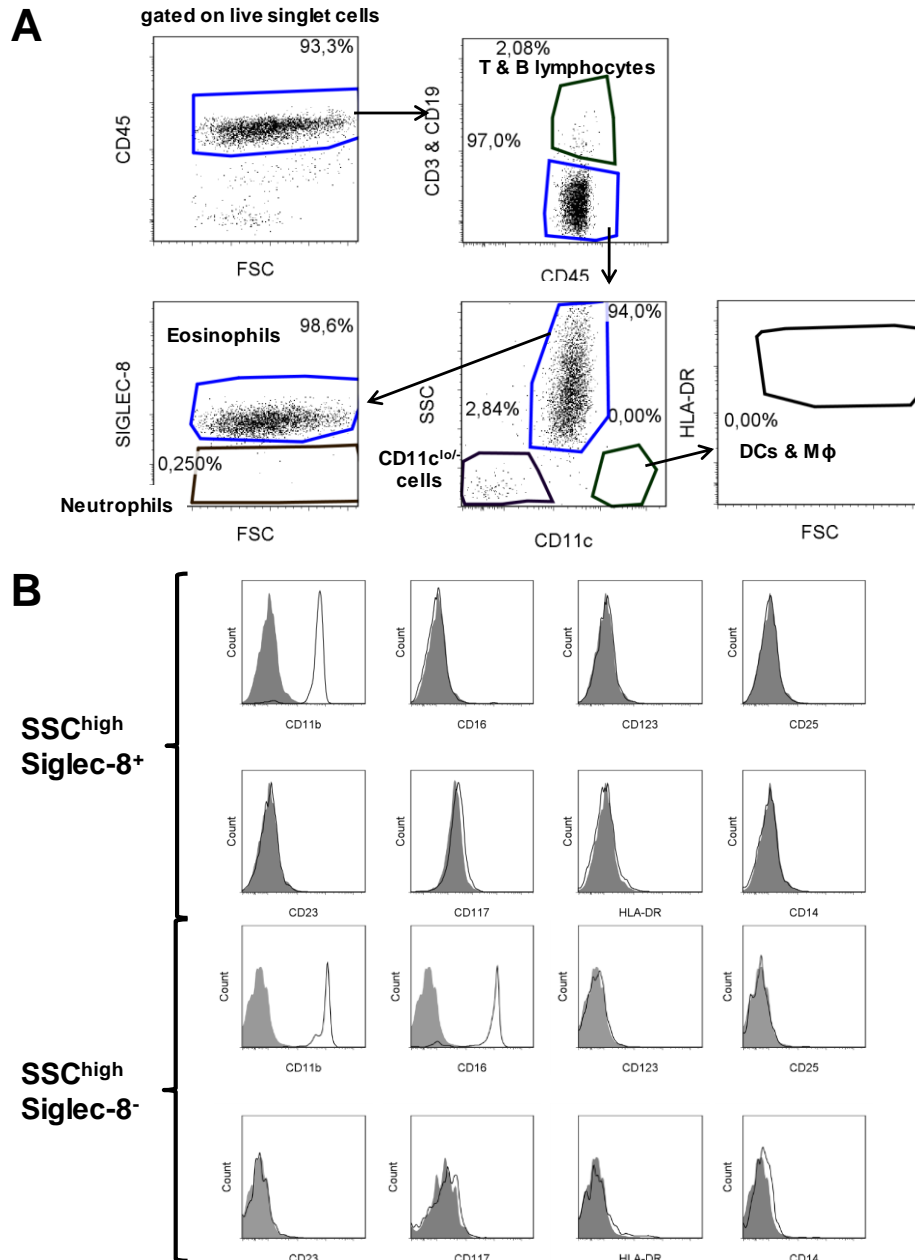
IL22RA2	hsa-miR-548a-3p	hsa-mir-548a-1	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-613	hsa-mir-613	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-196a	hsa-mir-196a-1	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-495	hsa-mir-495	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-190b	hsa-mir-190b	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-194	hsa-mir-194-2	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-376a	hsa-mir-376a-1	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-548d-3p	hsa-mir-548d-1	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-199a-3p	hsa-mir-199a-2	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-449a	hsa-mir-449a	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-587	hsa-mir-587	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-548c-5p	hsa-mir-548c	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-199a-3p	hsa-mir-199a-1	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-496	hsa-mir-496	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-381	hsa-mir-381	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-548d-5p	hsa-mir-548d-2	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-199b-3p	hsa-mir-199b	1	1	1	1	4
IL22RA2	hsa-miR-507	hsa-mir-507	1	1	1	1	4

Supplementary Table 2: List of primers and probes used in the study

Target	Gene	Species	Reference	Furnisher
IL-22BP	<i>IL22RA2</i>	Human	Hs00364814_m1	Applied Biosystems
IL-22	<i>IL22</i>	Human	Hs01574154_m1	Applied Biosystems
IL-22R1	<i>IL22RA1</i>	Human	Hs00222035_m1	Applied Biosystems
LCN2	<i>LCN2</i>	Human	Hs01008571_m1	Applied Biosystems
hBD2	<i>DEFB4A</i> <i>DEFB4B</i>	Human	Hs00175474_m1	Applied Biosystems
hBD3	<i>DEF103A</i> <i>DEF103B</i>	Human	Hs00218678_m1	Applied Biosystems
IL-18	<i>IL18</i>	Human	Hs01038788_m1	Applied Biosystems
HPRT	<i>HPRT1</i>	Human	Hs99999909_m1	Applied Biosystems
IL-22BP	<i>Il22ra2</i>	Rat	Rn01766097_m1	Applied Biosystems
IL-22	<i>Il22</i>	Rat	Rn01760432_m1	Applied Biosystems
LCN2	<i>Lcn2</i>	Rat	Rn00590612_m1	Applied Biosystems
BD2	<i>Defb2</i>	Rat	Rn02532184_g1	Applied Biosystems
MUC2	<i>Muc2</i>	Rat	Rn01498196_g1	Applied Biosystems
HPRT	<i>Hprt1</i>	Rat	Rn01527840_m1	Applied Biosystems

Supplementary results

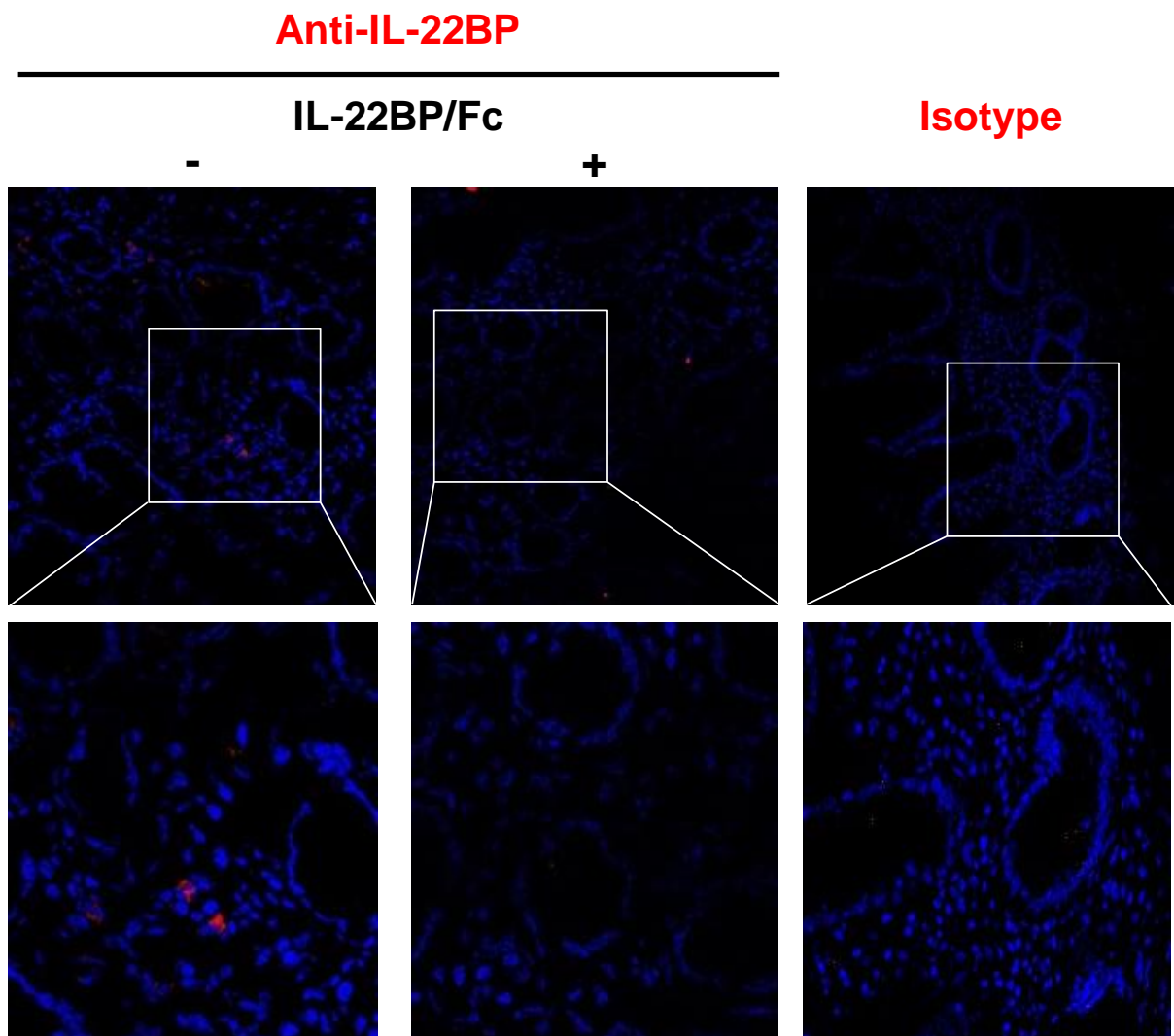
Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 1: Purity and phenotype of human colon eosinophils

(A) Human colon eosinophils were sorted using the indicated gating strategies. Purity was assessed on sorted eosinophils by using the same gating strategies and was routinely > 90%. **(B)** Phenotypic analysis of human colon eosinophils and neutrophils. Data are representative of at least 3 independent experiments.

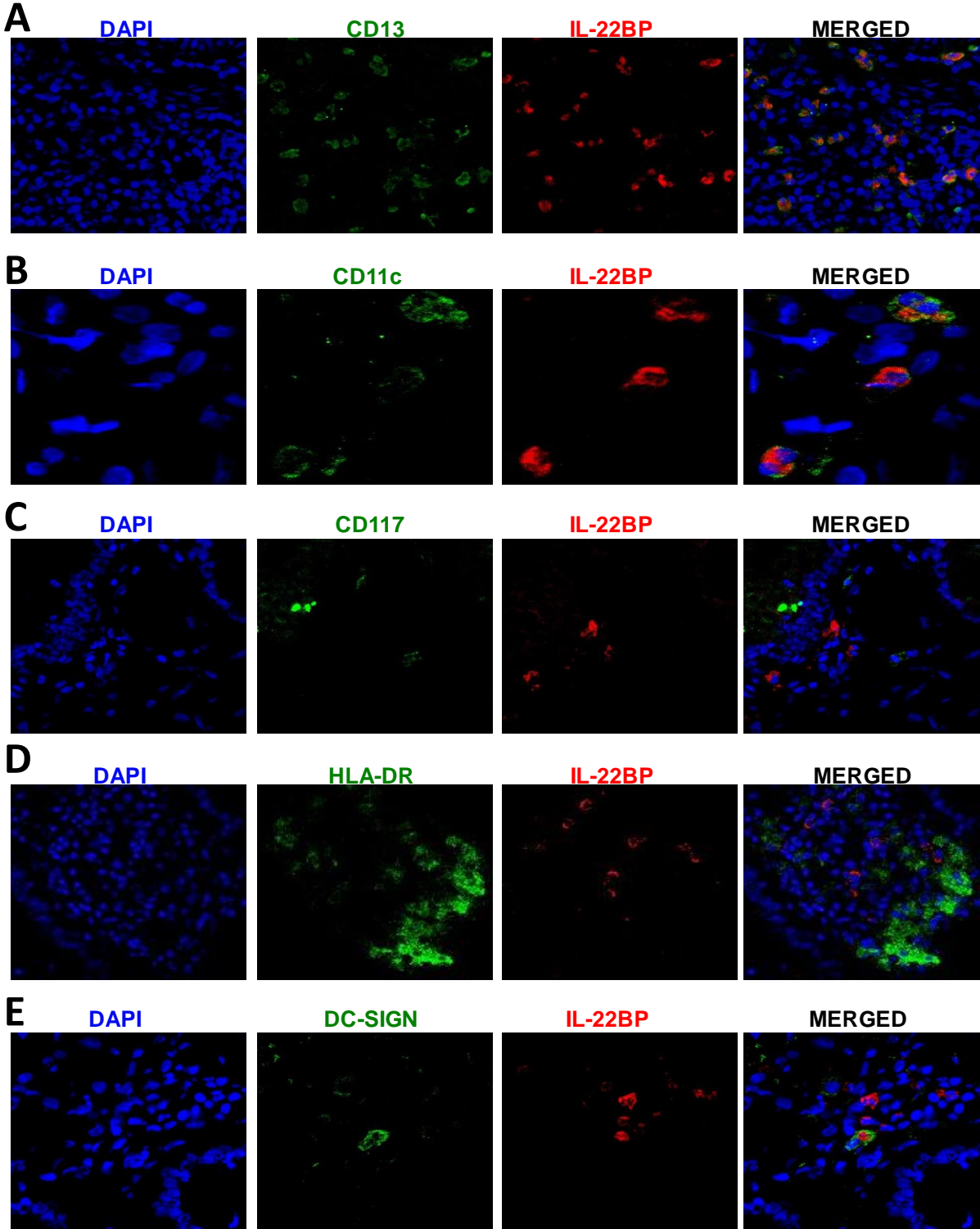
Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 2: Assessment of antiIL-22BP mAb specificity

Formalin-fixed frozen sections of human normal colon were stained with Alexa Fluor[®] 568-labelled mouse anti-IL-22BP mAb with or without prior incubation with recombinant IL-22BP (2 left panels). Mouse IgG1 isotype antibodies labelled with Alexa Fluor[®] 568 were incubated on colon sections in a similar way to anti-IL-22BP (right panels).

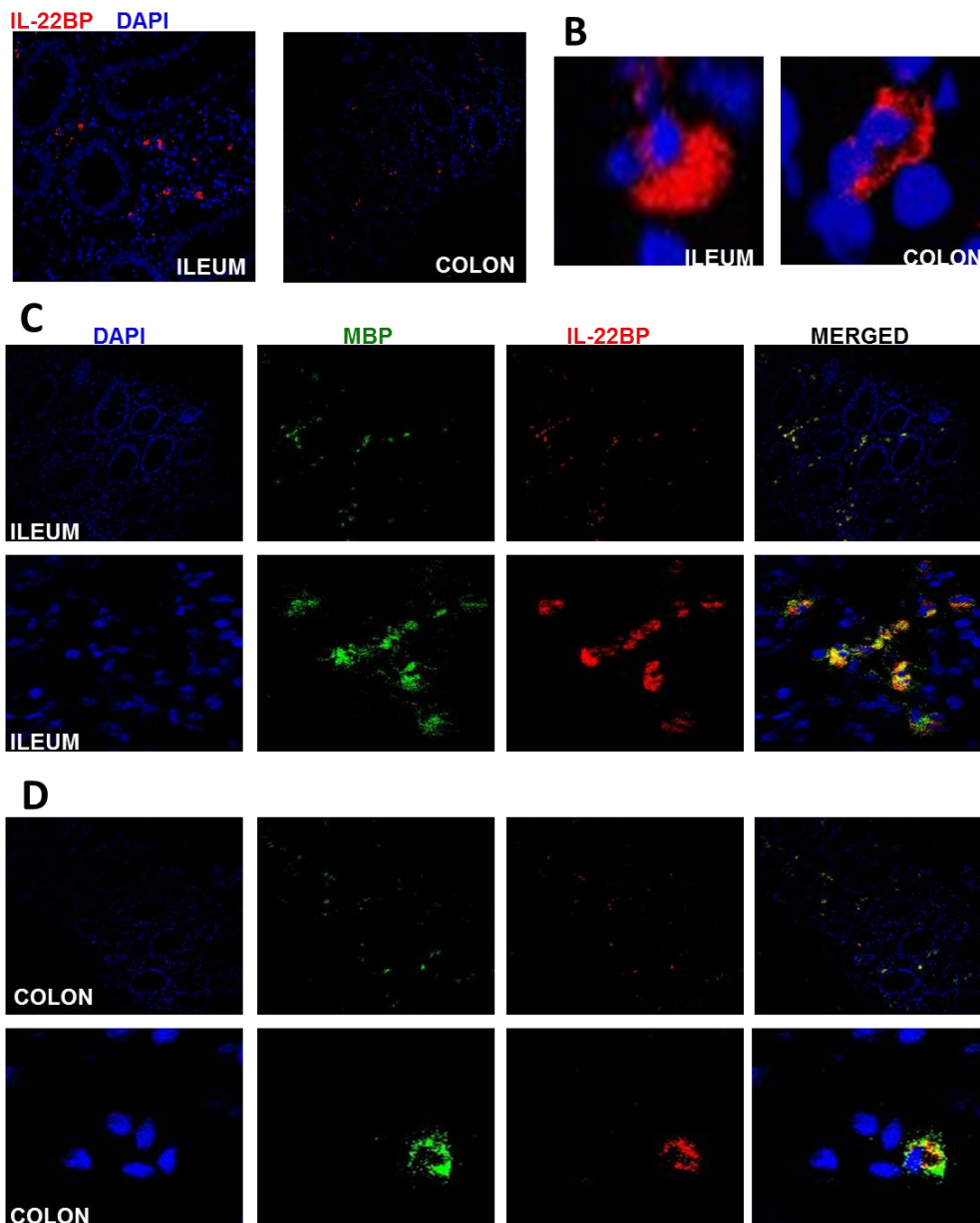
Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 3: Phenotypic analysis of IL-22BP+ cells

(A-E) Formalin-fixed frozen sections of human normal colon were double stained with anti-IL-22BP monoclonal antibody and the indicated antibody.

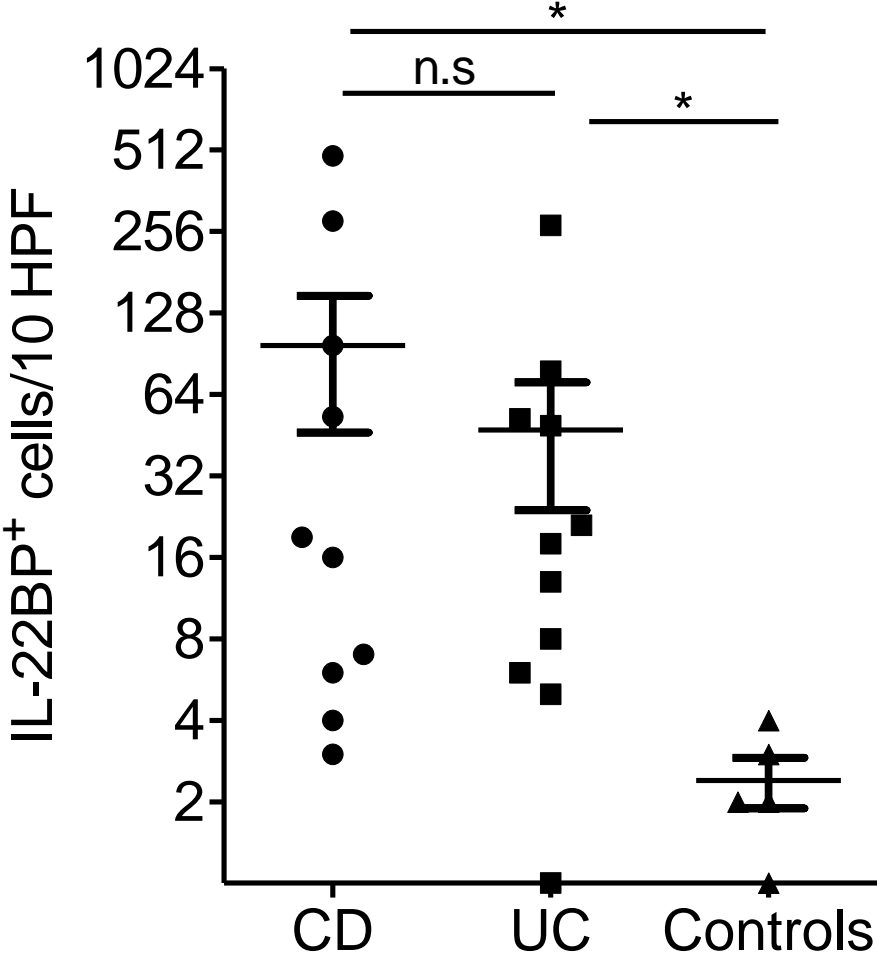
Supplementary Figure 4



Supplementary Figure 4: Immunofluorescence analysis of IL-22BP in normal human gut

(A) Formalin-fixed frozen sections of normal human ileum (left) and colon (right) were stained with an Alexa Fluor[®] 568-conjugated anti-IL-22BP mAb (clone AH22BP9.1) (red) and DAPI (blue). Original magnification x 200. Data are representative of at least two independent experiments on different donors. **(B)** Higher magnification of IL-22BP+ cells in the ileum (left) and colon (right). **(C&D)** Double-immunofluorescence stainings of human ileum **(C)** and colon **(D)** with anti-MBP mAb (green), anti-IL-22BP mAb (red) and DAPI (blue). Data are representative of at least two independent experiments on different donors. MBP: major basic protein.

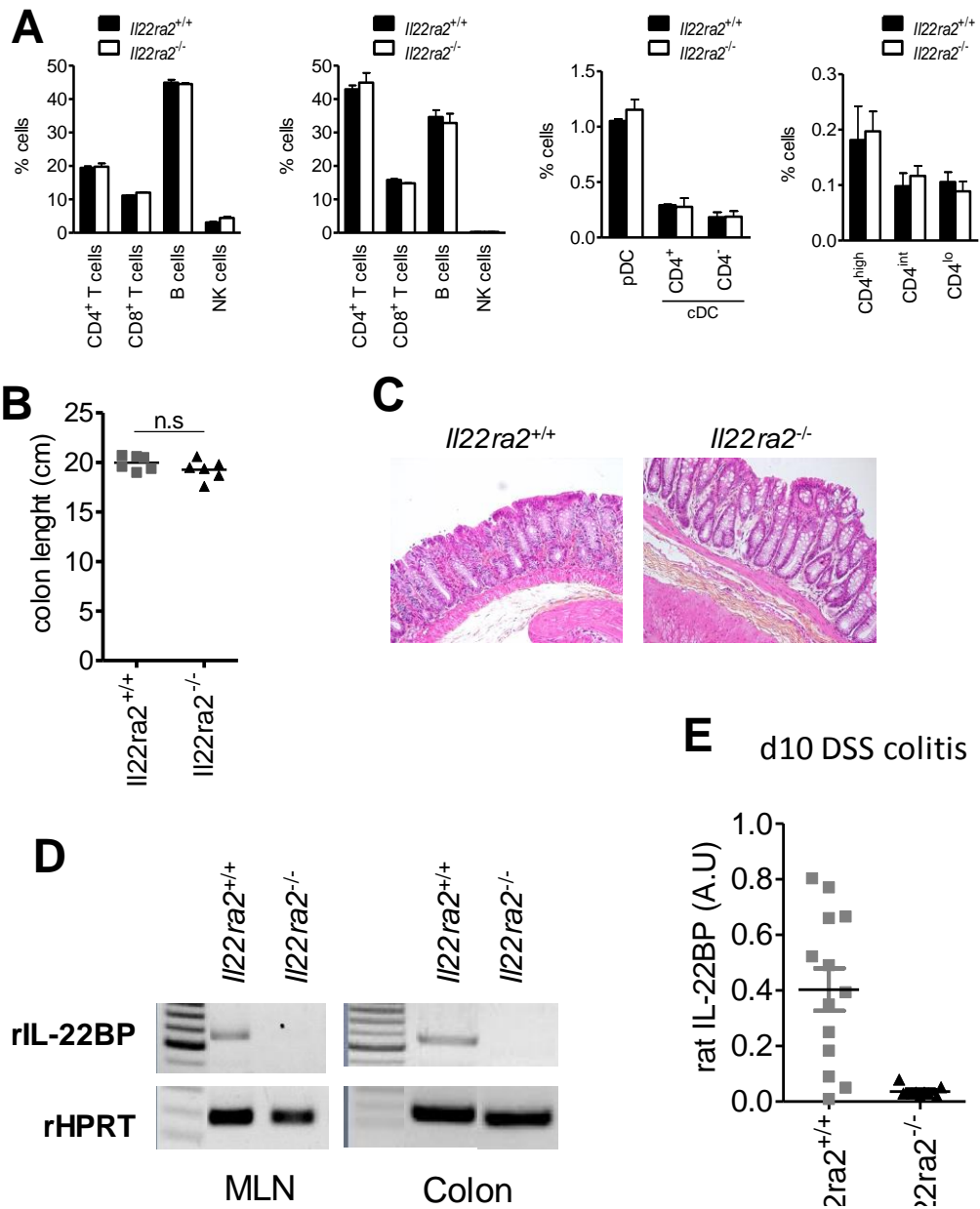
Supplementary Figure 5



Supplementary Figure 5: High number of IL-22BP positive cells in CD and UC as compared to controls

IL-22BP immunohistochemistry was performed on available formalin-fixed paraffin-embedded sections from inflamed areas of CD (n=10) and UC (n=11) patients, and from controls (n=5). IL-22BP⁺ cells were scored in a blinded fashion from 10 HPF. Each symbol represents a single patient. * p<0.05; n.s: non-significant. HPF: High power field.

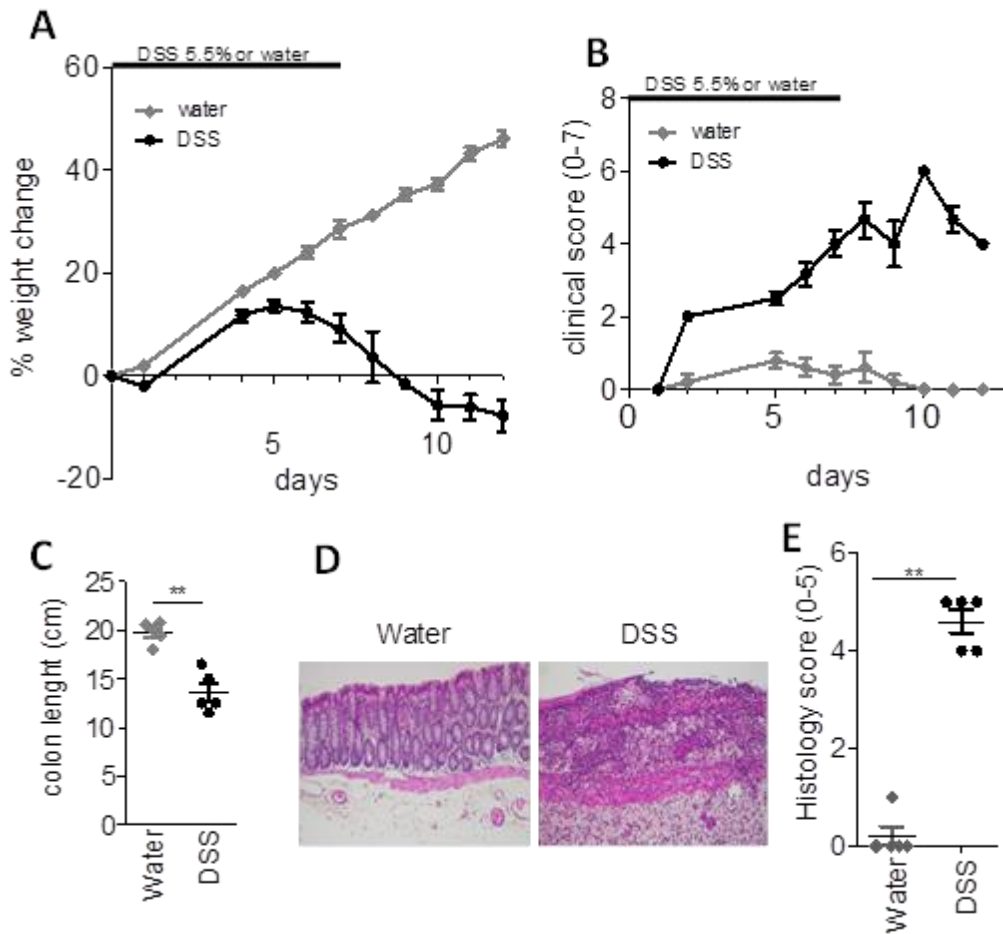
Supplementary Figure 6



Supplementary Figure 6: Phenotype of IL-22BP-deficient rats

(A-D) % of lymphocytes and DCs were analyzed in spleen and MLN of *Il22ra2*^{+/+} and *Il22ra2*^{-/-} rats by flow cytometry. (E) Colon length of 8-10 weeks old *Il22ra2*^{+/+} and *Il22ra2*^{-/-} rats were measured at steady state. (F) Representative HES staining of colon at steady state. (G) IL-22BP mRNA expression was assessed by RT-qPCR at steady state in MLN and colon of *Il22ra2*^{+/+} and *Il22ra2*^{-/-} rats. (H) IL-22BP gene expression was analyzed by RT-qPCR. Each symbol corresponds to one rat and represents IL-22BP gene expression relative to HPRT expression as determined by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method of relative quantification.

Supplementary Figure 7



Supplementary Figure 7: DSS-induced colitis in SPD rats

SPD rats were given regular water or 5.5% DSS *ad libitum* in the drinking water for 7 days. DSS was then switched to regular water for 5 more days. Weight and clinical score were assessed every day. Each symbol represents mean of % weight change **(A)** or clinical score **(B)** \pm SEM. **(C)** Colon length were measured at sacrifice. **(D)** Representative HES staining of colon at sacrifice. **(E)** Histology score measured in a blinded fashion in colon at sacrifice. Data are representative of 2 independent experiments.

Résultats additionnels : Rôle de l'IL-22BP dans le modèle de lésions psoriasiformes induites par l'Aldara®

L'application quotidienne d'Aldara® (imiquimod) sur la peau ou l'oreille induit des changements phénotypiques très proches de ceux observés au cours du psoriasis et dépend des actions de l'IL-17 et de l'IL-22 induites par l'IL-23 (Van Belle et al., 2011; van der Fits et al., 2009; Pantelyushin et al., 2012). Chez le rat SPD, l'application d'Aldara® sur l'oreille se caractérise également par une induction d'IL-22 dès le 3^{ème} jour de traitement et semble maximale au jour 5 (**Figure 13A**). Aucune variation notable de l'expression de l'IL-22R n'est en revanche notée (**Figure 13B**). De plus, l'expression de l'IL-22BP est maintenue tout au long du traitement, tendant même à augmenter légèrement (**Figure 13C**). Ces résultats suggèrent donc que l'IL-22BP pourrait atténuer les actions pathologiques de l'IL-22 dans ce modèle. En accord avec cette hypothèse, le traitement des rats déficients pour l'IL-22BP conduit à l'installation de lésions cutanées plus sévères que celles notées pour les rats *Il22ra2^{+/+}*, s'accompagnant d'un épaissement de l'oreille plus important (**Figure 13D&E**). Le retentissement systémique semble lui aussi être plus marqué chez les rats *Il22ra2^{-/-}* qui, en fin de traitement, et contrairement aux animaux *Il22ra2^{+/+}*, présentent un poids inférieur à celui de départ (**Figure 13F**). Finalement, l'analyse histologique des oreilles après 5 jours de traitement révèle un infiltrat inflammatoire du derme plus important chez les rats *Il22ra2^{-/-}*, s'accompagnant d'une dysplasie et d'une desquamation fortes (**Figure 13G**). L'absence de contrôle des actions de l'IL-22 par l'IL-22BP se traduit par une augmentation de l'expression des PAMs lipocaline-2 et β -défensine-2 dont l'expression par les kératinocytes peut être induite par l'IL-22 (Liang et al., 2006; Sa et al., 2007; Wolk et al., 2006) (**Figure 14A&B**). Au contraire, l'involucrine, qui est impliquée dans la différenciation terminale des kératinocytes et dont l'expression est inhibée par l'IL-22 (Boniface et al., 2005) présente une expression moins forte chez les animaux *Il22ra2^{-/-}* (**Figure 14C**). Ces résultats indiquent donc que l'absence d'IL-22BP conduit à une majoration des actions de l'IL-22, dont il résulte une atteinte cutanée plus sévère. L'exacerbation des actions de l'IL-22 semble de plus favoriser un emballement global des réponses inflammatoires dans l'oreille, illustré par l'augmentation importante de l'expression de TNF α , IL-1 β , IFN γ , IL-17A, IL-6 et de l'IL-22 elle-même (**Figure 14 E-I**).

Au total, ces résultats indiquent que malgré son rôle pathologique important au cours du psoriasis, l'IL-22 reste tout de même en partie contrôlée par l'IL-22BP produite dans la peau. Une augmentation du contrôle de l'IL-22 par l'administration d'IL-22BP exogène

pourrait donc représenter une opportunité thérapeutique intéressante, particulièrement en association avec les biothérapies ciblant l'IL-17 déjà disponibles et remarquablement efficaces (Hueber et al., 2010; Leonardi et al., 2012; Papp et al., 2012, 2013).

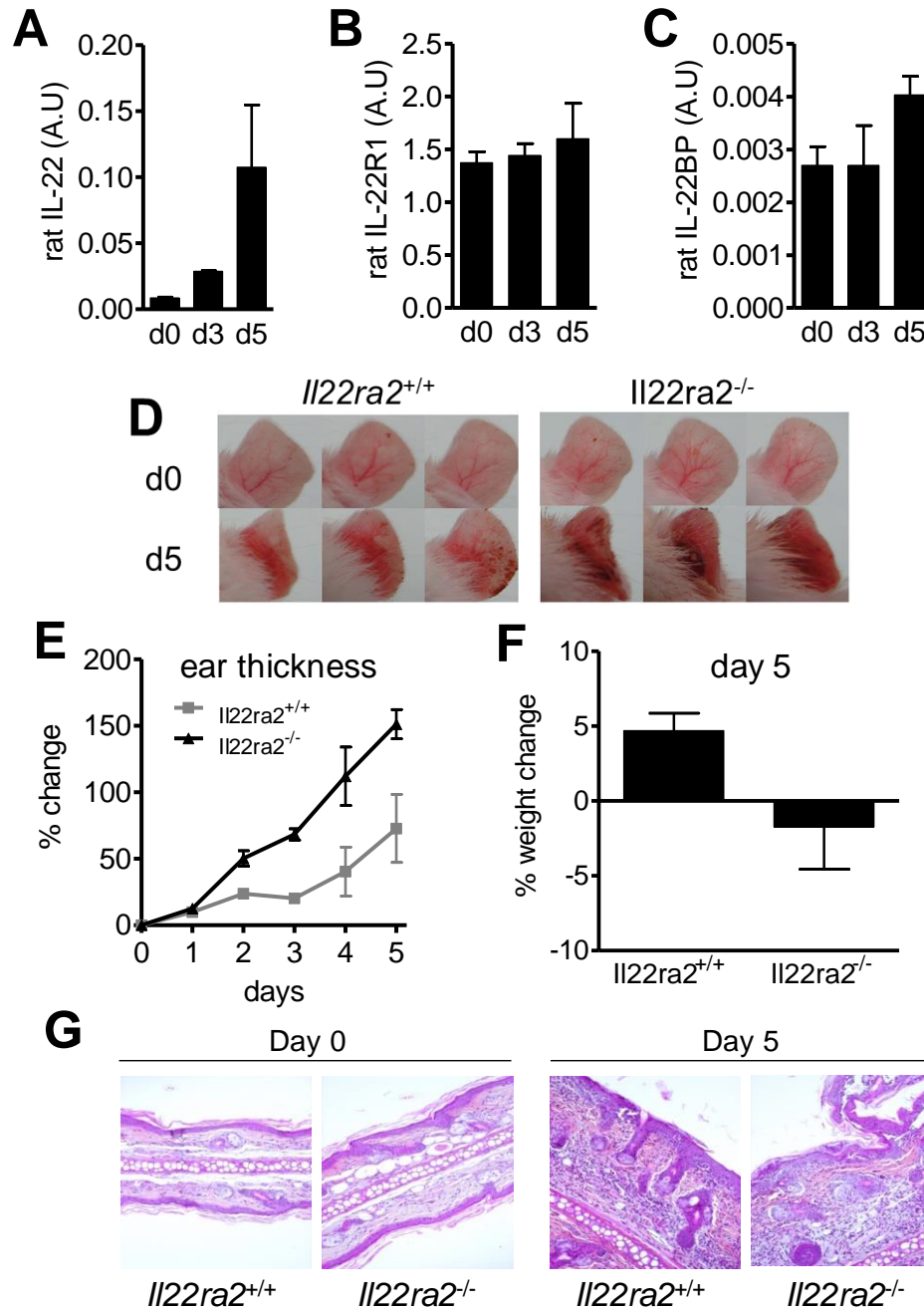


Figure 13: L'absence d'IL-22BP majore la sévérité des lésions psoriasiformes induites par l'Aldara®. De l'Aldara® a été appliqué quotidiennement sur l'oreille droite des rats pendant 5 jours. (A-C) L'expression de l'IL-22 (A), l'IL-22R1 (B) et l'IL-22BP (C) ont été analysées aux temps indiqués par qPCR et normalisées par rapport à l'HPRT. Les barres représentent la moyenne +/- s.e.m des ratios d'expression des gènes concernés par rapport à l'HPRT, déterminés par la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$. (D) Photographies représentatives de l'oreille droite de rats *Il22ra2*^{+/+} et *Il22ra2*^{-/-} avant la 1^{ère} application d'Aldara® et au 5^{ème} jour. (E) L'épaisseur de l'oreille droite a été mesurée quotidiennement à l'aide d'un pied à coulisse numérique (moyenne +/- s.e.m). (F) % de variation de masse à J5 en comparaison au poids à J0 (moyenne +/- s.e.m). (G) Colorations HES représentatives de coupe d'oreille avant et après 5 jours de traitement par Aldara®. n=3-9 rats par groupes.

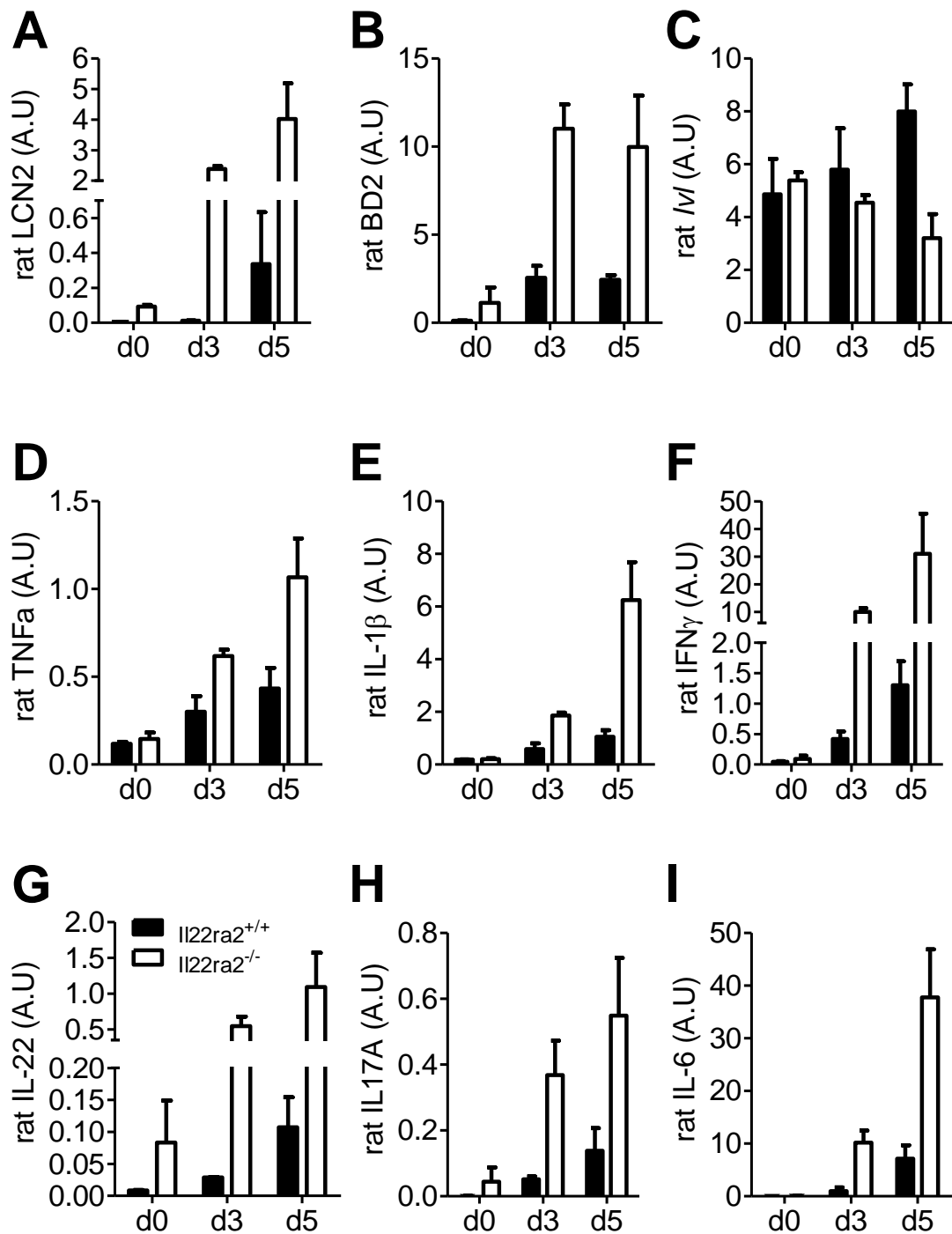


Figure 14: L'absence d'IL-22BP se traduit par une exacerbation de l'inflammation de l'oreille au cours de l'application d'Aldara®. (A-I) Les expressions des gènes mentionnés ont été analysées aux temps indiqués par qPCR et normalisées par rapport à l'HPRT. Les barres représentent la moyenne \pm s.e.m des ratios d'expression des gènes concernés par rapport à l'HPRT, déterminés par la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$. n=3-9 rats par groupes.

Discussion et perspectives

Par ce travail nous avons pu montrer que les sources principales d'IL-22BP semblent majoritairement représentées par les cDCs et les polynucléaires éosinophiles, particulièrement dans le système immunitaire muqueux intestinal, la production par les éosinophiles n'ayant cependant pour l'instant été caractérisée que chez l'homme (**articles 1&2**). Nous avons également identifié que l'acide rétinoïque est un inducteur puissant de l'expression d'IL-22BP par les cDCs, contribuant probablement ainsi aux très hauts niveaux retrouvés pour ces cellules dans l'intestin. A l'inverse la maturation des cDCs s'accompagne d'un arrêt de leur expression de cet inhibiteur soluble (**article 1**). Par ailleurs, nous avons démontré, grâce à la génération de rats déficients pour l'IL-22BP, que ce dernier exerce des propriétés inhibitrices importantes sur les actions de l'IL-22 au cours de modèles de colite inflammatoire et de psoriasis (**article 2 ; Figures 13&14**). Finalement, nous avons suggéré qu'une régulation différente de la production d'IL-22BP dans la MC et la RCH soit à l'origine d'actions différentes de l'IL-22 au cours de ces deux maladies, et proposé l'IL-22BP en tant que cible thérapeutique intéressante au cours des phases aiguës de la MC (**article 2**).

La caractérisation des sources cellulaires d'IL-22BP *in vivo* était une question importante puisqu'aucune étude ne l'avait encore directement abordée. Compte-tenu des rôles majeurs exercés par l'IL-22 dans l'intestin, et de l'expression forte d'IL-22BP à ce niveau (**article 1**) (Dumoutier et al., 2001; Xu et al., 2001), nous nous sommes particulièrement attachés à identifier les sources d'IL-22BP dans le système immunitaire muqueux intestinal. L'analyse de populations de cellules triées par cytométrie en flux indique très clairement que les cDCs expriment fortement et constitutivement l'ARNm d'IL-22BP dans les OLS et la muqueuse digestive chez le rat, la souris et l'homme (**articles 1&2 ; Figure 12**). Nos résultats chez le rat et la souris indiquent également qu'au niveau du système immunitaire muqueux intestinal, l'expression d'IL-22BP par les cDCs apparaît majoritairement restreinte à la population CD103⁺ CD11b⁺. L'expression d'IL-22BP par ces cellules a par ailleurs été confirmée récemment par un autre groupe dans les ganglions mésentériques de souris (Laaksonen et al., 2014), et étendue à la muqueuse digestive humaine, sur des prélèvements de jéjunum obtenus après chirurgie bariatrique (Watchmaker et al., 2014). Il semble ainsi que la production d'IL-22BP par les cDCs CD103⁺ CD11b⁺ dans l'intestin soit conservée entre les espèces, témoignant donc probablement d'une spécialisation fonctionnelle de ces cellules dans le contrôle des actions de l'IL-22. L'expression d'IL-22BP par les cDCs n'est pas restreinte à

l'intestin puisque de hauts niveaux peuvent être détectés dans les cDCs spléniques chez le rat (**article 1**). Ces derniers ne sont cependant pas retrouvés chez la souris, qui contrairement au rat, présente uniquement de faibles niveaux d'expression d'IL-22BP dans la rate (**article 1**) (Laaksonen et al., 2014), et n'ont pas été analysés chez l'homme. En revanche, une production d'IL-22BP par les cDCs des ganglions inguinaux de souris a été suggérée (Laaksonen et al., 2014). Finalement, une expression d'IL-22BP par les cellules de Langerhans semble aussi exister dans l'épiderme humain, mais nécessite toutefois d'être plus clairement établie (Hutter et al., 2012). Il apparaît donc, au vu de ces résultats, que les cDCs pourraient représenter une source d'IL-22BP ubiquitaire, permettant une expression constitutive dans les OLS et les différents tissus épithéliaux cibles de l'IL-22.

L'analyse de l'expression d'IL-22BP par les cellules du colon humain a également fait ressortir des niveaux significatifs dans les polynucléaires éosinophiles (**article 2**). Ces résultats étaient assez inattendus puisqu'aucune expression n'avait été détectée dans les cellules CMH-II du colon de rat (**Figure 12**). Dans leur étude, Huber et al. ont également suggéré que la production d'IL-22BP soit restreinte aux cellules dendritiques dans le colon de souris, puisque l'expression d'ARNm était uniquement détectée dans les cellules $\text{TCR}\alpha\beta^- \text{CD11c}^+$ (Huber et al., 2012). Cependant, l'expression concomitante du CMH-II par ces cellules n'a pas été clairement explicitée, laissant la possibilité que les éosinophiles, exprimant aussi le CD11c, soient également présents dans la fraction IL-22BP⁺. L'analyse des souris *Flt3^{-/-}* et *Flt3r^{-/-}* nous a de plus laissé supposer que d'autres cellules que les cDCs puissent exprimer l'IL-22BP (**article 1**). Ces données nous ont donc conduits à évaluer directement l'expression d'IL-22BP dans les cellules fortement granuleuses et CD11b^+ du colon de rat, correspondant majoritairement aux éosinophiles, mais aucun signal n'a pu être détecté. Nous n'avons par ailleurs pas encore analysé l'expression d'IL-22BP spécifiquement dans les éosinophiles du colon de souris.

La question de savoir si les éosinophiles de rongeurs produisent également l'IL-22BP est importante puisque l'analyse au niveau protéique, par des expériences de doubles immunomarquages en IFI, a révélé que la source la plus abondante d'IL-22BP dans le colon humain est représentée par les éosinophiles (**article 2**). Une réponse négative à cette question reflèterait donc des différences inter-espèces majeures, et par la même probablement des fonctions physiologiques différentes de l'IL-22BP. Il est en effet possible que l'IL-22BP soit préformée dans les granules des éosinophiles de manière à pouvoir être relarguée rapidement et en abondance au cours de situations aiguës associées à des hauts niveaux de production d'IL-22, nécessitant donc des actions régulatrices renforcées. La nature préformée de l'IL-

22BP dans les granules des éosinophiles pourrait alors expliquer leurs plus faibles niveaux d'expression d'ARNm en comparaison de ceux détectés dans les cDCs. Il serait également envisageable que l'expression du gène soit éteinte dans les éosinophiles coliques de rat, en dépit d'une quantité importante présente dans les granules. De telles différences entre les niveaux d'expressions génique et protéique ont déjà été décrits pour la protéine MBP des éosinophiles du colon (Nakajima et al., 2001). Il faut néanmoins garder en mémoire que des différences inter-espèces existent entre les éosinophiles humains et de rongeurs, et il ne peut donc pas être exclu que la production d'IL-22BP en fasse partie (Lee et al., 2012). Au contraire, la production constante par les cDCs immatures pourrait permettre d'établir un niveau basal d'IL-22BP, propre à réguler de faibles quantités d'IL-22 notamment produites par les ILCs du groupe 3 dans l'iléon. La distribution et la fréquence des cDCs dans les tissus périphériques laissent également penser que leur sécrétion d'IL-22BP pourrait être beaucoup plus localisée, restreinte à certaines cellules à travers la mise en place de contacts cellulaires étroits. De telles interactions semblent pouvoir exister, notamment grâce à l'expression de la $LT\alpha_1\beta_2$ et de son récepteur, par les LTi et les cDCs intestinales respectivement (Upadhyay et al., 2012).

Les éosinophiles sont naturellement présents en grandes quantités dans l'intestin (Chu et al., 2014), ce qui explique pourquoi ils représentent la source majeure d'IL-22BP à ce niveau. La rapidité du renouvellement de l'épithélium intestinal pourrait justifier la présence de quantités plus importantes d'IL-22BP dans ce tissu, du fait des propriétés que peut exercer l'IL-22 sur les cellules souches intestinales. Pour autant, il est possible que les éosinophiles viennent également augmenter les quantités d'IL-22BP dans les tissus qu'ils infiltrent. Il peut par exemple être remarqué que l'envahissement important du foie par les éosinophiles au cours d'une modèle murin de bilharziose (Nascimento et al., 2014), s'accompagne d'une induction de l'expression d'IL-22BP dans ce tissu, qui n'en exprime pas constitutivement (Wilson et al., 2010). De même, l'analyse de puces à ADN de patients atteints de dermatite atopique, dont la peau lésionnelle est caractérisée par des infiltrats importants d'éosinophiles, semble également en faveur d'une augmentation de l'expression d'IL-22BP (**Figure 15**) (numéro d'accèsion geoprofiles : GDS2382 (Plager et al., 2007)).

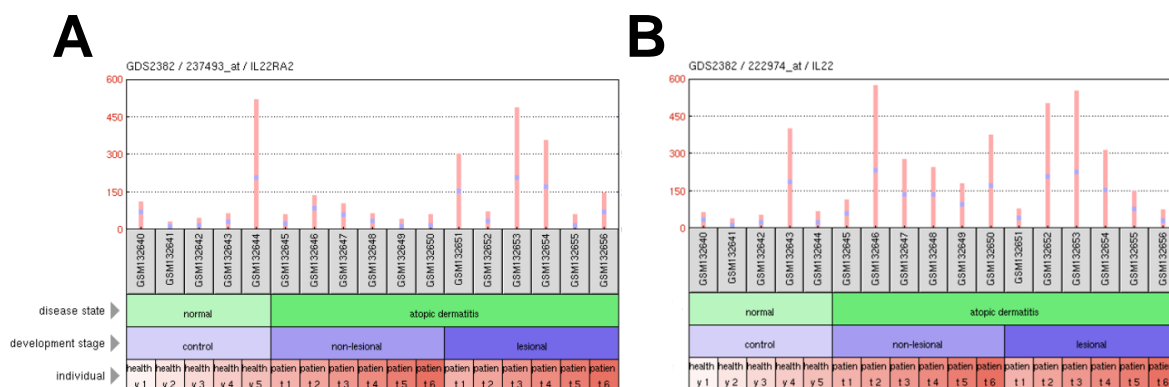


Figure 15 : Expression d'IL-22BP et d'IL-22 dans la peau de patients atteints de dermatite atopique. Les niveaux d'expression d'IL-22BP (A) et d'IL-22 (B) sont représentés dans la peau de volontaires sains ainsi que dans les peaux saine et lésionnelle de patients atteints de dermatites atopique.

Un obstacle majeur à la caractérisation complète des sources d'IL-22BP chez le rongeur réside toujours dans l'absence d'anticorps permettant l'obtention de marquages convaincants des cellules IL-22BP⁺, par quelque technique que ce soit. Une étude récente a proposé, par une expérience de double immunomarquage en IFI dans le colon de souris *Rag1*^{-/-}, que l'IL-22BP soit produite par des cellules NKp46⁺ (Janakiram et al., 2014). Pour autant, le protocole utilisé pour le double marquage, associé aux aspects rigoureusement identiques des marquages du NKp46 et de l'IL-22BP, laissent dubitatif sur la qualité de ces résultats. Affaiblissant un peu plus la crédibilité de cette étude, l'alignement sur le génome de souris, de la séquence de l'amorce orientée dans le sens 5'-3' utilisée pour l'analyse de l'expression d'IL-22BP par PCR, dans lymphocytes NK spléniques, ne retrouve par le gène *Il22ra2* mais *Creb1*. Pour répondre à la question de la production d'IL-22BP par les éosinophiles de rats, tout en s'affranchissant du manque d'outils fiables nécessaires à sa détection, nous allons par conséquent générer prochainement des animaux pour lesquels l'expression de la GFP (*green fluorescent protein*) sera sous le contrôle du promoteur du gène *Il22ra2* (*Il22ra2*^{+/GFP}). Ces animaux devraient permettre ainsi d'identifier précisément par cytométrie en flux, l'ensemble des cellules exprimant ou ayant exprimé, même transitoirement, l'IL-22BP. Si ces derniers devaient confirmer la production d'IL-22BP par les éosinophiles, les fonctions de la production respective de l'inhibiteur soluble par les éosinophiles et les cDCs pourraient de plus être analysées par la génération de KO conditionnels, grâce à l'utilisation des CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*), dont la manipulation est maîtrisée dans notre unité.

Les animaux *Il22ra2*^{+/GFP} permettront également de détecter l'IL-22BP soluble, notamment dans les liquides biologiques, par l'ajout d'un peptide c-Myc à l'extrémité C-

terminale de la protéine. L'IL-22BP étant une protéine sécrétée, il est en effet possible qu'elle soit présente à ce niveau. Jusqu'alors, 2 études ont présenté des dosages d'IL-22BP soluble dans le sérum de souris et les urines humaines respectivement. Dans la première, une détection d'IL-22BP sérique a été observée dans les phases précoces suivant l'ischémie-reperfusion rénale. Les auteurs ont suggéré que cette augmentation d'IL-22BP sérique puisse entraver les effets protecteurs de l'IL-22 sur les cellules tubulaires (Xu et al., 2014a). Dans la seconde, les auteurs ont proposé qu'une augmentation de l'IL-22BP urinaire, mais pas sérique, soit associée à une maladie rénale active chez les patients atteints de lupus systémique (Yang et al., 2014). Dans notre expérience, la spécificité des kits ELISA utilisés dans ces études ne nous avait pas paru suffisante pour témoigner d'une détection réelle d'IL-22BP. Le couplage au peptide c-Myc permettra donc de détecter l'IL-22BP de façon certaine chez nos rats *Il22ra2^{+GFP}*.

Une autre question importante concernait la démonstration de l'existence du contrôle des actions de l'IL-22 par l'IL-22BP *in vivo*. Cette dernière a pu être mise en évidence grâce à la génération d'animaux déficients pour le gène *Il22ra2*. Nous avons ainsi montré que l'IL-22BP entrave les effets protecteurs de l'IL-22 sur l'épithélium intestinal au cours du modèle de colite aigue induite par le DSS (**article 2**), mais atténue en revanche ses actions délétères dans le modèle de lésions psoriasiformes induites par l'Aldara® (**Figures 13&14**). De façon surprenante, nos résultats dans le modèle de colite induite par le DSS n'ont pas été retrouvés dans une autre étude chez la souris (Huber et al., 2012). En effet, Huber et al., ont suggéré que la sous-expression importante de l'ARNm d'IL-22BP, observée de façon très précoce dans leur modèle, empêcherait cette dernière d'interagir avec l'IL-22 induite au cours de la colite, expliquant ainsi l'absence de différences notables entre les souris *Il22ra2^{+/+}* et *Il22ra2^{-/-}*. Les auteurs ont tout de même observé une prolifération épithéliale plus importante chez les animaux déficients pour l'IL-22BP au 14^{ème} jour. Les explications de ces différences avec nos résultats peuvent être multiples, comprenant notamment l'espèce, les doses, les lots et la masse molaire du DSS administré, ainsi que les conditions d'élevage des animaux qui peuvent influencer la composition du microbiote intestinal et donc la sensibilité des rongeurs à la colite (Elinav et al., 2011). Il est également possible que la cinétique d'expression de l'IL-22BP soit différente selon le fond génétique de l'espèce utilisée. Contrairement à ce que nous observons chez le rat, une forte sous-expression semble en effet s'observer rapidement chez les souris C57BL/6 (Huber et al., 2012; Sugimoto et al., 2008), qui ont été utilisées pour générer les animaux *Il22ra2^{-/-}*. A l'inverse, une autre étude semble indiquer que cette sous-expression est moins importante au 5^{ème} jour de DSS, lorsqu'il est administré à des souris

BALB/c (Wolk et al., 2007). Il serait de plus utile de savoir si de l'IL-22BP préformée est présente dans les granules des polynucléaires éosinophiles. L'analyse de l'effet de l'administration d'un anticorps neutralisant l'IL-22BP au cours de ce modèle pourrait alors s'avérer intéressante. A défaut d'avoir observé un rôle de l'IL-22BP dans les colites induites par le DSS, Huber et al., démontrent néanmoins un effet inhibiteur important de l'IL-22BP sur les actions de l'IL-22 dans le modèle AOM/DSS, qui favorise le développement de carcinomes coliques (Huber et al., 2012). Les auteurs montrent en effet que le nombre et la taille des tumeurs sont nettement majorés chez les souris *Il22ra2^{-/-}*. Ils proposent donc que l'absence de contrôle de l'IL-22 par l'IL-22BP engendre une prolongation de ses effets dans le temps, favorisant alors une prolifération accrue des cellules épithéliales malignes, et par là-même le développement tumoral. Finalement, un travail récent suggère que l'absence d'IL-22BP atténue la sévérité de la maladie au cours d'un modèle d'encéphalite expérimentale auto-immune (EAE) (Laaksonen et al., 2014). Toutefois, les arguments fournis par les auteurs démontrant que l'absence d'IL-22BP favoriserait des actions protectrices de l'IL-22 dans ce modèle sont assez limités, d'autant plus que l'importance de l'IL-22 au cours de l'EAE n'est pas clairement établie (Kreymborg et al., 2007).

Indépendamment du modèle étudié, ces différentes études, prises dans leur ensemble, indiquent clairement que les actions de l'IL-22 sont tributaires du contrôle qui peut en être effectué par l'IL-22BP *in vivo*. Par conséquent, l'interprétation des hauts niveaux de production de la cytokine dans les tissus lésionnels des différentes pathologies dans laquelle elle a pu être décrite, doit, à l'image de ce qui est déjà admis pour l'IL-18 (Dinarello et al., 2013), impérativement tenir compte de la présence concomitante ou non de son inhibiteur soluble. Ainsi qu'il l'a été suggéré dans l'article 2, une régulation différentielle de la production d'IL-22BP pourrait par exemple promouvoir des actions différentes de l'IL-22 dans la MC et la RCH, malgré des niveaux de productions similaires de la cytokine. De même, l'absence de rôle évident retrouvé pour l'IL-22 dans les modèles animaux de PR, en dépit des études *in vitro* proposant qu'elle puisse y exercer des actions pathologiques importantes, pourrait s'expliquer par la présence de hauts niveaux d'IL-22BP dans les articulations inflammatoires, ainsi qu'il l'a déjà été observé dans le modèle *Il1ra^{-/-}* (Marijnissen et al., 2011). Une telle hypothèse pourrait d'ailleurs expliquer l'échec d'un essai clinique évaluant l'efficacité de l'administration d'un anticorps neutralisant l'IL-22 dans la PR, suggéré par l'absence de résultats publiés bien que l'essai soit terminé depuis plusieurs années (<https://clinicaltrials.gov>; identifiant: NCT00883896). Pour finir, compte-tenu du fait que l'IL-22 semble exercer des actions pathologiques importantes dans les enthèses, au cours

d'un modèle murin de spondylarthropathie (Sherlock et al., 2012), l'analyse de l'axe IL-22/IL-22R/IL-22BP dans les articulations inflammatoires des patients atteints de spondylarthrite ankylosante pourrait s'avérer particulièrement intéressante afin d'en évaluer la pertinence physiopathologique.

Au-delà de la caractérisation du rôle physiopathologique que l'IL-22BP pourrait jouer à travers ses propriétés inhibitrices sur les actions de l'IL-22, les différentes études sur les animaux *Il22ra2^{-/-}* sont importantes puisqu'elles entrouvrent la voie d'une modulation possible des actions de l'IL-22 à des fins thérapeutiques, par le blocage de son inhibiteur soluble. Il a déjà été discuté plus haut qu'une majoration des effets de l'IL-22 au cours des poussées inflammatoires de la MC pourrait s'avérer utile afin de ralentir la progression de l'atteinte épithéliale. Une administration d'IL-22 recombinante à cet effet ne semble pas recommandée puisqu'elle pourrait s'accompagner d'effets indésirables systémiques et de type psoriasis, particulièrement chez les sujets prédisposés génétiquement. L'administration de ligands d'AHR par voie orale a également été proposée (Monteleone et al., 2011), mais il est cependant difficile d'anticiper le retentissement global d'un tel traitement, l'expression de nombreux gènes, autres que celui codant pour l'IL-22, pouvant également être influencée. En revanche, puisque l'IL-22BP est fortement exprimée dans la muqueuse inflammatoire de la MC, sa neutralisation permettrait d'augmenter les effets de l'IL-22 de façon transitoire, dépendante de la demi-vie du produit administré, et permettant ainsi de prévenir des actions prolongées qui pourraient s'avérer dangereuses. En outre, l'IL-22BP étant spécifique de l'IL-22, et l'expression de cette dernière ne semblant pas être retrouvée constitutivement dans d'autres tissus que l'intestin, peu d'effets indésirables liés à la neutralisation de l'IL-22BP semblent pouvoir être attendus. Finalement, les expériences de cristallisation, ayant permis de définir avec précision les sites d'interactions importants entre l'IL-22BP et l'IL-22 (de Moura et al., 2009), en conjonction avec l'avènement des techniques de chimie combinatoire et de criblage à haut débit, rendent envisageable le développement d'antagonistes non peptidiques de l'IL-22BP, et par là même faiblement immunogènes, dont l'utilisation répétée serait ainsi possible. L'efficacité d'un tel antagoniste pourrait probablement s'évaluer dans un modèle préclinique de colite induite par le DSS chez le rat, compte-tenu de nos résultats obtenus avec les animaux *Il22ra2^{-/-}*. A l'inverse, le développement d'une forme permettant l'administration topique d'IL-22BP recombinante pourrait constituer un traitement d'appoint utile pour les formes de psoriasis localisées, ou en association avec les biothérapies ayant démontré une efficacité importante, telles que les anti-TNF α ou les anti-IL-17A.

Un dernier aspect probablement important mais encore non étudié de l'IL-22BP concerne son rôle physiologique dans le maintien de l'homéostasie intestinale. Malgré l'absence de phénotype évident des animaux *Il22^{-/-}* et *Il22ra2^{-/-}*, plusieurs études récentes tendent en effet à indiquer que, par ses actions sur les cellules épithéliales, l'IL-22 exerce des rôles importants dans le façonnement et le contrôle de la flore (Goto et al., 2014; Qiu et al., 2011; Sonnenberg et al., 2012; Zenewicz et al., 2013). Une majoration des effets de l'IL-22 due à l'absence d'IL-22BP pourrait donc influencer la composition de la flore commensale, notamment en entravant la colonisation par les SFB (Qiu et al., 2011; Upadhyay et al., 2012). La présence des SFB étant indispensable à la génération des lymphocytes Th17 dans l'intestin, il se pourrait alors que la fréquence de ces derniers soit réduite spécifiquement à ce niveau chez les des animaux *Il22ra2^{-/-}*. De plus, le développement des lymphocytes Th17 est lui-même important dans le façonnement du système immunitaire muqueux intestinal, ainsi qu'il a pu l'être récemment illustré par leur rôle dans la génération des IgA thymo-dépendantes (Hirota et al., 2013). Il est évident que si ces considérations devaient s'avérer exactes, l'interprétation de la susceptibilité diminuée des rat *Il22ra2^{-/-}* dans le modèle de colite induite par le DSS devrait en tenir compte. Une diminution de la production d'IL-17 par les Th17 dans l'intestin ne conférerait pas de protection accrue à ces colites puisqu'il a au contraire été montré que l'IL-17A était protectrice dans ce modèle (Yang et al., 2008). En revanche, une modification de la composition de la flore intestinale des rats déficients pour l'IL-22BP, favorisant la colonisation par des bactéries protectrices pourrait être possible. Il a d'ailleurs déjà été montré que celle des souris *Il22^{-/-}* favorisait le développement de colites plus sévères (Zenewicz et al., 2013). Pour autant, les conclusions portées dans l'article 2 resteraient toujours valables puisque l'induction d'une colite par le DSS n'est pas strictement dépendante de la flore (Solomon et al., 2010). Par ailleurs, le rôle majeur des actions de l'IL-22 dans ce modèle est clairement démontré par les expériences utilisant des anticorps la neutralisant, ainsi que par celles utilisant de l'IL-22 recombinante ou augmentant la synthèse de la cytokine par l'administration de ligands d'AHR ou d'acide rétinoïque (Cox et al., 2011; Mielke et al., 2013b; Monteleone et al., 2011; Neufert et al., 2010; Sugimoto et al., 2008), et nos résultats indiquent que les actions de l'IL-22 sont majorées au cours de la colite aigue chez les rats *Il22ra2^{-/-}*. Finalement, le maintien de la production d'IL-22BP dans la muqueuse inflammatoire des patients atteints de MC, en fait toujours une cible de choix afin de renforcer les actions de l'IL-22 au cours des poussées de la maladie.

Pour conclure, il est permis de supposer que l'absence d'IL-22BP puisse avoir des conséquences beaucoup plus larges qu'une simple majoration locale des actions de l'IL-22. Il

est en effet maintenant clairement admis que la composition de la flore commensale, largement influencée par les différents acteurs du système immunitaire muqueux intestinal, fait partie intégrante des mécanismes déterminant la susceptibilité de l'hôte au développement de maladies inflammatoires intestinales telles que les MICI, mais aussi extra-digestives comme la sclérose en plaque, le syndrome métabolique ou encore les pathologies allergiques (**Figure 16**). Par conséquent, par son contrôle des actions de l'IL-22 dans l'intestin, l'IL-22BP pourrait participer de façon active à l'établissement de cet équilibre fondamental entre la flore commensale et l'hôte, et donc intervenir dans la prévention ou le développement d'un certain nombre de maladies dont la physiopathologie repose sur des dérégulations non maîtrisées du système immunitaire.

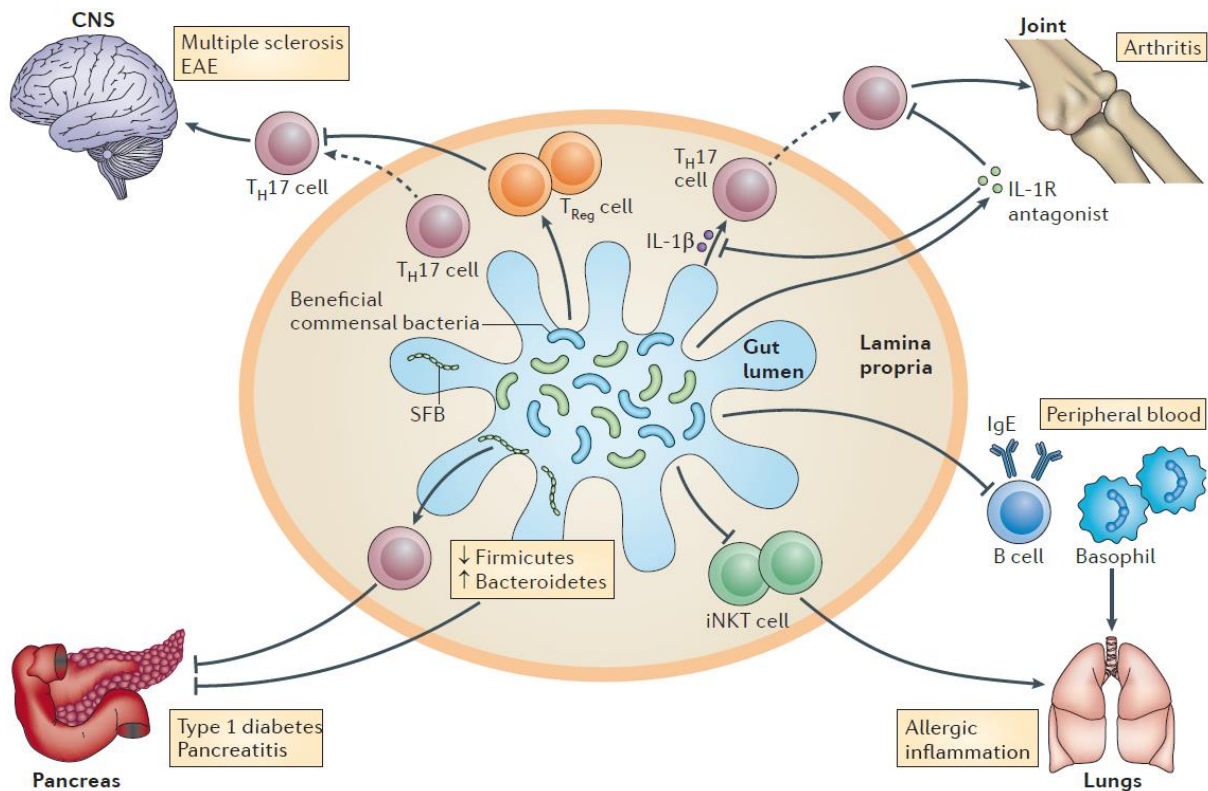


Figure 16 : Influence de la flore commensale sur le développement de pathologies inflammatoires extra-digestives (Kamada N et al., Nat Rev Immunol, 2013).

Références bibliographiques

Acosta-Rodriguez, E.V., Rivino, L., Geginat, J., Jarrossay, D., Gattorno, M., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., and Napolitani, G. (2007). Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat. Immunol.* 8, 639–646.

Aggarwal, S., Xie, M.H., Maruoka, M., Foster, J., and Gurney, A.L. (2001). Acinar cells of the pancreas are a target of interleukin-22. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* 21, 1047–1053.

Alam, M.S., Maekawa, Y., Kitamura, A., Tanigaki, K., Yoshimoto, T., Kishihara, K., and Yasutomo, K. (2010). Notch signaling drives IL-22 secretion in CD4⁺ T cells by stimulating the aryl hydrocarbon receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 5943–5948.

Andoh, A., Zhang, Z., Inatomi, O., Fujino, S., Deguchi, Y., Araki, Y., Tsujikawa, T., Kitoh, K., Kim-Mitsuyama, S., Takayanagi, A., et al. (2005). Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts. *Gastroenterology* 129, 969–984.

Aujla, S.J., Chan, Y.R., Zheng, M., Fei, M., Askew, D.J., Pociask, D.A., Reinhart, T.A., McAllister, F., Edeal, J., Gaus, K., et al. (2008). IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat. Med.* 14, 275–281.

Baeten, D.L.P., and Kuchroo, V.K. (2013). How Cytokine networks fuel inflammation: Interleukin-17 and a tale of two autoimmune diseases. *Nat. Med.* 19, 824–825.

Baeten, D., Baraliakos, X., Braun, J., Sieper, J., Emery, P., van der Heijde, D., McInnes, I., van Laar, J.M., Landewé, R., Wordsworth, P., et al. (2013). Anti-interleukin-17A monoclonal antibody secukinumab in treatment of ankylosing spondylitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 382, 1705–1713.

Bard, J.D., Gelebart, P., Anand, M., Amin, H.M., and Lai, R. (2008). Aberrant expression of IL-22 receptor 1 and autocrine IL-22 stimulation contribute to tumorigenicity in ALK⁺ anaplastic large cell lymphoma. *Leukemia* 22, 1595–1603.

Basu, R., O’Quinn, D.B., Silberger, D.J., Schoeb, T.R., Fouser, L., Ouyang, W., Hatton, R.D., and Weaver, C.T. (2012). Th22 Cells Are an Important Source of IL-22 for Host Protection against Enteropathogenic Bacteria. *Immunity*.

Baumgart, D.C., and Sandborn, W.J. (2007). Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet* 369, 1641–1657.

Begue, B., Verdier, J., Rieux-Laucat, F., Goulet, O., Morali, A., Canioni, D., Hugot, J.-P., Daussy, C., Verkarre, V., Pigneur, B., et al. (2011). Defective IL10 signaling defining a subgroup of patients with inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* 106, 1544–1555.

Behnsen, J., Jellbauer, S., Wong, C.P., Edwards, R.A., George, M.D., Ouyang, W., and Raffatellu, M. (2014). The Cytokine IL-22 Promotes Pathogen Colonization by Suppressing Related Commensal Bacteria. *Immunity*.

Behrends, J., Renaud, J.-C., Ehlers, S., and Hölscher, C. (2013). IL-22 is mainly produced by IFN γ -secreting cells but is dispensable for host protection against Mycobacterium tuberculosis infection. *PloS One* 8, e57379.

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. (2011). IL-22 Is Required for Imiquimod-Induced Psoriasiform Skin Inflammation in Mice. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950.

Benham, H., Norris, P., Goodall, J., Wechalekar, M.D., Fitzgerald, O., Szentpetery, A., Smith, M., Thomas, R., and Gaston, H. (2013). Th17 and Th22 cells in psoriatic arthritis and psoriasis. *Arthritis Res. Ther.* 15, R136.

Benham, H., Rehaume, L.M., Hasnain, S.Z., Velasco, J., Baillet, A.C., Ruutu, M., Kikly, K., Wang, R., Tseng, H.-W., Thomas, G.P., et al. (2014). IL-23 mediates the intestinal response to microbial beta-glucan and the development of spondyloarthritis pathology in SKG mice. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ*.

Beyeen, A.D., Adzemovic, M.Z., Ockinger, J., Stridh, P., Becanovic, K., Laaksonen, H., Lassmann, H., Harris, R.A., Hillert, J., Alfredsson, L., et al. (2010). IL-22RA2 associates with multiple sclerosis and macrophage effector mechanisms in experimental neuroinflammation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 185, 6883–6890.

Bleicher, L., de Moura, P.R., Watanabe, L., Colau, D., Dumoutier, L., Renaud, J.-C., and Polikarpov, I. (2008). Crystal structure of the IL-22/IL-22R1 complex and its implications for the IL-22 signaling mechanism. *FEBS Lett.* 582, 2985–2992.

Boniface, K., Bernard, F.-X., Garcia, M., Gurney, A.L., Lecron, J.-C., and Morel, F. (2005). IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 174, 3695–3702.

Boniface, K., Guignouard, E., Pedretti, N., Garcia, M., Delwail, A., Bernard, F.-X., Nau, F., Guillet, G., Dagregorio, G., Yssel, H., et al. (2007). A role for T cell-derived interleukin 22 in psoriatic skin inflammation. *Clin. Exp. Immunol.* 150, 407–415.

Bouskra, D., Brézillon, C., Bérard, M., Werts, C., Varona, R., Boneca, I.G., and Eberl, G. (2008). Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. *Nature* 456, 507–510.

Brand, S., Beigel, F., Olszak, T., Zitzmann, K., Eichhorst, S.T., Otte, J.-M., Diepolder, H., Marquardt, A., Jagla, W., Popp, A., et al. (2006). IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 290, G827–G838.

Braun, J., and Sieper, J. (2007). Ankylosing spondylitis. *Lancet* 369, 1379–1390.

Broadhurst, M.J., Leung, J.M., Kashyap, V., McCune, J.M., Mahadevan, U., McKerrow, J.H., and Loke, P. (2010). IL-22⁺ CD4⁺ T cells are associated with therapeutic trichuris trichiura infection in an ulcerative colitis patient. *Sci. Transl. Med.* 2, 60ra88.

Brown, E.M., Sadarangani, M., and Finlay, B.B. (2013). The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine. *Nat. Immunol.* 14, 660–667.

Buonocore, S., Ahern, P.P., Uhlig, H.H., Ivanov, I.I., Littman, D.R., Maloy, K.J., and Powrie, F. (2010). Innate lymphoid cells drive interleukin-23-dependent innate intestinal pathology. *Nature* 464, 1371–1375.

Cai, Y., Fleming, C., and Yan, J. (2012). New insights of T cells in the pathogenesis of psoriasis. *Cell. Mol. Immunol.* 9, 302–309.

Cargill, M., Schrodi, S.J., Chang, M., Garcia, V.E., Brandon, R., Callis, K.P., Matsunami, N., Ardlie, K.G., Civello, D., Catanese, J.J., et al. (2007). A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes. *Am. J. Hum. Genet.* 80, 273–290.

Carrión, M., Juarranz, Y., Martínez, C., González-Álvaro, I., Pablos, J.L., Gutiérrez-Cañas, I., and Gomariz, R.P. (2013). IL-22/IL-22R1 axis and S100A8/A9 alarmins in human osteoarthritic and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 52, 2177–2186.

Carvalho, A., Giovannini, G., De Luca, A., D'Angelo, C., Casagrande, A., Iannitti, R.G., Ricci, G., Cunha, C., and Romani, L. (2012). Dectin-1 isoforms contribute to distinct Th1/Th17 cell activation in mucosal candidiasis. *Cell. Mol. Immunol.* 9, 276–286.

Cascão, R., Moura, R.A., Perpétuo, I., Canhão, H., Vieira-Sousa, E., Mourão, A.F., Rodrigues, A.M., Polido-Pereira, J., Queiroz, M.V., Rosário, H.S., et al. (2010). Identification of a cytokine network sustaining neutrophil and Th17 activation in untreated early rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 12, R196.

Cella, M., Fuchs, A., Vermi, W., Facchetti, F., Otero, K., Lennerz, J.K.M., 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.

Cheng, F., Guo, Z., Xu, H., Yan, D., and Li, Q. (2009). Decreased plasma IL22 levels, but not increased IL17 and IL23 levels, correlate with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* 68, 604–606.

Chestovich, P.J., Uchida, Y., Chang, W., Ajalat, M., Lassman, C., Sabat, R., Busuttill, R.W., and Kupiec-Weglinski, J.W. (2012). Interleukin-22: implications for liver ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 93, 485–492.

Chu, D.K., Jimenez-Saiz, R., Verschoor, C.P., Walker, T.D., Goncharova, S., Llop-Guevara, A., Shen, P., Gordon, M.E., Barra, N.G., Bassett, J.D., et al. (2014). Indigenous enteric eosinophils control DCs to initiate a primary Th2 immune response in vivo. *J. Exp. Med.* 211, 1657–1672.

Ciccía, F., Guggino, G., Rizzo, A., Ferrante, A., Raimondo, S., Giardina, A., Dieli, F., Campisi, G., Alessandro, R., and Triolo, G. (2011a). Potential involvement of IL-22 and IL-22-producing cells in the inflamed salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.*

Ciccía, F., Accardo-Palumbo, A., Alessandro, R., Rizzo, A., Principe, S., Peralta, S., Raiata, F., Giardina, A., De Leo, G., and Triolo, G. (2011b). Interleukin-22 and IL-22-producing NKp44(+) NK cells in the subclinical gut inflammation of patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.*

Ciccia, F., Giardina, A., Rizzo, A., Guggino, G., Cipriani, P., Carubbi, F., Giacomelli, R., and Triolo, G. (2013). Rituximab modulates the expression of IL-22 in the salivary glands of patients with primary Sjogren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* *72*, 782–783.

Colin, E.M., Asmawidjaja, P.S., van Hamburg, J.P., Mus, A.M.C., van Driel, M., Hazes, J.M.W., van Leeuwen, J.P.T.M., and Lubberts, E. (2010). 1,25-dihydroxyvitamin D3 modulates Th17 polarization and interleukin-22 expression by memory T cells from patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* *62*, 132–142.

Couturier, M., Lamarthée, B., Arbez, J., Renaud, J.-C., Bossard, C., Malard, F., Bonnefoy, F., Mohty, M., Perruche, S., Tiberghien, P., et al. (2013). IL-22 deficiency in donor T cells attenuates murine acute graft-versus-host disease mortality while sparing the graft-versus-leukemia effect. *Leuk. Off. J. Leuk. Soc. Am. Leuk. Res. Fund UK*.

Cox, J.H., Kljavin, N.M., Ota, N., Leonard, J., Roose-Girma, M., Diehl, L., Ouyang, W., and Ghilardi, N. (2011). Opposing consequences of IL-23 signaling mediated by innate and adaptive cells in chemically induced colitis in mice. *Mucosal Immunol.*

Crellin, N.K., Trifari, S., Kaplan, C.D., Satoh-Takayama, N., Di Santo, J.P., and Spits, H. (2010). Regulation of cytokine secretion in human CD127(+) LTi-like innate lymphoid cells by Toll-like receptor 2. *Immunity* *33*, 752–764.

Cupedo, T., Crellin, N.K., Papazian, N., Rombouts, E.J., Weijer, K., Grogan, J.L., Fibbe, W.E., Cornelissen, J.J., and Spits, H. (2009). Human fetal lymphoid tissue-inducer cells are interleukin 17-producing precursors to RORC+ CD127+ natural killer-like cells. *Nat. Immunol.* *10*, 66–74.

Dalmas, E., Venteclef, N., Caer, C., Poitou, C., Cremer, I., Aron-Wisnewsky, J., Lacroix-Desmazes, S., Bayry, J., Kaveri, S.V., Clément, K., et al. (2014). T cell-derived IL-22 amplifies IL-1 β -driven inflammation in human adipose tissue: relevance to obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* *63*, 1966–1977.

Dhiman, R., Indramohan, M., Barnes, P.F., Nayak, R.C., Paidipally, P., Rao, L.V.M., and Vankayalapati, R. (2009). IL-22 produced by human NK cells inhibits growth of *Mycobacterium tuberculosis* by enhancing phagolysosomal fusion. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *183*, 6639–6645.

Dhiman, R., Periasamy, S., Barnes, P.F., Jaiswal, A.G., Paidipally, P., Barnes, A.B., Tvinnereim, A., and Vankayalapati, R. (2012). NK1.1+ Cells and IL-22 Regulate Vaccine-Induced Protective Immunity against Challenge with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *189*, 897–905.

Dhiman, R., Venkatasubramanian, S., Paidipally, P., Barnes, P.F., Tvinnereim, A., and Vankayalapati, R. (2014). Interleukin 22 inhibits intracellular growth of *Mycobacterium tuberculosis* by enhancing calgranulin A expression. *J. Infect. Dis.* *209*, 578–587.

Diehl, G.E., Longman, R.S., Zhang, J.-X., Breart, B., Galan, C., Cuesta, A., Schwab, S.R., and Littman, D.R. (2013). Microbiota restricts trafficking of bacteria to mesenteric lymph nodes by CX(3)CR1(hi) cells. *Nature* *494*, 116–120.

Dinarello, C.A., Novick, D., Kim, S., and Kaplanski, G. (2013). Interleukin-18 and IL-18 binding protein. *Front. Immunol.* *4*, 289.

- Doisne, J.-M., Soulard, V., Bécourt, C., Amniai, L., Henrot, P., Havenar-Daughton, C., Blanchet, C., Zitvogel, L., Ryffel, B., Cavaillon, J.-M., et al. (2011). Cutting edge: crucial role of IL-1 and IL-23 in the innate IL-17 response of peripheral lymph node NK1.1- invariant NKT cells to bacteria. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *186*, 662–666.
- Dudakov, J.A., Hanash, A.M., Jenq, R.R., Young, L.F., Ghosh, A., Singer, N.V., West, M.L., Smith, O.M., Holland, A.M., Tsai, J.J., et al. (2012). Interleukin-22 drives endogenous thymic regeneration in mice. *Science* *336*, 91–95.
- 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.
- Duhen, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2009). Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat. Immunol.* *10*, 857–863.
- Dumoutier, L., Louahed, J., and Renauld, J.C. (2000a). Cloning and characterization of IL-10-related T cell-derived inducible factor (IL-TIF), a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *164*, 1814–1819.
- Dumoutier, L., Van Roost, E., Colau, D., and Renauld, J.C. (2000b). Human interleukin-10-related T cell-derived inducible factor: molecular cloning and functional characterization as an hepatocyte-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 10144–10149.
- Dumoutier, L., Lejeune, D., Colau, D., and Renauld, J.C. (2001). Cloning and characterization of IL-22 binding protein, a natural antagonist of IL-10-related T cell-derived inducible factor/IL-22. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *166*, 7090–7095.
- Dumoutier, L., de Meester, C., Tavernier, J., and Renauld, J.-C. (2009). New activation modus of STAT3: a tyrosine-less region of the interleukin-22 receptor recruits STAT3 by interacting with its coiled-coil domain. *J. Biol. Chem.* *284*, 26377–26384.
- Dyring-Andersen, B., Geisler, C., Agerbeck, C., Lauritsen, J.P.H., Gúdjonsdóttir, S.D., Skov, L., and Bonefeld, C.M. (2014). Increased number and frequency of group 3 innate lymphoid cells in nonlesional psoriatic skin. *Br. J. Dermatol.* *170*, 609–616.
- Eberl, G. (2012). Development and evolution of ROR γ t(+) cells in a microbe's world. *Immunol. Rev.* *245*, 177–188.
- Eken, A., Singh, A.K., Treuting, P.M., and Oukka, M. (2013). IL-23R(+) innate lymphoid cells induce colitis via interleukin-22-dependent mechanism. *Mucosal Immunol.*
- Elinav, E., Strowig, T., Kau, A.L., Henao-Mejia, J., Thaïss, C.A., Booth, C.J., Peaper, D.R., Bertin, J., Eisenbarth, S.C., Gordon, J.I., et al. (2011). NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell* *145*, 745–757.
- Eyerich, S., Eyerich, K., Pennino, D., Carbone, T., Nasorri, F., Pallotta, S., Cianfarani, F., Odorisio, T., Traidl-Hoffmann, C., Behrendt, H., et al. (2009). Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J. Clin. Invest.* *119*, 3573–3585.

- Eyerich, S., Wagener, J., Wenzel, V., Scarponi, C., Pennino, D., Albanesi, C., Schaller, M., Behrendt, H., Ring, J., Schmidt-Weber, C.B., et al. (2011). IL-22 and TNF- α represent a key cytokine combination for epidermal integrity during infection with *Candida albicans*. *Eur. J. Immunol.* *41*, 1894–1901.
- Fabbrini, E., Cella, M., McCartney, S.A., Fuchs, A., Abumrad, N.A., Pietka, T.A., Chen, Z., Finck, B.N., Han, D.H., Magkos, F., et al. (2013). Association between specific adipose tissue CD4⁺ T-cell populations and insulin resistance in obese individuals. *Gastroenterology* *145*, 366–374.e1–e3.
- 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.
- Feng, D., Kong, X., Weng, H., Park, O., Wang, H., Dooley, S., Gershwin, M.E., and Gao, B. (2012a). Interleukin-22 promotes proliferation of liver stem/progenitor cells in mice and patients with chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* *143*, 188–198.e7.
- Feng, D., Park, O., Radaeva, S., Wang, H., Yin, S., Kong, X., Zheng, M., Zakhari, S., Kolls, J.K., and Gao, B. (2012b). Interleukin-22 ameliorates cerulein-induced pancreatitis in mice by inhibiting the autophagic pathway. *Int. J. Biol. Sci.* *8*, 249–257.
- Feng, D., Wang, Y., Wang, H., Weng, H., Kong, X., Martin-Murphy, B.V., Li, Y., Park, O., Dooley, S., Ju, C., et al. (2014). Acute and Chronic Effects of IL-22 on Acetaminophen-Induced Liver Injury. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*.
- Van der Fits, L., Mourits, S., Voerman, J.S.A., 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. Baltim. Md 1950* *182*, 5836–5845.
- Fujita, H., Nogales, K.E., Kikuchi, T., Gonzalez, J., Carucci, J.A., and Krueger, J.G. (2009). Human Langerhans cells induce distinct IL-22-producing CD4⁺ T cells lacking IL-17 production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 21795–21800.
- Fukui, H., Zhang, X., Sun, C., Hara, K., Kikuchi, S., Yamasaki, T., Kondo, T., Tomita, T., Oshima, T., Watari, J., et al. (2014). IL-22 produced by cancer-associated fibroblasts promotes gastric cancer cell invasion via STAT3 and ERK signaling. *Br. J. Cancer* *111*, 763–771.
- Gaboriau-Routhiau, V., Rakotobe, S., Lécuyer, 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.
- Gaze, S., McSorley, H.J., Daveson, J., Jones, D., Bethony, J.M., Oliveira, L.M., Speare, R., McCarthy, J.S., Engwerda, C.R., Croese, J., et al. (2012). Characterising the mucosal and systemic immune responses to experimental human hookworm infection. *PLoS Pathog.* *8*, e1002520.

- Geboes, L., Dumoutier, L., Kelchtermans, H., Schurgers, E., Mitera, T., Renaud, J.-C., and Matthys, P. (2009). Proinflammatory role of the Th17 cytokine interleukin-22 in collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice. *Arthritis Rheum.* *60*, 390–395.
- Gelebart, P., Zak, Z., Dien-Bard, J., Anand, M., and Lai, R. (2011). Interleukin 22 signaling promotes cell growth in mantle cell lymphoma. *Transl. Oncol.* *4*, 9–19.
- Geremia, A., Arancibia-Cárcamo, C.V., Fleming, M.P.P., Rust, N., Singh, B., Mortensen, N.J., Travis, S.P.L., and Powrie, F. (2011). IL-23-responsive innate lymphoid cells are increased in inflammatory bowel disease. *J. Exp. Med.*
- Gessner, M.A., Werner, J.L., Lilly, L.M., Nelson, M.P., Metz, A.E., Dunaway, C.W., Chan, Y.R., Ouyang, W., Brown, G.D., Weaver, C.T., et al. (2012). Dectin-1-dependent interleukin-22 contributes to early innate lung defense against *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* *80*, 410–417.
- 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- β signalling. *Nature* *467*, 967–971.
- Gilliet, M., Conrad, C., Geiges, M., Cozzio, A., Thürlimann, 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.
- Gittler, J.K., Shemer, A., Suárez-Fariñas, M., Fuentes-Duculan, J., Gulewicz, K.J., Wang, C.Q.F., Mitsui, H., Cardinale, I., de Guzman Strong, C., Krueger, J.G., et al. (2012). Progressive activation of T(H)2/T(H)22 cytokines and selective epidermal proteins characterizes acute and chronic atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* *130*, 1344–1354.
- Glatzer, T., Killig, M., Meisig, J., Ommert, I., Luetke-Eversloh, M., Babic, M., Paclik, D., Blüthgen, N., Seidl, R., Seifarth, C., et al. (2013). ROR γ t(+) Innate Lymphoid Cells Acquire a Proinflammatory Program upon Engagement of the Activating Receptor NKp44. *Immunity*.
- Goto, M., Murakawa, M., Kadoshima-Yamaoka, K., Tanaka, Y., Nagahira, K., Fukuda, Y., and Nishimura, T. (2009). Murine NKT cells produce Th17 cytokine interleukin-22. *Cell. Immunol.* *254*, 81–84.
- Goto, Y., Obata, T., Kunisawa, J., Sato, S., Ivanov, I.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.
- Graham, A.C., Carr, K.D., Sieve, A.N., Indramohan, M., Break, T.J., and Berg, R.E. (2011). IL-22 production is regulated by IL-23 during *Listeria monocytogenes* infection but is not required for bacterial clearance or tissue protection. *PloS One* *6*, e17171.
- Gresnigt, M.S., Becker, K.L., Smeekens, S.P., Jacobs, C.W.M., Joosten, L.A.B., van der Meer, J.W.M., Netea, M.G., and van de Veerdonk, F.L. (2013). *Aspergillus fumigatus*-induced IL-22 is not restricted to a specific Th cell subset and is dependent on complement receptor 3. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *190*, 5629–5639.
- Grivennikov, S.I., Greten, F.R., and Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* *140*, 883–899.

- Gruenberg, B.H., Schoenemeyer, A., Weiss, B., Toschi, L., Kunz, S., Wolk, K., Asadullah, K., and Sabat, R. (2001). A novel, soluble homologue of the human IL-10 receptor with preferential expression in placenta. *Genes Immun.* 2, 329–334.
- Guilloteau, K., Paris, I., Pedretti, N., Boniface, K., Juchaux, F., Huguier, V., Guillet, G., Bernard, F.-X., Lecron, J.-C., and Morel, F. (2010). Skin Inflammation Induced by the Synergistic Action of IL-17A, IL-22, Oncostatin M, IL-1 α , and TNF- α Recapitulates Some Features of Psoriasis. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950.
- Guo, H., and Topham, D.J. (2010). Interleukin-22 (IL-22) production by pulmonary Natural Killer cells and the potential role of IL-22 during primary influenza virus infection. *J. Virol.* 84, 7750–7759.
- Guo, X., Qiu, J., Tu, T., Yang, X., Deng, L., Anders, R.A., Zhou, L., and Fu, Y.-X. (2014). Induction of Innate Lymphoid Cell-Derived Interleukin-22 by the Transcription Factor STAT3 Mediates Protection against Intestinal Infection. *Immunity* 40, 25–39.
- Hamada, H., Garcia-Hernandez, M. de la 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. Baltim. Md* 1950 182, 3469–3481.
- Van Hamburg, J.P., Corneth, O.B.J., Paulissen, S.M.J., Davelaar, N., Asmawidjaja, P.S., Mus, A.M.C., and Lubberts, E. (2013). IL-17/Th17 mediated synovial inflammation is IL-22 independent. *Ann. Rheum. Dis.* 72, 1700–1707.
- Hanash, A.M., Dudakov, J.A., Hua, G., O'Connor, M.H., Young, L.F., Singer, N.V., West, M.L., Jenq, R.R., Holland, A.M., Kappel, L.W., et al. (2012). Interleukin-22 Protects Intestinal Stem Cells from Immune-Mediated Tissue Damage and Regulates Sensitivity to Graft versus Host Disease. *Immunity* 37, 339–350.
- 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.
- Hayashida, S., Uchi, H., Takeuchi, S., Esaki, H., Moroi, Y., and Furue, M. (2011). Significant correlation of serum IL-22 levels with CCL17 levels in atopic dermatitis. *J. Dermatol. Sci.* 61, 78–79.
- Hijnen, D., Knol, E.F., Gent, Y.Y., Giovannone, B., Beijm, S.J.P., Kupper, T.S., Bruijnzeel-Koomen, C.A.F.M., and Clark, R.A. (2013). CD8(+) T cells in the lesional skin of atopic dermatitis and psoriasis patients are an important source of IFN- γ , IL-13, IL-17, and IL-22. *J. Invest. Dermatol.* 133, 973–979.
- Hinrichs, C.S., and Rosenberg, S.A. (2014). Exploiting the curative potential of adoptive T-cell therapy for cancer. *Immunol. Rev.* 257, 56–71.
- 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.

- Hoegl, S., Bachmann, M., Scheiermann, P., Goren, I., Hofstetter, C., Pfeilschifter, J., Zwissler, B., and Muhl, H. (2011). Protective properties of inhaled IL-22 in a model of ventilator-induced lung injury. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *44*, 369–376.
- Huber, S., Gagliani, N., Zenewicz, L.A., Huber, F.J., Bosurgi, L., Hu, B., Hedl, M., Zhang, W., O'Connor, W., Jr, Murphy, A.J., et al. (2012). IL-22BP is regulated by the inflammasome and modulates tumorigenesis in the intestine. *Nature* *491*, 259–263.
- Hueber, W., Patel, D.D., Dryja, T., Wright, A.M., Koroleva, I., Bruin, G., Antoni, C., Draelos, Z., Gold, M.H., Psoriasis Study Group, et al. (2010). Effects of AIN457, a fully human antibody to interleukin-17A, on psoriasis, rheumatoid arthritis, and uveitis. *Sci. Transl. Med.* *2*, 52ra72.
- Hughes, T., Becknell, B., Freud, A.G., McClory, S., Briercheck, E., Yu, J., Mao, C., Giovenzana, C., Nuovo, G., Wei, L., et al. (2010). Interleukin-1beta selectively expands and sustains interleukin-22+ immature human natural killer cells in secondary lymphoid tissue. *Immunity* *32*, 803–814.
- Hutter, C., Kauer, M., Simonitsch-Klupp, I., Jug, G., Schwentner, R., Leitner, J., Bock, P., Steinberger, P., Bauer, W., Carlesso, N., et al. (2012). Notch is active in Langerhans cell histiocytosis and confers pathognomonic features on dendritic cells. *Blood* *120*, 5199–5208.
- Ikeuchi, H., Kuroiwa, T., Hiramatsu, N., Kaneko, Y., Hiromura, K., Ueki, K., and Nojima, Y. (2005). Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis: potential role as a proinflammatory cytokine. *Arthritis Rheum.* *52*, 1037–1046.
- Ito, M., Teshima, K., Ikeda, S., Kitadate, A., Watanabe, A., Nara, M., Yamashita, J., Ohshima, K., Sawada, K., and Tagawa, H. (2014). MicroRNA-150 inhibits tumor invasion and metastasis by targeting the chemokine receptor CCR6, in advanced cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* *123*, 1499–1511.
- Ivanov, I.I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E.L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K.C., Santee, C.A., Lynch, S.V., et al. (2009). Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* *139*, 485–498.
- Ivanov, S., Rensson, J., Fontaine, J., Barthelemy, A., Paget, C., Fernandez, E.M., Blanc, F., De Trez, C., Van Maele, L., Dumoutier, L., et al. (2013). Interleukin-22 reduces lung inflammation during influenza A virus infection and protects against secondary bacterial infection. *J. Virol.* *87*, 6911–6924.
- Janakiram, N.B., Mohammed, A., Bryant, T., Brewer, M., Biddick, L., Lightfoot, S., Lang, M.L., and Rao, C.V. (2014). Adoptive transfer of regulatory T cells promotes intestinal tumorigenesis and is associated with decreased NK cells and IL-22 binding protein. *Mol. Carcinog.*
- Jiang, R., Tan, Z., Deng, L., Chen, Y., Xia, Y., Gao, Y., Wang, X., and Sun, B. (2011). Interleukin-22 promotes human hepatocellular carcinoma by activation of STAT3. *Hepatology* *54*, 900–909.
- Jiang, R., Wang, H., Deng, L., Hou, J., Shi, R., Yao, M., Gao, Y., Yao, A., Wang, X., Yu, L., et al. (2013). IL-22 is related to development of human colon cancer by activation of STAT3. *BMC Cancer* *13*, 59.

- Jones, B.C., Logsdon, N.J., and Walter, M.R. (2008). Structure of IL-22 bound to its high-affinity IL-22R1 chain. *Struct. Lond. Engl.* 1993 *16*, 1333–1344.
- Kagami, S., Rizzo, H.L., Kurtz, S.E., Miller, L.S., and Blauvelt, A. (2010a). IL-23 and IL-17A, but not IL-12 and IL-22, are required for optimal skin host defense against *Candida albicans*. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *185*, 5453–5462.
- Kagami, S., Rizzo, H.L., Lee, J.J., Koguchi, Y., and Blauvelt, A. (2010b). Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are increased in psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* *130*, 1373–1383.
- Kamada, N., Hisamatsu, T., Okamoto, S., Chinen, H., Kobayashi, T., Sato, T., Sakuraba, A., Kitazume, M.T., Sugita, A., Koganei, K., et al. (2008). Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN-gamma axis. *J. Clin. Invest.* *118*, 2269–2280.
- Kamada, N., Seo, S.-U., Chen, G.Y., and Núñez, G. (2013). Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 321–335.
- Kamanaka, M., Huber, S., Zenewicz, L.A., Gagliani, N., Rathinam, C., O'Connor, W., Jr, Wan, Y.Y., Nakae, S., Iwakura, Y., Hao, L., et al. (2011). Memory/effector (CD45RB(lo)) CD4 T cells are controlled directly by IL-10 and cause IL-22-dependent intestinal pathology. *J. Exp. Med.* *208*, 1027–1040.
- Kaser, A., Zeissig, S., and Blumberg, R.S. (2010). Inflammatory bowel disease. *Annu. Rev. Immunol.* *28*, 573–621.
- Ke, Y., Sun, D., Jiang, G., Kaplan, H.J., and Shao, H. (2011). IL-22-Induced Regulatory CD11b⁺ APCs Suppress Experimental Autoimmune Uveitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*.
- Khattari, S., Shemer, A., Rozenblit, M., Dhingra, N., Czarnowicki, T., Finney, R., Gilleaudeau, P., Sullivan-Whalen, M., Zheng, X., Xu, H., et al. (2014). Cyclosporine in patients with atopic dermatitis modulates activated inflammatory pathways and reverses epidermal pathology. *J. Allergy Clin. Immunol.* *133*, 1626–1634.
- Ki, S.H., Park, O., Zheng, M., Morales-Ibanez, O., Kolls, J.K., Bataller, R., and Gao, B. (2010). Interleukin-22 treatment ameliorates alcoholic liver injury in a murine model of chronic-binge ethanol feeding: role of signal transducer and activator of transcription 3. *Hepatology. Baltim. Md* *52*, 1291–1300.
- Kim, K.-W., Kim, H.-R., Park, J.-Y., Park, J.-S., Oh, H.-J., Woo, Y.-J., Park, M.-K., Cho, M.-L., and Lee, S.-H. (2011). IL-22 promotes osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis through induction of RANKL in human synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.*
- Kim, S., Faris, L., Cox, C.M., Sumners, L.H., Jenkins, M.C., Fetterer, R.H., Miska, K.B., and Dalloul, R.A. (2012). Molecular characterization and immunological roles of avian IL-22 and its soluble receptor IL-22 binding protein. *Cytokine.*
- Kinnebrew, M.A., Ubeda, C., Zenewicz, L.A., Smith, N., Flavell, R.A., and Pamer, E.G. (2010). Bacterial flagellin stimulates Toll-like receptor 5-dependent defense against vancomycin-resistant *Enterococcus* infection. *J. Infect. Dis.* *201*, 534–543.

- Kinnebrew, M.A., Buffie, C.G., Diehl, G.E., Zenewicz, L.A., Leiner, I., Hohl, T.M., Flavell, R.A., Littman, D.R., and Pamer, E.G. (2012). Interleukin 23 production by intestinal CD103(+)CD11b(+) dendritic cells in response to bacterial flagellin enhances mucosal innate immune defense. *Immunity* 36, 276–287.
- Kirchberger, S., Royston, D.J., Boulard, O., Thornton, E., Franchini, F., Szabady, R.L., Harrison, O., and Powrie, F. (2013). Innate lymphoid cells sustain colon cancer through production of interleukin-22 in a mouse model. *J. Exp. Med.* 210, 917–931.
- Kisand, K., Bøe Wolff, A.S., Podkrajsek, K.T., Tserel, L., Link, M., Kisand, K.V., Ersvaer, E., Perheentupa, J., Erichsen, M.M., Bratanic, N., et al. (2010). Chronic mucocutaneous candidiasis in APECED or thymoma patients correlates with autoimmunity to Th17-associated cytokines. *J. Exp. Med.* 207, 299–308.
- 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., Boniface, K., Sadekova, S., Grein, J., Murphy, E.E., Turner, S.P., Raskin, L., Desai, B., Faubion, W.A., de Waal Malefyt, R., et al. (2009). Circulating and gut-resident human Th17 cells express CD161 and promote intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* 206, 525–534.
- Klose, C.S.N., Kiss, E.A., Schwierzeck, V., Ebert, K., Hoyler, T., d' Hargues, Y., Göppert, N., Croxford, A.L., Waisman, A., Tanriver, Y., et al. (2013). A T-bet gradient controls the fate and function of CCR6-ROR γ t⁺ innate lymphoid cells. *Nature* 494, 261–265.
- Klose, C.S.N., Flach, M., Möhle, L., Rogell, L., Hoyler, T., Ebert, K., Fabiunke, C., Pfeifer, D., Sexl, V., Fonseca-Pereira, D., et al. (2014). Differentiation of type 1 ILCs from a common progenitor to all helper-like innate lymphoid cell lineages. *Cell* 157, 340–356.
- Kobold, S., Völk, S., Clauditz, T., Küpper, N.J., Minner, S., Tufman, A., Düwell, P., Lindner, M., Koch, I., Heidegger, S., et al. (2013). Interleukin-22 Is Frequently Expressed in Small- and Large-Cell Lung Cancer and Promotes Growth in Chemotherapy-Resistant Cancer Cells. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* 8, 1032–1042.
- Kong, X., Feng, D., Wang, H., Hong, F., Bertola, A., Wang, F.-S., and Gao, B. (2012). Interleukin-22 induces hepatic stellate cell senescence and restricts liver fibrosis in mice. *Hepatology* 56, 1150–1159.
- Korn, L.L., Thomas, H.L., Hubbeling, H.G., Spencer, S.P., Sinha, R., Simkins, H.M., Salzman, N.H., Bushman, F.D., and Laufer, T.M. (2014). Conventional CD4⁺ T cells regulate IL-22-producing intestinal innate lymphoid cells. *Mucosal Immunol.*
- Kotenko, S.V., Izotova, L.S., Mirochnitchenko, O.V., Esterova, E., Dickensheets, H., Donnelly, R.P., and Pestka, S. (2001a). Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: the IL-10R2 chain (IL-10Rbeta) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes. *J. Biol. Chem.* 276, 2725–2732.
- Kotenko, S.V., Izotova, L.S., Mirochnitchenko, O.V., Esterova, E., Dickensheets, H., Donnelly, R.P., and Pestka, S. (2001b). Identification, cloning, and characterization of a novel

soluble receptor that binds IL-22 and neutralizes its activity. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 *166*, 7096–7103.

Kreymborg, K., Etzensperger, R., Dumoutier, L., Haak, S., Rebollo, A., Buch, T., Heppner, F.L., Renaud, 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. Baltim. Md* 1950 *179*, 8098–8104.

Kryczek, I., Wei, S., Vatan, L., Escara-Wilke, J., Szeliga, W., Keller, E.T., and Zou, W. (2007). Cutting edge: opposite effects of IL-1 and IL-2 on the regulation of IL-17+ T cell pool IL-1 subverts IL-2-mediated suppression. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 *179*, 1423–1426.

Kryczek, I., Lin, Y., Nagarsheth, N., Peng, D., Zhao, L., Zhao, E., Vatan, L., Szeliga, W., Dou, Y., Owens, S., et al. (2014). IL-22(+)CD4(+) T cells promote colorectal cancer stemness via STAT3 transcription factor activation and induction of the methyltransferase DOT1L. *Immunity* *40*, 772–784.

Kulkarni, O.P., Hartter, I., Mulay, S.R., Hagemann, J., Darisipudi, M.N., Kumar Vr, S., Romoli, S., Thomasova, D., Ryu, M., Kobold, S., et al. (2014). Toll-Like Receptor 4-Induced IL-22 Accelerates Kidney Regeneration. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN*.

Kumar, P., Thakar, M.S., Ouyang, W., and Malarkannan, S. (2012). IL-22 from conventional NK cells is epithelial regenerative and inflammation protective during influenza infection. *Mucosal Immunol*.

Kumari, S., Bonnet, M.C., Ulvmar, M.H., Wolk, K., Karagianni, N., Witte, E., Uthoff-Hachenberg, C., Renaud, J.-C., Kollias, G., Toftgard, R., et al. (2013). Tumor necrosis factor receptor signaling in keratinocytes triggers interleukin-24-dependent psoriasis-like skin inflammation in mice. *Immunity* *39*, 899–911.

Laaksonen, H., Guerreiro-Cacais, A.O., Adzemovic, M.Z., Parsa, R., Zeitelhofer, M., Jagodic, M., and Olsson, T. (2014). The multiple sclerosis risk gene IL22RA2 contributes to a more severe murine autoimmune neuroinflammation. *Genes Immun*.

Lavoie, T.N., Stewart, C.M., Berg, K.M., Li, Y., and Nguyen, C.Q. (2011). Expression of interleukin-22 in Sjögren's syndrome: significant correlation with disease parameters. *Scand. J. Immunol*.

Lee, J.J., Jacobsen, E.A., Ochkur, S.I., McGarry, M.P., Condjella, R.M., Doyle, A.D., Luo, H., Zellner, K.R., Protheroe, C.A., Willetts, L., et al. (2012). Human versus mouse eosinophils: “that which we call an eosinophil, by any other name would stain as red.” *J. Allergy Clin. Immunol.* *130*, 572–584.

Lee, J.S., Cella, M., McDonald, K.G., Garlanda, C., Kennedy, G.D., Nukaya, M., Mantovani, A., Kopan, R., Bradfield, C.A., Newberry, R.D., et al. (2011). AHR drives the development of gut ILC22 cells and postnatal lymphoid tissues via pathways dependent on and independent of Notch. *Nat. Immunol*.

Lee, Y., Kumagai, Y., Jang, M.S., Kim, J.-H., Yang, B.-G., Lee, E.-J., Kim, Y.-M., Akira, S., and Jang, M.H. (2013). Intestinal Lin⁻ c-Kit⁺ NKp46⁻ CD4⁻ population strongly produces IL-22 upon IL-1 β stimulation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 *190*, 5296–5305.

- Leipe, J., Schramm, M.A., Grunke, M., Baeuerle, M., Dechant, C., Nigg, A.P., Witt, M.N., Vielhauer, V., Reindl, C.S., Schulze-Koops, H., et al. (2011). Interleukin 22 serum levels are associated with radiographic progression in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*
- Leipe, J., Schramm, M.A., Prots, I., Schulze-Koops, H., and Skapenko, A. (2014). Increased Th17 cell frequency and poor clinical outcome in rheumatoid arthritis are associated with a genetic variant in the IL4R gene, rs1805010. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* 66, 1165–1175.
- Lejeune, D., Dumoutier, L., Constantinescu, S., Kruijer, W., Schuringa, J.J., and Renauld, J.-C. (2002). Interleukin-22 (IL-22) activates the JAK/STAT, ERK, JNK, and p38 MAP kinase pathways in a rat hepatoma cell line. Pathways that are shared with and distinct from IL-10. *J. Biol. Chem.* 277, 33676–33682.
- Leonardi, C., Matheson, R., Zachariae, C., Cameron, G., Li, L., Edson-Heredia, E., Braun, D., and Banerjee, S. (2012). Anti-interleukin-17 monoclonal antibody ixekizumab in chronic plaque psoriasis. *N. Engl. J. Med.* 366, 1190–1199.
- Leung, J.M., Davenport, M., Wolff, M.J., Wiens, K.E., Abidi, W.M., Poles, M.A., Cho, I., Ullman, T., Mayer, L., and Loke, P. (2013). IL-22-producing CD4+ cells are depleted in actively inflamed colitis tissue. *Mucosal Immunol.*
- 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.
- Liang, S.C., Nickerson-Nutter, C., Pittman, D.D., Carrier, Y., Goodwin, D.G., Shields, K.M., Lambert, A.-J., Schelling, S.H., Medley, Q.G., Ma, H.-L., et al. (2010). IL-22 induces an acute-phase response. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 185, 5531–5538.
- Lin, J., Yue, L.H., and Chen, W.Q. (2014). Decreased plasma IL-22 levels and correlations with IL-22-producing T helper cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus. *Scand. J. Immunol.* 79, 131–136.
- Liu, T., Peng, L., Yu, P., Zhao, Y., Shi, Y., Mao, X., Chen, W., Cheng, P., Wang, T., Chen, N., et al. (2012). Increased circulating Th22 and Th17 cells are associated with tumor progression and patient survival in human gastric cancer. *J. Clin. Immunol.* 32, 1332–1339.
- Liu, Y., Yang, B., Ma, J., Wang, H., Huang, F., Zhang, J., Chen, H., and Wu, C. (2011). Interleukin-21 induces the differentiation of human Tc22 cells via phosphorylation of signal transducers and activators of transcription. *Immunology* 132, 540–548.
- Loftus, E.V., Jr (2004). Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 126, 1504–1517.
- Logsdon, N.J., Jones, B.C., Josephson, K., Cook, J., and Walter, M.R. (2002). Comparison of interleukin-22 and interleukin-10 soluble receptor complexes. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* 22, 1099–1112.
- Logsdon, N.J., Jones, B.C., Allman, J.C., Izotova, L., Schwartz, B., Pestka, S., and Walter, M.R. (2004). The IL-10R2 binding hot spot on IL-22 is located on the N-terminal helix and is dependent on N-linked glycosylation. *J. Mol. Biol.* 342, 503–514.

- Longman, R.S., Diehl, G.E., Victorio, D.A., Huh, J.R., Galan, C., Miraldi, E.R., Swaminath, A., Bonneau, R., Scherl, E.J., and Littman, D.R. (2014). CX3CR1⁺ mononuclear phagocytes support colitis-associated innate lymphoid cell production of IL-22. *J. Exp. Med.* *211*, 1571–1583.
- Lowes, M.A., Suárez-Fariñas, M., and Krueger, J.G. (2014). Immunology of psoriasis. *Annu. Rev. Immunol.* *32*, 227–255.
- Luan, L., Ding, Y., Han, S., Zhang, Z., and Liu, X. (2014). An increased proportion of circulating Th22 and Tc22 cells in psoriasis. *Cell. Immunol.* *290*, 196–200.
- De Luca, A., Zelante, T., D'Angelo, C., Zagarella, S., Fallarino, F., Spreca, A., Iannitti, R.G., Bonifazi, P., Renaud, J.-C., Bistoni, F., et al. (2010). IL-22 defines a novel immune pathway of antifungal resistance. *Mucosal Immunol.* *3*, 361–373.
- De Luca, A., Carvalho, A., Cunha, C., Iannitti, R.G., Pitzurra, L., Giovannini, G., Mencacci, A., Bartolommei, L., Moretti, S., Massi-Benedetti, C., et al. (2013). IL-22 and IDO1 affect immunity and tolerance to murine and human vaginal candidiasis. *PLoS Pathog.* *9*, e1003486.
- Luci, C., Reynders, A., Ivanov, I.I., Cagnet, C., Chiche, L., Chasson, L., Hardwigsen, J., Anguiano, E., Banchereau, J., Chaussabel, D., et al. (2009). Influence of the transcription factor ROR γ on the development of Nkp46⁺ cell populations in gut and skin. *Nat. Immunol.* *10*, 75–82.
- Ma, H.-L., Liang, S., Li, J., Napierata, L., Brown, T., Benoit, S., Senices, M., Gill, D., Dunussi-Joannopoulos, K., Collins, M., et al. (2008). IL-22 is required for Th17 cell-mediated pathology in a mouse model of psoriasis-like skin inflammation. *J. Clin. Invest.* *118*, 597–607.
- 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 psoriasiform dermatitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *187*, 5026–5031.
- Van Maele, L., Carnoy, C., Cayet, D., Ivanov, S., Porte, R., Deruy, E., Chabalgoity, J.A., Renaud, J.-C., Eberl, G., Benecke, A.G., et al. (2014). Activation of Type 3 Innate Lymphoid Cells and Interleukin 22 Secretion in the Lungs During *Streptococcus pneumoniae* Infection. *J. Infect. Dis.* *210*, 493–503.
- 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 ROR γ . *Nat. Immunol.* *9*, 641–649.
- Manta, C., Heupel, E., Radulovic, K., Rossini, V., Garbi, N., Riedel, C.U., and Niess, J.H. (2012). CX(3)CR1(+) macrophages support IL-22 production by innate lymphoid cells during infection with *Citrobacter rodentium*. *Mucosal Immunol.*
- Marchesi, F., Martin, A.P., Thirunarayanan, N., Devany, E., Mayer, L., Grisotto, M.G., Furtado, G.C., and Lira, S.A. (2009). CXCL13 expression in the gut promotes accumulation of IL-22-producing lymphoid tissue-inducer cells, and formation of isolated lymphoid follicles. *Mucosal Immunol.* *2*, 486–494.

- Marijnissen, R.J., Koenders, M.I., Smeets, R.L., Stappers, M.H.T., Nickerson-Nutter, C., Joosten, L.A.B., Boots, A.M.H., and van den Berg, W.B. (2011). Increased IL-22 expression by synovial Th17 cells during late stages of arthritis is controlled by IL-1 and enhances bone degradation. *Arthritis Rheum.*
- McInnes, I.B., Kavanaugh, A., Gottlieb, A.B., Puig, L., Rahman, P., Ritchlin, C., Brodmerkel, C., Li, S., Wang, Y., Mendelsohn, A.M., et al. (2013). Efficacy and safety of ustekinumab in patients with active psoriatic arthritis: 1 year results of the phase 3, multicentre, double-blind, placebo-controlled PSUMMIT 1 trial. *Lancet* 382, 780–789.
- Mebius, R.E. (2003). Organogenesis of lymphoid tissues. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 292–303.
- Meng, F., Wang, K., Aoyama, T., Grivennikov, S.I., Paik, Y., Scholten, D., Cong, M., Iwaisako, K., Liu, X., Zhang, M., et al. (2012). Interleukin-17 signaling in inflammatory, Kupffer cells, and hepatic stellate cells exacerbates liver fibrosis in mice. *Gastroenterology* 143, 765–776.e1–e3.
- Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., and Mortha, A. (2013). The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 563–604.
- Mielke, L.A., Groom, J.R., Rankin, L.C., Seillet, C., Masson, F., Putoczki, T., and Belz, G.T. (2013a). TCF-1 controls ILC2 and NKp46+ROR γ t+ innate lymphocyte differentiation and protection in intestinal inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 191, 4383–4391.
- Mielke, L.A., Jones, S.A., Raverdeau, M., Higgs, R., Stefanska, A., Groom, J.R., Misiak, A., Dungan, L.S., Sutton, C.E., Streubel, G., et al. (2013b). Retinoic acid expression associates with enhanced IL-22 production by $\gamma\delta$ T cells and innate lymphoid cells and attenuation of intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* 210, 1117–1124.
- Mitra, A., Raychaudhuri, S.K., and Raychaudhuri, S.P. (2012a). IL-22 induced cell proliferation is regulated by PI3K/Akt/mTOR signaling cascade. *Cytokine* 60, 38–42.
- Mitra, A., Raychaudhuri, S.K., and Raychaudhuri, S.P. (2012b). Functional role of IL-22 in psoriatic arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 14, R65.
- Miyagaki, T., Sugaya, M., Suga, H., Kamata, M., Ohmatsu, H., Fujita, H., Asano, Y., Tada, Y., Kadono, T., and Sato, S. (2011). IL-22, but not IL-17, dominant environment in cutaneous T-cell lymphoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 17, 7529–7538.
- Monteleone, I., Rizzo, A., Sarra, M., Sica, G., Sileri, P., Biancone, L., Macdonald, T.T., Pallone, F., and Monteleone, G. (2011). Aryl Hydrocarbon Receptor-Induced Signals Up-regulate IL-22 Production and Inhibit Inflammation in the Gastrointestinal Tract. *Gastroenterology*.
- Monteleone, I., Pallone, F., and Monteleone, G. (2013). Aryl hydrocarbon receptor and colitis. *Semin. Immunopathol.* 35, 671–675.
- 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*.

- De Moura, P.R., Watanabe, L., Bleicher, L., Colau, D., Dumoutier, L., Lemaire, M.M., Renaud, J.-C., and Polikarpov, I. (2009). Crystal structure of a soluble decoy receptor IL-22BP bound to interleukin-22. *FEBS Lett.* 583, 1072–1077.
- Muñoz, M., Heimesaat, M.M., Danker, K., Struck, D., Lohmann, U., Plickert, R., Bereswill, S., Fischer, A., Dunay, I.R., Wolk, K., et al. (2009). Interleukin (IL)-23 mediates *Toxoplasma gondii*-induced immunopathology in the gut via matrixmetalloproteinase-2 and IL-22 but independent of IL-17. *J. Exp. Med.* 206, 3047–3059.
- Mus, A.M.C., Cornelissen, F., Asmawidjaja, P.S., van Hamburg, J.P., Boon, L., Hendriks, R.W., and Lubberts, E. (2010). Interleukin-23 promotes Th17 differentiation by inhibiting T-bet and FoxP3 and is required for elevation of interleukin-22, but not interleukin-21, in autoimmune experimental arthritis. *Arthritis Rheum.* 62, 1043–1050.
- Nagalakshmi, M.L., Murphy, E., McClanahan, T., and de Waal Malefyt, R. (2004). Expression patterns of IL-10 ligand and receptor gene families provide leads for biological characterization. *Int. Immunopharmacol.* 4, 577–592.
- Nagem, R.A.P., Colau, D., Dumoutier, L., Renaud, J.-C., Ogata, C., and Polikarpov, I. (2002). Crystal structure of recombinant human interleukin-22. *Struct. Lond. Engl.* 10, 1051–1062.
- Nakajima, T., Matsumoto, K., Suto, H., Tanaka, K., Ebisawa, M., Tomita, H., Yuki, K., Katsunuma, T., Akasawa, A., Hashida, R., et al. (2001). Gene expression screening of human mast cells and eosinophils using high-density oligonucleotide probe arrays: abundant expression of major basic protein in mast cells. *Blood* 98, 1127–1134.
- Nakamura, Y., Oscherwitz, J., Cease, K.B., Chan, S.M., Muñoz-Planillo, R., Hasegawa, M., Villaruz, A.E., Cheung, G.Y.C., McGavin, M.J., Travers, J.B., et al. (2013). Staphylococcus δ -toxin induces allergic skin disease by activating mast cells. *Nature* 503, 397–401.
- Nascimento, M., Huang, S.C., Smith, A., Everts, B., Lam, W., Bassity, E., Gautier, E.L., Randolph, G.J., and Pearce, E.J. (2014). Ly6Chi Monocyte Recruitment Is Responsible for Th2 Associated Host-Protective Macrophage Accumulation in Liver Inflammation due to Schistosomiasis. *PLoS Pathog.* 10, e1004282.
- Ness-Schwickerath, K.J., Jin, C., and Morita, C.T. (2010). Cytokine requirements for the differentiation and expansion of IL-17A- and IL-22-producing human V γ 2V δ 2 T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 184, 7268–7280.
- Neufert, C., Plickert, G., Zheng, Y., Wittkopf, N., Warntjen, M., Nikolaev, A., Ouyang, W., Neurath, M.F., and Becker, C. (2010). Activation of epithelial STAT3 regulates intestinal homeostasis. *Cell Cycle Georget. Tex* 9, 652–655.
- Niebuhr, M., Scharonow, H., Gathmann, M., Mamerow, D., and Werfel, T. (2010). Staphylococcal exotoxins are strong inducers of IL-22: A potential role in atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 126, 1176–1183.e4.
- Nikamo, P., Cheuk, S., Lysell, J., Enerbäck, C., Bergh, K., Xu Landén, N., Eidsmo, L., and Ståhle, M. (2014). Genetic variants of the IL22 promoter associate to onset of psoriasis before puberty and increased IL-22 production in T cells. *J. Invest. Dermatol.* 134, 1535–1541.

- Nogralles, K.E., Zaba, L.C., Guttman-Yassky, E., Fuentes-Duculan, J., Suárez-Fariñas, M., Cardinale, I., Khatcherian, A., Gonzalez, J., Pierson, K.C., White, T.R., et al. (2008). Th17 cytokines interleukin (IL)-17 and IL-22 modulate distinct inflammatory and keratinocyte-response pathways. *Br. J. Dermatol.* *159*, 1092–1102.
- Nogralles, K.E., Zaba, L.C., Shemer, A., Fuentes-Duculan, J., Cardinale, I., Kikuchi, T., Ramon, M., Bergman, R., Krueger, J.G., and Guttman-Yassky, E. (2009). IL-22-producing “T22” T cells account for upregulated IL-22 in atopic dermatitis despite reduced IL-17-producing TH17 T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* *123*, 1244–1252.e2.
- 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.
- De Oliveira Neto, M., Ferreira, J.R., Colau, D., Fischer, H., Nascimento, A.S., Craievich, A.F., Dumoutier, L., Renauld, J.-C., and Polikarpov, I. (2008). Interleukin-22 forms dimers that are recognized by two interleukin-22R1 receptor chains. *Biophys. J.* *94*, 1754–1765.
- Ortega, C., Fernández-A, S., Carrillo, J.M., Romero, P., Molina, I.J., Moreno, J.C., and Santamaría, M. (2009). IL-17-producing CD8+ T lymphocytes from psoriasis skin plaques are cytotoxic effector cells that secrete Th17-related cytokines. *J. Leukoc. Biol.* *86*, 435–443.
- Ota, N., Wong, K., Valdez, P.A., Zheng, Y., Crellin, N.K., Diehl, L., and Ouyang, W. (2011). IL-22 bridges the lymphotoxin pathway with the maintenance of colonic lymphoid structures during infection with *Citrobacter rodentium*. *Nat. Immunol.*
- Ouyang, W., Rutz, S., Crellin, N.K., Valdez, P.A., and Hymowitz, S.G. (2010). Regulation and Functions of IL-10 Family Cytokines in Inflammation and Diseases. *Annu. Rev. Immunol.*
- Paget, C., Ivanov, S., Fontaine, J., Renneson, J., Blanc, F., Pichavant, M., Dumoutier, L., Ryffel, B., Renauld, J.C., Gosset, P., et al. (2012). Interleukin-22 is produced by invariant natural killer T lymphocytes during influenza A virus infection: potential role in protection against lung epithelial damage. *J. Biol. Chem.*
- Pan, H., Hong, F., Radaeva, S., and Gao, B. (2004). Hydrodynamic gene delivery of interleukin-22 protects the mouse liver from concanavalin A-, carbon tetrachloride-, and Fas ligand-induced injury via activation of STAT3. *Cell. Mol. Immunol.* *1*, 43–49.
- Pan, H.-F., Zhao, X.-F., Yuan, H., Zhang, W.-H., Li, X.-P., Wang, G.-H., Wu, G.-C., Tang, X.-W., Li, W.-X., Li, L.-H., et al. (2009). Decreased serum IL-22 levels in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* *401*, 179–180.
- Pantelyushin, S., Haak, S., Ingold, B., Kulig, P., Heppner, F.L., Navarini, A.A., and Becher, B. (2012). Ror γ t+ innate lymphocytes and $\gamma\delta$ T cells initiate psoriasiform plaque formation in mice. *J. Clin. Invest.* *122*, 2252–2256.
- Papp, K.A., Langley, R.G., Lebwohl, M., Krueger, G.G., Szapary, P., Yeilding, N., Guzzo, C., Hsu, M.-C., Wang, Y., Li, S., et al. (2008). Efficacy and safety of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with psoriasis: 52-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial (PHOENIX 2). *Lancet* *371*, 1675–1684.

- Papp, K.A., Leonardi, C., Menter, A., Ortonne, J.-P., Krueger, J.G., Kricorian, G., Aras, G., Li, J., Russell, C.B., Thompson, E.H.Z., et al. (2012). Brodalumab, an anti-interleukin-17-receptor antibody for psoriasis. *N. Engl. J. Med.* *366*, 1181–1189.
- Papp, K.A., Langley, R.G., Sigurgeirsson, B., Abe, M., Baker, D.R., Konno, P., Haemmerle, S., Thurston, H.J., Papavassilis, C., and Richards, H.B. (2013). Efficacy and safety of secukinumab in the treatment of moderate-to-severe plaque psoriasis: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase II dose-ranging study. *Br. J. Dermatol.* *168*, 412–421.
- Pariante, B., Mocan, I., Camus, M., Dutertre, C.-A., Ettersperger, J., Cattan, P., Gornet, J.-M., Dulphy, N., Charron, D., Lémann, M., et al. (2011a). Activation of the Receptor NKG2D Leads to Production of Th17 Cytokines in CD4(+) T Cells of Patients With Crohn's Disease. *Gastroenterology*.
- Pariante, B., Cosnes, J., Danese, S., Sandborn, W.J., Lewin, M., Fletcher, J.G., Chowers, Y., D'Haens, G., Feagan, B.G., Hibi, T., et al. (2011b). Development of the Crohn's disease digestive damage score, the Lémann score. *Inflamm. Bowel Dis.* *17*, 1415–1422.
- 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.
- Park, O., Wang, H., Weng, H., Feigenbaum, L., Li, H., Yin, S., Ki, S.H., Yoo, S.H., Dooley, S., Wang, F.-S., et al. (2011). In vivo consequences of liver-specific interleukin-22 expression in mice: Implications for human liver disease progression. *Hepatology*. *Baltim. Md* *54*, 252–261.
- Van de Pavert, S.A., Ferreira, M., Domingues, R.G., Ribeiro, H., Molenaar, R., Moreira-Santos, L., Almeida, F.F., Ibiza, S., Barbosa, I., Goverse, G., et al. (2014). Maternal retinoids control type 3 innate lymphoid cells and set the offspring immunity. *Nature* *508*, 123–127.
- Perera, G.K., Di Meglio, P., and Nestle, F.O. (2012). Psoriasis. *Annu. Rev. Pathol.* *7*, 385–422.
- Perera, G.K., Ainali, C., Semenova, E., Hundhausen, C., Barinaga, G., Kassen, D., Williams, A.E., Mirza, M.M., Balazs, M., Wang, X., et al. (2014). Integrative biology approach identifies cytokine targeting strategies for psoriasis. *Sci. Transl. Med.* *6*, 223ra22.
- 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.
- Pineda, M.A., Rodgers, D.T., Al-Riyami, L., Harnett, W., and Harnett, M.M. (2014). ES-62 protects against collagen-induced arthritis by resetting interleukin-22 toward resolution of inflammation in the joints. *Arthritis Rheumatol.* *Hoboken NJ* *66*, 1492–1503.
- Piriyapongsa, J., Polavarapu, N., Borodovsky, M., and McDonald, J. (2007). Exonization of the LTR transposable elements in human genome. *BMC Genomics* *8*, 291.
- Plager, D.A., Leontovich, A.A., Henke, S.A., Davis, M.D.P., McEvoy, M.T., Sciallis, G.F., and Pittelkow, M.R. (2007). Early cutaneous gene transcription changes in adult atopic dermatitis and potential clinical implications. *Exp. Dermatol.* *16*, 28–36.

- Pociask, D.A., Scheller, E.V., Mandalapu, S., McHugh, K.J., Enelow, R.I., Fattman, C.L., Kolls, J.K., and Alcorn, J.F. (2013). IL-22 is essential for lung epithelial repair following influenza infection. *Am. J. Pathol.* *182*, 1286–1296.
- Puel, A., Döffinger, R., Natividad, A., Chrabieh, M., Barcenas-Morales, G., Picard, C., Cobat, A., Ouachée-Chardin, M., Toulon, A., Bustamante, J., et al. (2010). Autoantibodies against IL-17A, IL-17F, and IL-22 in patients with chronic mucocutaneous candidiasis and autoimmune polyendocrine syndrome type I. *J. Exp. Med.* *207*, 291–297.
- Qin, W.-Z., Chen, L.-L., Pan, H.-F., Leng, R.-X., Zhai, Z.-M., Wang, C., Li, R.-J., Wang, S., Wang, H.-P., and Ye, D.-Q. (2011). Expressions of IL-22 in circulating CD4⁺/CD8⁺ T cells and their correlation with disease activity in SLE patients. *Clin. Exp. Med.* *11*, 245–250.
- Qiu, J., Heller, J.J., Guo, X., Chen, Z.-M.E., Fish, K., Fu, Y.-X., and Zhou, L. (2011). The Aryl Hydrocarbon Receptor Regulates Gut Immunity through Modulation of Innate Lymphoid Cells. *Immunity*.
- Qiu, J., Guo, X., Chen, Z.-M.E., He, L., Sonnenberg, G.F., Artis, D., Fu, Y.-X., and Zhou, L. (2013). Group 3 innate lymphoid cells inhibit T-cell-mediated intestinal inflammation through aryl hydrocarbon receptor signaling and regulation of microflora. *Immunity* *39*, 386–399.
- Radaeva, S., Sun, R., Pan, H.-N., Hong, F., and Gao, B. (2004). Interleukin 22 (IL-22) plays a protective role in T cell-mediated murine hepatitis: IL-22 is a survival factor for hepatocytes via STAT3 activation. *Hepatology* *39*, 1332–1342.
- Rahman, P., Inman, R.D., Gladman, D.D., Reeve, J.P., Peddle, L., and Maksymowych, W.P. (2008). Association of interleukin-23 receptor variants with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* *58*, 1020–1025.
- Rajan, N., and Langtry, J. a. A. (2006). Generalized exacerbation of psoriasis associated with imiquimod cream treatment of superficial basal cell carcinomas. *Clin. Exp. Dermatol.* *31*, 140–141.
- Ramesh, R., Kozhaya, L., McKevitt, K., Djuretic, I.M., Carlson, T.J., Quintero, M.A., McCauley, J.L., Abreu, M.T., Unutmaz, D., and Sundrud, M.S. (2014). Pro-inflammatory human Th17 cells selectively express P-glycoprotein and are refractory to glucocorticoids. *J. Exp. Med.* *211*, 89–104.
- Rankin, L.C., Groom, J.R., Chopin, M., Herold, M.J., Walker, J.A., Mielke, L.A., McKenzie, A.N.J., Carotta, S., Nutt, S.L., and Belz, G.T. (2013). The transcription factor T-bet is essential for the development of NKp46⁺ innate lymphocytes via the Notch pathway. *Nat. Immunol.* *14*, 389–395.
- Rao, R., Graffeo, C.S., Gulati, R., Jamal, M., Narayan, S., Zambirinis, C., Barilla, R., Deutsch, M., Greco, S., Ochi, A., et al. (2014). Interleukin 17-Producing $\gamma\delta$ T Cells Promote Hepatic Regeneration in Mice. *Gastroenterology*.
- Ren, X., Hu, B., and Colletti, L.M. (2010). IL-22 is involved in liver regeneration after hepatectomy. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *298*, G74–G80.
- Renauld, J.-C. (2003). Class II cytokine receptors and their ligands: key antiviral and inflammatory modulators. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 667–676.

- Rueda, B., Orozco, G., Raya, E., Fernandez-Sueiro, J.L., Mulero, J., Blanco, F.J., Vilches, C., González-Gay, M.A., and Martin, J. (2008). The IL23R Arg381Gln non-synonymous polymorphism confers susceptibility to ankylosing spondylitis. *Ann. Rheum. Dis.* *67*, 1451–1454.
- Rutz, S., Noubade, R., Eidenschenk, C., Ota, N., Zeng, W., Zheng, Y., Hackney, J., Ding, J., Singh, H., and Ouyang, W. (2011). Transcription factor c-Maf mediates the TGF- β -dependent suppression of IL-22 production in T(H)17 cells. *Nat. Immunol.*
- Rutz, S., Eidenschenk, C., and Ouyang, W. (2013). IL-22, not simply a Th17 cytokine. *Immunol. Rev.* *252*, 116–132.
- Sa, S.M., Valdez, P.A., Wu, J., Jung, K., Zhong, F., Hall, L., Kasman, I., Winer, J., Modrusan, Z., Danilenko, D.M., et al. (2007). The effects of IL-20 subfamily cytokines on reconstituted human epidermis suggest potential roles in cutaneous innate defense and pathogenic adaptive immunity in psoriasis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 2229–2240.
- Sanos, S.L., Bui, V.L., Mortha, A., Oberle, K., Heners, C., Johner, C., and Diefenbach, A. (2009). ROR γ and commensal microflora are required for the differentiation of mucosal interleukin 22-producing NKp46+ cells. *Nat. Immunol.* *10*, 83–91.
- Sarkar, S., Zhou, X., Justa, S., and Bommireddy, S.R. (2013). Interleukin-22 reduces the severity of collagen-induced arthritis in association with increased levels of interleukin-10. *Arthritis Rheum.* *65*, 960–971.
- Satoh-Takayama, N., Vosshenrich, C.A.J., 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.
- Satoh-Takayama, N., Dumoutier, L., Lesjean-Pottier, S., Ribeiro, V.S.G., Mandelboim, O., Renaud, J.-C., Vosshenrich, C.A.J., and Di Santo, J.P. (2009). The natural cytotoxicity receptor NKp46 is dispensable for IL-22-mediated innate intestinal immune defense against *Citrobacter rodentium*. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *183*, 6579–6587.
- Satoh-Takayama, N., Lesjean-Pottier, S., Sawa, S., Vosshenrich, C.A.J., Eberl, G., and Di Santo, J.P. (2011). Lymphotoxin- β receptor-independent development of intestinal IL-22-producing NKp46+ innate lymphoid cells. *Eur. J. Immunol.* *41*, 780–786.
- Satpathy, A.T., Briseño, C.G., Lee, J.S., Ng, D., Manieri, N.A., Kc, W., Wu, X., Thomas, S.R., Lee, W.-L., Turkoz, M., et al. (2013). Notch2-dependent classical dendritic cells orchestrate intestinal immunity to attaching-and-effacing bacterial pathogens. *Nat. Immunol.* *14*, 937–948.
- Savan, R., McFarland, A.P., Reynolds, D.A., Feigenbaum, L., Ramakrishnan, K., Karwan, M., Shirota, H., Klinman, D.M., Dunleavy, K., Pittaluga, S., et al. (2011). A novel role for IL-22R1 as a driver of inflammation. *Blood* *117*, 575–584.
- Sawa, S., Cherrier, M., Lochner, M., Satoh-Takayama, N., Fehling, H.J., Langa, F., Di Santo, J.P., and Eberl, G. (2010). Lineage relationship analysis of ROR γ innate lymphoid cells. *Science* *330*, 665–669.

Sawa, S., Lochner, M., Satoh-Takayama, N., Dulauroy, S., Bérard, M., Kleinschek, M., Cua, D., Di Santo, J.P., and Eberl, G. (2011). ROR γ t(+) innate lymphoid cells regulate intestinal homeostasis by integrating negative signals from the symbiotic microbiota. *Nat. Immunol.* *12*, 320–326.

Scheiermann, P., Bachmann, M., Goren, I., Zwissler, B., Pfeilschifter, J., and Mühl, H. (2013). Application of interleukin-22 mediates protection in experimental acetaminophen-induced acute liver injury. *Am. J. Pathol.* *182*, 1107–1113.

Schmechel, S., Konrad, A., Diegelmann, J., Glas, J., Wetzke, M., Paschos, E., Lohse, P., Göke, B., and Brand, S. (2008). Linking genetic susceptibility to Crohn's disease with Th17 cell function: IL-22 serum levels are increased in Crohn's disease and correlate with disease activity and IL23R genotype status. *Inflamm. Bowel Dis.* *14*, 204–212.

Schraml, B.U., Hildner, K., Ise, W., Lee, W.-L., Smith, W.A.-E., Solomon, B., Sahota, G., Sim, J., Mukasa, R., Cemurski, S., et al. (2009). The AP-1 transcription factor Batf controls T(H)17 differentiation. *Nature* *460*, 405–409.

Schulz, S.M., Köhler, G., Schütze, N., Knauer, J., Straubinger, R.K., Chackerian, A.A., Witte, E., Wolk, K., Sabat, R., Iwakura, Y., et al. (2008). Protective immunity to systemic infection with attenuated *Salmonella enterica* serovar enteritidis in the absence of IL-12 is associated with IL-23-dependent IL-22, but not IL-17. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *181*, 7891–7901.

Sciumé, G., Hirahara, K., Takahashi, H., Laurence, A., Villarino, A.V., Singleton, K.L., Spencer, S.P., Wilhelm, C., Poholek, A.C., Vahedi, G., et al. (2012). Distinct requirements for T-bet in gut innate lymphoid cells. *J. Exp. Med.* *209*, 2331–2338.

Scriba, T.J., Kalsdorf, B., Abrahams, D.-A., Isaacs, F., Hofmeister, J., Black, G., Hassan, H.Y., Wilkinson, R.J., Walzl, G., Gelderbloem, S.J., et al. (2008). Distinct, specific IL-17- and IL-22-producing CD4+ T cell subsets contribute to the human anti-mycobacterial immune response. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 1962–1970.

Sekikawa, A., Fukui, H., Suzuki, K., Karibe, T., Fujii, S., Ichikawa, K., Tomita, S., Imura, J., Shiratori, K., Chiba, T., et al. (2010). Involvement of the IL-22/REG I α axis in ulcerative colitis. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *90*, 496–505.

Serafini, N., Klein Wolterink, R.G.J., Satoh-Takayama, N., Xu, W., Vosshenrich, C.A.J., Hendriks, R.W., and Di Santo, J.P. (2014). Gata3 drives development of ROR γ t+ group 3 innate lymphoid cells. *J. Exp. Med.* *211*, 199–208.

Sestito, R., Madonna, S., Scarponi, C., Cianfarani, F., Failla, C.M., Cavani, A., Girolomoni, G., and Albanesi, C. (2011). STAT3-dependent effects of IL-22 in human keratinocytes are counterregulated by sirtuin 1 through a direct inhibition of STAT3 acetylation. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *25*, 916–927.

Shaw, M.H., Kamada, N., Kim, Y.-G., and Núñez, G. (2012). Microbiota-induced IL-1 β , but not IL-6, is critical for the development of steady-state TH17 cells in the intestine. *J. Exp. Med.* *209*, 251–258.

Shen, H., Goodall, J.C., and Hill Gaston, J.S. (2009). Frequency and phenotype of peripheral blood Th17 cells in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* *60*, 1647–1656.

- Sherlock, J.P., Joyce-Shaikh, B., Turner, S.P., Chao, C.-C., Sathe, M., Grein, J., Gorman, D.M., Bowman, E.P., McClanahan, T.K., Yearley, J.H., et al. (2012). IL-23 induces spondyloarthritis by acting on ROR- γ t+ CD3+CD4-CD8- enthesal resident T cells. *Nat. Med.* *18*, 1069–1076.
- Shimauchi, T., Sasada, K., Kito, Y., Mori, T., Hata, M., Fujiyama, T., Ito, T., Hirakawa, S., and Tokura, Y. (2013). CD8+ Sézary syndrome with interleukin-22 production modulated by bacterial sepsis. *Br. J. Dermatol.* *168*, 881–883.
- Shioya, M., Andoh, A., Kakinoki, S., Nishida, A., and Fujiyama, Y. (2008). Interleukin 22 receptor 1 expression in pancreas islets. *Pancreas* *36*, 197–199.
- Simonian, P.L., Wehrmann, F., Roark, C.L., Born, W.K., O'Brien, R.L., and Fontenot, A.P. (2010). $\gamma\delta$ T cells protect against lung fibrosis via IL-22. *J. Exp. Med.* *207*, 2239–2253.
- Singh, A.K., Eken, A., Fry, M., Bettelli, E., and Oukka, M. (2014). DOCK8 regulates protective immunity by controlling the function and survival of ROR γ t(+) ILCs. *Nat. Commun.* *5*, 4603.
- Solomon, L., Mansor, S., Mallon, P., Donnelly, E., Hoper, M., Loughrey, M., Kirk, S., and Gardiner, K. (2010). The dextran sulphate sodium (DSS) model of colitis: an overview. *Comp. Clin. Pathol.* *19*, 235–239.
- Sonnenberg, G.F., Nair, M.G., Kirn, T.J., Zaph, C., Fouser, L.A., and Artis, D. (2010). Pathological versus protective functions of IL-22 in airway inflammation are regulated by IL-17A. *J. Exp. Med.* *207*, 1293–1305.
- 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.
- 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*.
- Spencer, S.P., Wilhelm, C., Yang, Q., Hall, J.A., Bouladoux, N., Boyd, A., Nutman, T.B., Urban, J.F., Wang, J., Ramalingam, T.R., et al. (2014). Adaptation of innate lymphoid cells to a micronutrient deficiency promotes type 2 barrier immunity. *Science* *343*, 432–437.
- Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N.J., Mebius, R.E., et al. (2013). Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 145–149.
- Stacey, M.A., Marsden, M., Pham N, T.A., Clare, S., Dolton, G., Stack, G., Jones, E., Klenerman, P., Gallimore, A.M., Taylor, P.R., et al. (2014). Neutrophils Recruited by IL-22 in Peripheral Tissues Function as TRAIL-Dependent Antiviral Effectors against MCMV. *Cell Host Microbe* *15*, 471–483.
- 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.

- Sutton, C.E., Lalor, S.J., Sweeney, C.M., Brereton, C.F., Lavelle, E.C., and Mills, K.H.G. (2009). Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity* *31*, 331–341.
- Takatori, H., Kanno, Y., Watford, W.T., Tato, C.M., Weiss, G., Ivanov, I.I., Littman, D.R., and O’Shea, J.J. (2009). Lymphoid tissue inducer-like cells are an innate source of IL-17 and IL-22. *J. Exp. Med.* *206*, 35–41.
- 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.e1–e3.
- Taurog, J.D., Richardson, J.A., Croft, J.T., Simmons, W.A., Zhou, M., Fernández-Sueiro, J.L., Balish, E., and Hammer, R.E. (1994). The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *J. Exp. Med.* *180*, 2359–2364.
- Teraki, Y., Sakurai, A., and Izaki, S. (2013). IL-13/IL-22-coproducing T cells, a novel subset, are increased in atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* *132*, 971–974.
- Teunissen, M.B.M., Munneke, J.M., Bernink, J.H., Spuls, P.I., Res, P.C.M., Te Velde, A., Cheuk, S., Brouwer, M.W.D., Menting, S.P., Eidsmo, L., et al. (2014). Composition of Innate Lymphoid Cell Subsets in the Human Skin: Enrichment of NCR(+) ILC3 in Lesional Skin and Blood of Psoriasis Patients. *J. Invest. Dermatol.*
- Thompson, C.L., Plummer, S.J., Tucker, T.C., Casey, G., and Li, L. (2010). Interleukin-22 genetic polymorphisms and risk of colon cancer. *Cancer Causes Control CCC* *21*, 1165–1170.
- Tohyama, M., Hanakawa, Y., Shirakata, Y., Dai, X., Yang, L., Hirakawa, S., Tokumaru, S., Okazaki, H., Sayama, K., and Hashimoto, K. (2009). IL-17 and IL-22 mediate IL-20 subfamily cytokine production in cultured keratinocytes via increased IL-22 receptor expression. *Eur. J. Immunol.* *39*, 2779–2788.
- Tohyama, M., Yang, L., Hanakawa, Y., Dai, X., Shirakata, Y., and Sayama, K. (2012). IFN- α enhances IL-22 receptor expression in keratinocytes: a possible role in the development of psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* *132*, 1933–1935.
- Trifari, S., Kaplan, C.D., Tran, E.H., Crellin, N.K., and Spits, H. (2009). Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nat. Immunol.* *10*, 864–871.
- Trivella, D.B.B., Ferreira-Júnior, J.R., Dumoutier, L., Renauld, J.-C., and Polikarpov, I. (2010). Structure and function of interleukin-22 and other members of the interleukin-10 family. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *67*, 2909–2935.
- Tumanov, A.V., Koroleva, E.P., Guo, X., Wang, Y., Kruglov, A., Nedospasov, S., and Fu, Y.-X. (2011). Lymphotoxin controls the IL-22 protection pathway in gut innate lymphoid cells during mucosal pathogen challenge. *Cell Host Microbe* *10*, 44–53.
- Turner, J.-E., Stockinger, B., and Helmbj, H. (2013). IL-22 mediates goblet cell hyperplasia and worm expulsion in intestinal helminth infection. *PLoS Pathog.* *9*, e1003698.

- Upadhyay, V., Poroyko, V., Kim, T.-J., Devkota, S., Fu, S., Liu, D., Tumanov, A.V., Koroleva, E.P., Deng, L., Nagler, C., et al. (2012). Lymphotoxin regulates commensal responses to enable diet-induced obesity. *Nat. Immunol.*
- Vandenbroeck, K., Alvarez, J., Swaminathan, B., Alloza, I., Matesanz, F., Urcelay, E., Comabella, M., Alcina, A., Fedetz, M., Ortiz, M.A., et al. (2011). A cytokine gene screen uncovers SOCS1 as genetic risk factor for multiple sclerosis. *Genes Immun.*
- Van de Veerdonk, F.L., Lauwerys, B., Marijnissen, R.J., Timmermans, K., Di Padova, F., Koenders, M.I., Gutierrez-Roelens, I., Durez, P., Netea, M.G., van der Meer, J.W.M., et al. (2011). The anti-CD20 antibody rituximab reduces the Th17 cell response. *Arthritis Rheum.* *63*, 1507–1516.
- Veldhoen, M., Hirota, K., Westendorf, A.M., Buer, J., Dumoutier, L., Renauld, J.-C., and Stockinger, B. (2008). The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* *453*, 106–109.
- Veldhoen, M., Hirota, K., Christensen, J., O’Garra, A., and Stockinger, B. (2009). Natural agonists for aryl hydrocarbon receptor in culture medium are essential for optimal differentiation of Th17 T cells. *J. Exp. Med.* *206*, 43–49.
- Villanova, F., Flutter, B., Tosi, I., Gryś, K., Sreeneebus, H., Perera, G.K., Chapman, A., Smith, C.H., Di Meglio, P., and Nestle, F.O. (2014). Characterization of innate lymphoid cells in human skin and blood demonstrates increase of NKp44+ ILC3 in psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* *134*, 984–991.
- Vinter, H., Iversen, L., Steiniche, T., Kragballe, K., and Johansen, C. (2014). Aldara-induced skin inflammation - studies of psoriasis patients. *Br. J. Dermatol.*
- Volpe, E., Touzot, M., Servant, N., Marloie-Provost, M.-A., Hupé, P., Barillot, E., and Soumelis, V. (2009). Multiparametric analysis of cytokine-driven human Th17 differentiation reveals a differential regulation of IL-17 and IL-22 production. *Blood* *114*, 3610–3614.
- Wade, R., Di Bernardo, M.C., Richards, S., Rossi, D., Crowther-Swanepoel, D., Gaidano, G., Oscier, D.G., Catovsky, D., and Houlston, R.S. (2011). Association between SNP-genotype and chronic lymphocytic leukemia outcome in a randomized chemotherapy trial. *Haematologica.*
- Waidmann, O., Kronenberger, B., Scheiermann, P., Köberle, V., Mühl, H., and Piiper, A. (2014). Interleukin-22 serum levels are a negative prognostic indicator in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* *59*, 1207.
- Walker, J.A., Barlow, J.L., and McKenzie, A.N.J. (2013). Innate lymphoid cells--how did we miss them? *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 75–87.
- Wang, C., Wu, L., Bulek, K., Martin, B.N., Zepp, J.A., Kang, Z., Liu, C., Herjan, T., Misra, S., Carman, J.A., et al. (2013). The psoriasis-associated D10N variant of the adaptor Act1 with impaired regulation by the molecular chaperone hsp90. *Nat. Immunol.* *14*, 72–81.
- Wang, X., Ota, N., Manzanillo, P., Kates, L., Zavala-Solorio, J., Eidenschenk, C., Zhang, J., Lesch, J., Lee, W.P., Ross, J., et al. (2014). Interleukin-22 alleviates metabolic disorders and restores mucosal immunity in diabetes. *Nature.*

- Watchmaker, P.B., Lahl, K., Lee, M., Baumjohann, D., Morton, J., Kim, S.J., Zeng, R., Dent, A., Ansel, K.M., Diamond, B., et al. (2014). Comparative transcriptional and functional profiling defines conserved programs of intestinal DC differentiation in humans and mice. *Nat. Immunol.* *15*, 98–108.
- Weber, G.F., Schlautkötter, S., Kaiser-Moore, S., Altmayr, F., Holzmann, B., and Weighardt, H. (2007). Inhibition of interleukin-22 attenuates bacterial load and organ failure during acute polymicrobial sepsis. *Infect. Immun.* *75*, 1690–1697.
- Wei, C.-C., Ho, T.-W., Liang, W.-G., Chen, G.-Y., and Chang, M.-S. (2003). Cloning and characterization of mouse IL-22 binding protein. *Genes Immun.* *4*, 204–211.
- Weiss, B., Wolk, K., Grünberg, B.H., Volk, H.-D., Sterry, W., Asadullah, K., and Sabat, R. (2004). Cloning of murine IL-22 receptor alpha 2 and comparison with its human counterpart. *Genes Immun.* *5*, 330–336.
- Whittington, H.A., Armstrong, L., Uppington, K.M., and Millar, A.B. (2004). Interleukin-22: a potential immunomodulatory molecule in the lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *31*, 220–226.
- Wilson, M.S., Feng, C.G., Barber, D.L., Yarovinsky, F., Cheever, A.W., Sher, A., Grigg, M., Collins, M., Fouser, L., and Wynn, T.A. (2010). Redundant and pathogenic roles for IL-22 in mycobacterial, protozoan, and helminth infections. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *184*, 4378–4390.
- Wohn, C., Ober-Blöbaum, J.L., Haak, S., Pantelyushin, S., Cheong, C., Zahner, S.P., Onderwater, S., Kant, M., Weighardt, H., Holzmann, B., et al. (2013). Langerin⁺ conventional dendritic cells produce IL-23 to drive psoriatic plaque formation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- Wolk, K., Kunz, S., Asadullah, K., and Sabat, R. (2002). Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members? *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *168*, 5397–5402.
- Wolk, K., Kunz, S., Witte, E., Friedrich, M., Asadullah, K., and Sabat, R. (2004). IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* *21*, 241–254.
- Wolk, K., Witte, E., Wallace, E., Döcke, W.-D., Kunz, S., Asadullah, K., Volk, H.-D., Sterry, W., and Sabat, R. (2006). IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *Eur. J. Immunol.* *36*, 1309–1323.
- Wolk, K., Witte, E., Hoffmann, U., Doecke, W.-D., Endesfelder, S., Asadullah, K., Sterry, W., Volk, H.-D., Wittig, B.M., and Sabat, R. (2007). IL-22 induces lipopolysaccharide-binding protein in hepatocytes: a potential systemic role of IL-22 in Crohn's disease. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 5973–5981.
- Wolk, K., Haugen, H.S., Xu, W., Witte, E., Waggle, K., Anderson, M., Vom Baur, E., Witte, K., Warszawska, K., Philipp, S., et al. (2009a). IL-22 and IL-20 are key mediators of the epidermal alterations in psoriasis while IL-17 and IFN-gamma are not. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* *87*, 523–536.

- Wolk, K., Witte, E., Warszawska, K., Schulze-Tanzil, G., Witte, K., Philipp, S., Kunz, S., Döcke, W.-D., Asadullah, K., Volk, H.-D., et al. (2009b). The Th17 cytokine IL-22 induces IL-20 production in keratinocytes: a novel immunological cascade with potential relevance in psoriasis. *Eur. J. Immunol.* *39*, 3570–3581.
- Wolk, K., Witte, E., Witte, K., Warszawska, K., and Sabat, R. (2010a). Biology of interleukin-22. *Semin. Immunopathol.* *32*, 17–31.
- Wolk, K., Warszawska, K., Hoeflich, C., Witte, E., Schneider-Burrus, S., Witte, K., Kunz, S., Buss, A., Roewert, H.J., Krause, M., et al. (2010b). Deficiency of IL-22 Contributes to a Chronic Inflammatory Disease: Pathogenetic Mechanisms in Acne Inversa. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*.
- Wu, J.K., Siller, G., and Strutton, G. (2004). Psoriasis induced by topical imiquimod. *Australas. J. Dermatol.* *45*, 47–50.
- Wu, P.W., Li, J., Kodangattil, S.R., Luxenberg, D.P., Bennett, F., Martino, M., Collins, M., Dunussi-Joannopoulos, K., Gill, D.S., Wolfman, N.M., et al. (2008). IL-22R, IL-10R2, and IL-22BP binding sites are topologically juxtaposed on adjacent and overlapping surfaces of IL-22. *J. Mol. Biol.* *382*, 1168–1183.
- Wu, T., Cui, L., Liang, Z., Liu, C., Liu, Y., and Li, J. (2013). Elevated serum IL-22 levels correlate with chemoresistant condition of colorectal cancer. *Clin. Immunol. Orlando Fla* *147*, 38–39.
- Wu, T., Wang, Z., Liu, Y., Mei, Z., Wang, G., Liang, Z., Cui, A., Hu, X., Cui, L., Yang, Y., et al. (2014). Interleukin 22 protects colorectal cancer cells from chemotherapy by activating the STAT3 pathway and inducing autocrine expression of interleukin 8. *Clin. Immunol. Orlando Fla* *154*, 116–126.
- Xie, M.H., Aggarwal, S., Ho, W.H., Foster, J., Zhang, Z., Stinson, J., Wood, W.I., Goddard, A.D., and Gurney, A.L. (2000). Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2-4 and IL-22R. *J. Biol. Chem.* *275*, 31335–31339.
- Xing, W.-W., Zou, M.-J., Liu, S., Xu, T., Wang, J.-X., and Xu, D.-G. (2011). Interleukin-22 protects against acute alcohol-induced hepatotoxicity in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *75*, 1290–1294.
- Xu, M.-J., Feng, D., Wang, H., Guan, Y., Yan, X., and Gao, B. (2014a). IL-22 Ameliorates Renal Ischemia-Reperfusion Injury by Targeting Proximal Tubule Epithelium. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN*.
- Xu, T., Logsdon, N.J., and Walter, M.R. (2004). Crystallization and X-ray diffraction analysis of insect-cell-derived IL-22. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *60*, 1295–1298.
- Xu, W., Presnell, S.R., Parrish-Novak, J., Kindsvogel, W., Jaspers, S., Chen, Z., Dillon, S.R., Gao, Z., Gilbert, T., Madden, K., et al. (2001). A soluble class II cytokine receptor, IL-22RA2, is a naturally occurring IL-22 antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 9511–9516.

- Xu, X., Weiss, I.D., Zhang, H.H., Singh, S.P., Wynn, T.A., Wilson, M.S., and Farber, J.M. (2014b). Conventional NK Cells Can Produce IL-22 and Promote Host Defense in *Klebsiella pneumoniae* Pneumonia. *J. Immunol.* *192*, 1778–1786.
- Xu, X., Tang, Y., Guo, S., Zhang, Y., Tian, Y., Ni, B., and Wang, H. (2014c). Increased intratumoral interleukin 22 levels and frequencies of interleukin 22-producing CD4⁺ T cells correlate with pancreatic cancer progression. *Pancreas* *43*, 470–477.
- Xue, J., Nguyen, D.T.C., and Habtezion, A. (2012). Aryl Hydrocarbon Receptor Regulates Pancreatic IL-22 Production and Protects Mice From Acute Pancreatitis. *Gastroenterology*.
- Yang, L., Zhang, Y., Wang, L., Fan, F., Zhu, L., Li, Z., Ruan, X., Huang, H., Wang, Z., Huang, Z., et al. (2010). Amelioration of high fat diet induced liver lipogenesis and hepatic steatosis by interleukin-22. *J. Hepatol.* *53*, 339–347.
- Yang, X., Wang, H., Zhao, X., Wang, L., Lv, Q., and Wang, Q. (2013). Th22, but not Th17 might be a good index to predict the tissue involvement of systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Immunol.* *33*, 767–774.
- Yang, X., Gao, Y., Wang, H., Zhao, X., Gong, X., Wang, Q., and Zhang, X. (2014). Increased Urinary Interleukin 22 Binding Protein Levels Correlate with Lupus Nephritis Activity. *J. Rheumatol.*
- 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.
- Yang, X.O., Chang, S.H., Park, H., Nurieva, R., Shah, B., Acero, L., Wang, Y.-H., Schluns, K.S., Broaddus, R.R., Zhu, Z., et al. (2008). Regulation of inflammatory responses by IL-17F. *J. Exp. Med.* *205*, 1063–1075.
- Ye, Z.-J., Zhou, Q., Yin, W., Yuan, M.-L., Yang, W.-B., Xiang, F., Zhang, J.-C., Xin, J.-B., Xiong, X.-Z., and Shi, H.-Z. (2012). Interleukin 22-producing CD4⁺ T cells in malignant pleural effusion. *Cancer Lett.* *326*, 23–32.
- Yeste, A., Mascanfroni, I.D., Nadeau, M., Burns, E.J., Tukpah, A.-M., Santiago, A., Wu, C., Patel, B., Kumar, D., and Quintana, F.J. (2014). IL-21 induces IL-22 production in CD4⁺ T cells. *Nat. Commun.* *5*, 3753.
- Yoon, S.-I., Jones, B.C., Logsdon, N.J., Harris, B.D., Deshpande, A., Radaeva, S., Halloran, B.A., Gao, B., and Walter, M.R. (2010). Structure and mechanism of receptor sharing by the IL-10R2 common chain. *Struct. Lond. Engl.* *1993* *18*, 638–648.
- Yoshiki, R., Kabashima, K., Honda, T., Nakamizo, S., Sawada, Y., Sugita, K., Yoshioka, H., Ohmori, S., Malissen, B., Tokura, Y., et al. (2014). IL-23 from langerhans cells is required for the development of imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis by induction of IL-17A-producing $\gamma\delta$ T cells. *J. Invest. Dermatol.* *134*, 1912–1921.
- Yu, B., Guan, M., Peng, Y., Shao, Y., Zhang, C., Yue, X., Zhang, J., Yang, H., Zou, H., Ye, W., et al. (2011). Copy number variations of interleukin-17F, interleukin-21, and interleukin-22 are associated with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* *63*, 3487–3492.

- Yu, L.-Z., Wang, H.-Y., Yang, S.-P., Yuan, Z.-P., Xu, F.-Y., Sun, C., and Shi, R.-H. (2013). Expression of interleukin-22/STAT3 signaling pathway in ulcerative colitis and related carcinogenesis. *World J. Gastroenterol. WJG* 19, 2638–2649.
- Yuan, Z.-L., Guan, Y.-J., Chatterjee, D., and Chin, Y.E. (2005). Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. *Science* 307, 269–273.
- Zelante, T., Iannitti, R.G., Cunha, C., De Luca, A., Giovannini, G., Pieraccini, G., Zecchi, R., D'Angelo, C., Massi-Benedetti, C., Fallarino, F., et al. (2013). Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity* 39, 372–385.
- Zenewicz, L.A., Yancopoulos, G.D., Valenzuela, D.M., Murphy, A.J., Karow, M., and Flavell, R.A. (2007). Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation. *Immunity* 27, 647–659.
- Zenewicz, L.A., Yancopoulos, G.D., Valenzuela, D.M., Murphy, A.J., Stevens, S., and Flavell, R.A. (2008). Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease. *Immunity* 29, 947–957.
- Zenewicz, L.A., Yin, X., Wang, G., Elinav, E., Hao, L., Zhao, L., and Flavell, R.A. (2013). IL-22 Deficiency Alters Colonic Microbiota To Be Transmissible and Colitogenic. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950.
- Zeng, G., Chen, C.Y., Huang, D., Yao, S., Wang, R.C., and Chen, Z.W. (2011). Membrane-bound IL-22 after de novo production in tuberculosis and anti-Mycobacterium tuberculosis effector function of IL-22+ CD4+ T cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 187, 190–199.
- Zhang, L., Li, J.-M., Liu, X.-G., Ma, D.-X., Hu, N.-W., Li, Y.-G., Li, W., Hu, Y., Yu, S., Qu, X., et al. (2011a). Elevated Th22 Cells Correlated with Th17 Cells in Patients with Rheumatoid Arthritis. *J. Clin. Immunol.*
- Zhang, L., Li, Y., Li, Y., Qi, L., Liu, X., Yuan, C., Hu, N., Ma, D., Li, Z., Yang, Q., et al. (2012). Increased frequencies of Th22 cells as well as Th17 cells in the peripheral blood of patients with ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *PloS One* 7, e31000.
- Zhang, W., Chen, Y., Wei, H., Zheng, C., Sun, R., Zhang, J., and Tian, Z. (2008). Antiapoptotic activity of autocrine interleukin-22 and therapeutic effects of interleukin-22-small interfering RNA on human lung cancer xenografts. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 14, 6432–6439.
- Zhang, Y., Cobleigh, M.A., Lian, J.-Q., Huang, C.-X., Booth, C.J., Bai, X.-F., and Robek, M.D. (2011b). A proinflammatory role for interleukin-22 in the immune response to hepatitis B virus. *Gastroenterology* 141, 1897–1906.
- Zhao, J., Zhang, Z., Luan, Y., Zou, Z., Sun, Y., Li, Y., Jin, L., Zhou, C., Fu, J., Gao, B., et al. (2014). Pathological functions of interleukin-22 in chronic liver inflammation and fibrosis with hepatitis B virus infection by promoting T helper 17 cell recruitment. *Hepatology* 59, 1331–1342.

- Zhao, L., Jiang, Z., Jiang, Y., Ma, N., Wang, K., Zhang, Y., and Feng, L. (2013). IL-22+CD4+ T-cells in patients with active systemic lupus erythematosus. *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ 238, 193–199.
- 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., Lopes, J.E., Chong, M.M.W., Ivanov, I.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.
- Zhuang, Y., Peng, L.-S., Zhao, Y.-L., Shi, Y., Mao, X.-H., Guo, G., Chen, W., Liu, X.-F., Zhang, J.-Y., Liu, T., et al. (2012). Increased intratumoral IL-22-producing CD4(+) T cells and Th22 cells correlate with gastric cancer progression and predict poor patient survival. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 61, 1965–1975.
- Ziesché, E., Bachmann, M., Kleinert, H., Pfeilschifter, J., and Mühl, H. (2007). The interleukin-22/STAT3 pathway potentiates expression of inducible nitric-oxide synthase in human colon carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 282, 16006–16015.
- Zindl, C.L., Lai, J.-F., Lee, Y.K., Maynard, C.L., Harbour, S.N., Ouyang, W., Chaplin, D.D., and Weaver, C.T. (2013). IL-22-producing neutrophils contribute to antimicrobial defense and restitution of colonic epithelial integrity during colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*

Annexes

Annexe 1 : Rôles émergents de l'IL-17 et des lymphocytes Th17 dans la physiopathologie du lupus systémique

Clinical Immunology (2014) 154, 1–12



available at www.sciencedirect.com

Clinical Immunology

www.elsevier.com/locate/yclim



REVIEW

Emerging role of IL-17 and Th17 cells in systemic lupus erythematosus



Jérôme C. Martin^{a,b,c,*}, Dominique L. Baeten^d, Régis Josien^{a,b,c}

^a *CHU Nantes, Laboratoire d'Immunologie, Nantes F-44000, France*

^b *INSERM UMR1064, ITUN, Nantes, France*

^c *Nantes University Medical School, Nantes, France*

^d *Department of Clinical Immunology and Rheumatology, Academic Medical Center, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands*

Received 18 March 2014; accepted with revision 14 May 2014

KEYWORDS

IL-17;
Th17;
SLE

Abstract Despite the success of targeted therapies in managing immune-mediated inflammatory diseases (IMIDs) such as RA, IBDs, MS and psoriasis, unmet needs for such approach in SLE are widely recognized. In the past 2 years, exciting insights supporting previous lines of evidence on the role of the IL-23/IL-17 axis in SLE have emerged. This is of particular importance as IL-17 blockers have now moved successfully into the clinical space, as illustrated in psoriasis and ankylosing spondylitis. However, recent fundamental studies also highlighted unexpected aspects of IL-17/Th17 biology whose comprehension may prevent disappointing results of IL-17 targeting such as those obtained in Crohn's disease. Therefore, establishing a current picture of the IL-17 pre-clinical situation in SLE is timely in order to plan future proof-of-concept studies in human.
© 2014 Published by Elsevier Inc.

Contents

1. Introduction	2
2. General features of IL-17	2
2.1. IL-17/IL-17R families, signaling and biological properties	2
2.2. IL-17 cellular sources	3
3. IL-17 and SLE	3
3.1. IL-17 production in human SLE	3
3.2. IL-17 cellular sources in human SLE	4
3.3. IL-17 induction in human SLE	4
3.4. Pathological features of IL-17 in SLE	5

* Corresponding author at: Laboratoire d'Immunologie, CHU Nantes Hotel Dieu, 9 quai Moncoussu, 44093 Nantes Cedex 1, France.
E-mail address: Jerome.martin@univ-nantes.fr (J.C. Martin).

4. Therapeutic targeting of IL-17 in human immune-mediated inflammatory diseases	7
5. Conclusions	8
Conflict of interest statement	8
Acknowledgments	8
References	

1. Introduction

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a prototypical systemic autoimmune disease in which tolerance against ubiquitous self-antigens is lost. Clinical symptoms are heterogeneous and range from mild skin rashes to more severe multi-organ manifestations, primarily involving the kidney, the brain and blood [1]. Most of the patients are women of childbearing age and prevalence varies from 20 to 70 per 100,000 [2]. It is currently assumed that environmental factors in genetically susceptible individuals promote a loss of tolerance against nuclear antigens with subsequent activation of innate and adaptive immune responses [3]. A hallmark of SLE is the production of pathogenic antinuclear auto-antibodies that leads to the formation of immune complexes which, deposit in vascular beds of diseased organs. The resulting activation of the complement cascade and the consequent recruitment of inflammatory cells then sustain the installation of local inflammation and tissue damage. This is accompanied by the release of large amounts of self-antigens that support the establishment of chronic autoimmune responses in a self-sustained manner [1,3].

Chronic immune activation in SLE leads to the production of large amounts of inflammatory cytokines and contributes actively to local inflammation and tissue damage. This is well illustrated by the characteristic type I IFN signature observed in blood cells of many SLE patients [4]. Understanding inflammatory pathways involved in SLE is of primary importance for the development of new targeted biotherapies, which are sorely lacking in the therapeutic armamentarium of SLE [5]. Belimumab, a monoclonal antibody inhibiting the B cell survival cytokine BAFF (B cell-activating factor), has been the only biotherapy approved for SLE in the past 50 years, and only modest and time-limited effects were found in large clinical phase 3 trials [6,7]. Promising results have been obtained in phase I studies evaluating the blockade of IFN α [8] and IL-6 [9] but the identification of new relevant targets is obviously required.

Among them, IL-17 is currently the focus of increasing attention. Indeed, from the past 10 years, numerous lines of evidence have suggested it could play a major role in the pathogenesis of SLE. In this review, we discuss findings from both human and animal studies implicating important roles for IL-17 as a mediator of inflammation and in the loss of tolerance in SLE.

2. General features of IL-17

2.1. IL-17/IL-17R families, signaling and biological properties

IL-17 was first isolated from a murine cytotoxic T lymphocyte hybridoma cDNA library 20 years ago [10]. Database

screening further allowed the identification of five additional homologous cytokines. IL-17 was thus designated IL-17A to indicate that it was the founding member of a new family of six cytokines (IL-17A to IL-17F) [11]. IL-17F shares the highest homology with IL-17A as they display 50% identity at the protein level. IL-17A and IL-17F can form both homodimers and heterodimers. Only deregulated actions of IL-17A and IL-17F have been linked to autoimmune pathologies, whereas IL-17E (also called IL-25) mediates type 2 immunity. The functions of IL-17B, IL-17C and IL-17D are still under characterization [12]. The IL-17 receptors also constitute a distinct family of cytokine receptors which include five subunits: IL-17RA to IL-17RE [12]. Both homodimers and heterodimers of IL-17A and IL-17F necessarily bind to a functional IL-17 receptor that is a heterodimeric membrane complex composed of the IL-17RA and IL-17RC subunits. IL-17RA expression is ubiquitous with the highest levels found on hematopoietic cells. However IL-17 responses mostly occur in epithelial cells, endothelial cell and fibroblasts, although macrophages and dendritic cells (DCs) are also responsive [12]. This is explained by the restricted expression of the IL-17RC subunit to non-hematopoietic cells.

Binding of IL-17 to the heterodimeric IL-17RA/IL-17RC complex initiates intracellular signaling pathways mostly through the recruitment of the U-box-like E3 ubiquitin ligase Act1 (CIKS or Traf3ip2), via homotypic interactions between conserved SEFIR domains. Act1 is an adaptor molecule, which binds to downstream signaling molecules TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6) and TAK1 (TGF β -associated kinase 1). Act1 ubiquitinates TRAF6, which in turn ubiquitinates TAK1. This ultimately leads to activation of the canonical NF- κ B pathway [13]. IL-17 alone only presents modest signaling activity, but it has the capacity to synergize with other cytokines like TNF α , IL-1 β , IL-22, or IFN- γ to stabilize the mRNA of pro-inflammatory cytokines and chemokines [14,15]. This occurs via an Act1-dependent but TRAF6-independent manner, notably involving IKK ϵ and the formation of the Act1-TRAF2-TRAF5 complex [16,17]. The IL-17-induced Act1 signaling complex also activates MAPKs (mitogen-activated protein kinases) and induces C/EBP (CCAAT/enhancer-binding proteins).

IL-17R signaling induces the expression of several pro-inflammatory mediators by its cellular targets. Thus, IL-17 can induce the production of the neutrophil-attracting chemokines CXCL1, CXCL5 and CXCL8 (aka IL-8). Also, IL-17 induces the secretion of the pro-inflammatory cytokines IL-6, which further enhances Th17 differentiation, as well as TNF- α and IL-1 β , which can synergize with IL-17. In addition, IL-17 promotes nitric oxide (NO) and prostaglandin E2 (PGE2) synthesis through induction of NO synthase and cyclooxygenase, respectively. Finally, IL-17 leads to the production of growth factors (G-CSF and GM-CSF), tissue-remodeling factors and various antimicrobial peptides (β -defensins, S100 proteins, lipocalin 2) [15]. All these properties have been linked to the physiological importance of IL-17-producing cells

in fighting against extracellular pathogens at barrier surfaces in animal models [18]. This is further illustrated by the induced sensitivity of IL-17 deficiencies to chronic mucocutaneous candidiasis and *Staphylococcus aureus* infections in human [19–23].

2.2. IL-17 cellular sources

IL-17 secretion has been ascribed to T cells since its early descriptions [10,24]. Increasing interest for the cytokine started from the identification of a new CD4⁺ T helper lymphocyte lineage specialized to produce IL-17 but not Th1 or Th2 cytokines, the so-called Th17 cells [25,26]. Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor γ t (ROR γ t) was characterized as the master regulator gene for the development of Th17 cells [27]. Th17 differentiation has been shown to be dependent on TGF- β ₁ and IL-6 in mouse and human [28–31], while IL-23 is necessary for functional maturation [32]. In human, IL-1 β is also important in inducing Th17 [31]. Understanding the role of IL-23 in inducing pro-inflammatory properties of Th17 cells has been of critical importance as it has resolved the pathological properties of this cytokine in several experimental autoimmune conditions, like experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) [33,34] and collagen-induced arthritis (CIA) [35]. Indeed, disease induction has been attributed to IL-17-producing CD4⁺ T cells rather than Th1 cells in these models.

Pathogenicity is not a common feature to all IL-17-producing T cells, which may actually represent a heterogeneous group. In fact, differentiation of Th17 cells in the presence of TGF β ₁ and IL-6 but without exposure to IL-23 induces non-pathogenic cells, which express high levels of IL-10 in addition to IL-17 [36]. The presence of such suppressive Th17 cells was recently detected in vivo after anti-CD3 treatment in mouse small intestine [37], as well as in human in vitro studies [38]. By contrast, Th17 cells further exposed to IL-23 also produce GM-CSF, which is indispensable for pathogenicity in EAE [39,40]. Interestingly, a recent report showed that IL-23 induced the expression of another isoform of TGF β , TGF β ₃, in differentiated Th17 cells, through a T-bet-dependent way. In contrast to TGF β ₁, TGF β ₃ elicited pro-inflammatory properties of Th17 cells in a feedback loop [41]. In addition, fate-mapping studies showed an IL-23-dependent transition of Th17 cells toward a Th17–Th1 phenotype producing IFN γ during EAE [42]. Finally, Th17 cells were also reported to produce IL-22, which can synergize with IL-17 to induce tissue lesions [43–45]. Again, IL-22 production was highly dependent on IL-23 stimulation.

Taken together these studies highlight the functional flexibility of Th17 cells which can differentiate into “classical,” more regulatory, and “alternative,” more inflammatory, Th17 cells depending on the relative amounts of TGF β ₁ and IL-23 in the milieu [46]. The requirement of IL-23 for inflammatory properties of Th17 cells is of physiological relevance as this cytokine is secreted by dendritic cells (DCs) and tissue macrophages in response to pattern recognition receptors (PRRs) activation. This allows them to efficiently fight against extracellular pathogens, mostly in barrier tissues, while avoiding their potentially dangerous inflammatory properties when unnecessary [18]. Such flexibility was also recently highlighted in human Th17 cells [38]. In this study,

the authors further showed an important role for IL-1 β , which is also produced at high levels by activated DCs, in modulating Th17 functions. Therefore, this functional flexibility of Th17 cells as well as the inflammatory environment should be taken into account when studying these cells in the context of human immune-mediated inflammatory diseases (IMIDs).

Finally, in addition to Th17 cells, IL-17 is also produced by a broad variety of innate immune cells including members of group 3 innate lymphoid cells (ILCs), γ δ T cells, NK cells, iNKT cells, mast cells and neutrophils [47–49]. Most of these cells constitutively express the IL-23R and are located in barrier tissues. This allows them to respond rapidly during infection and thus to initiate a first wave of IL-17 cytokines secretion before Th17 cells take over.

Not only Th17 cells but also these other types of IL-17-producing cells are likely to be involved in chronic tissue inflammation. As discussed above, Th17 cells are the key pathogenic cells in mouse models of EAE [33,34] and CIA [35]. However, in mice that overexpress IL-23 and develop an ankylosing spondylitis phenotype the IL-23 responsive, disease-inducing cells are not canonical Th17 cells but CD4⁺ CD8⁺ ROR γ t-positive T cells located at the entheses [50]. In human ankylosing spondylitis, IL-17 appears to be mainly expressed by innate immune cells (including neutrophils, MPO-positive cells and mast cells) and gamma delta T cells rather than Th17 cells [51–53].

3. IL-17 and SLE

3.1. IL-17 production in human SLE

To date, no direct link between the IL-23/IL-17 axis and SLE has been found from genetic studies [54–56], although copy number amplifications have been seen for IL-17F, IL-21 and IL-22 genes [57]. However, during the last 5 years, numerous reports have studied IL-17 levels in SLE patients. Most of the studies measuring IL-17 in the serum have indicated elevated levels as compared to healthy controls (HC) [58–64]. One study have also reported elevated levels of IL-17F in sera of both SLE and discoid lupus erythematosus (DLE) patients [62]. Finally, no differences have been found between SLE patients as compared to HC in one study [65], but the cohorts studied in this paper were rather small (9 SLE vs. 12 HC) as compared to the others. Although three studies [58,60,64] have suggested a weak correlation between IL-17 serum levels and disease activity (assessed by calculating the SLE Disease Activity Index (SLEDAI) score), this has not been confirmed in larger studies [59,61–63]. Moreover, the relationship between IL-17 levels and anti-double-stranded deoxyribonucleic acid (anti-dsDNA), complement 3 (C3), C-reactive protein (CRP), erythrocyte sedimentation rate (ESR) or glucocorticoids use has not been established [59,61–63]. No difference has been seen when comparing IL-17 levels in inactive and active SLE (based on SLEDAI \geq 6 as a cut-off), suggesting that IL-17 is constitutively and quite stably produced in SLE patients independent of disease activity [59,61,63]. Finally, no preferential association between IL-17 serum levels and skin or kidney involvement has been found [61–63]. Nevertheless, one report has shown a significant increase of IL-17 levels in the serum of central nervous system (CNS)-involved patients as compared to other SLE patients [63].

Overall, these studies reflect that the inflammatory status of SLE patients is characterized by high production of IL-17. However, the lack of significant correlation with the SLEDAI indicates that IL-17 serum levels are not likely to represent a useful biomarker with respect to the evaluation of disease activity. The finding that IL-17 levels could be higher in SLE patients with CNS involvement is interesting given the difficulties in diagnosing this particularly severe condition. Further studies exploring this hypothesis are thus required. Finally, interpretation of systemic levels in serum is difficult as they are not necessarily indicative of levels or function in tissue. However, importantly, IL-17 has also been detected in injured kidneys and skin of SLE patients [62,66–68].

3.2. IL-17 cellular sources in human SLE

Given the elevated levels of IL-17 in the serum, several reports have also analyzed IL-17-producing cells in human peripheral blood of SLE patients [64,66,67,69–71]. Some [64,66,69] studies have reported an increased frequency of CD4⁺ IL-17-producing T cells among *in vitro* stimulated peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of SLE patients. Concordant with this, a study has shown an enrichment of CCR6⁺ CCR4⁺ CD4⁺ T cells [69]. This population contains virtually all memory Th17 cells [72] and correlated positively with IL-17-producing CD4⁺ T cells in SLE patients [69]. However, as discussed above, Th17 cells are flexible and not necessarily pathogenic. It would be thus relevant to analyze other cytokines (GM-CSF, IFN γ , IL-10...) co-expressed by these cells in SLE. For example, studies have reported variations of the Th17-related cytokine IL-22, in SLE [59,64,73,74]. However, even if IL-22 can be produced by Th17 in both mouse and human [31,43], its variations in SLE are related to a population of CD4⁺ Th22 cells which produces IL-22 but neither IL-17 nor IFN γ [75,76]. This population has been mostly described in human and present skin-homing properties due to expression of CCR10. Interestingly, it has been recently suggested that Th22 was specifically increased in cutaneous SLE but decreased in lupus nephritis as compared to HC [64]. Additional studies on IL-22, including its soluble inhibitor, IL-22 binding protein (IL-22BP) [77,78], would be helpful to understand its role in SLE skin.

Several studies have described an increased frequency of Th17 cells in peripheral blood of SLE patients based on higher IL-17 expression by CD3⁺ CD8⁻ T cells [67,71]. However, CD3⁺ TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD4⁻ CD8⁻ double-negative (DN) T cells, which are known to be expanded in SLE [79], represent an important source of IL-17 in those patients as well [66]. Consequently, analysis of CD3⁺ CD8⁻ T cells cannot discriminate between Th17 cells and DN T cells. Moreover, DN T cells are thought to arise from CD8⁺ T cells through CD8 down-modulation upon TCR stimulation [80]. Molecular explanations for the expansion of DN T cells in SLE patients have been recently proposed by G.C. Tsokos and colleagues. They have demonstrated that increased levels of the transcription factor cAMP-responsive element modulator α (CREM α) in SLE patients [81,82] impede CD8 expression in activated CD8⁺ T lymphocytes, through repression of CD8 genes and epigenetic modifications [83,84].

Consequently, in agreement with the higher levels of IL-17 found in serum, these studies indicate that frequencies

of IL-17-producing T cells (both Th17 and DN) are increased in peripheral blood of SLE patients. Importantly, several reports have shown that these cells are also found infiltrating injured skin and kidneys, suggesting they could contribute to local IL-17 production as well [62,66,68,85]. Extension of these analyses to other target tissues in SLE would be interesting and particularly relevant in cerebrospinal fluid given the ability of Th17 to breach the blood–brain barrier [86], their crucial role in CNS autoimmunity [33,34] and their higher levels in patients with neurolyupus [63].

Finally, a study has suggested neutrophils as a major source of IL-17, accounting for about 50% of IL-17⁺ cells in skin lesions of SLE patients [87]. In this study, the authors have proposed that neutrophils release IL-17 while undergoing NETosis (NET for neutrophil extracellular traps), a particular form of cell death characterized by the active release of nuclear chromatin fibers, physiologically used to immobilize and kill extracellular pathogens. It would be thus relevant to examine the contribution of other innate cells like ILCs in the production of IL-17 in SLE. For example, group 3 natural cytotoxicity receptors (NCR) ILCs in tissues respond rapidly to IL-23 stimulation by producing IL-17 [48] and thus represent interesting candidates as IL-23 is found in injured tissues during SLE.

3.3. IL-17 induction in human SLE

Several studies have reported an elevation of IL-6 and IL-23 in both serum and tissues of patients [58,66,68,69,88], suggesting that the inflammatory environment is prone to induce IL-17-producing cells in SLE. However, the cellular mechanisms leading to high levels of IL-17 production remain unknown.

A hallmark of SLE is a defective clearance of apoptotic cells that results in secondary necrosis and release of large amounts of nuclear double-stranded DNA and RiboNucleo-Proteins (RNP). These nuclear antigens are targeted by auto-antibodies resulting in the formation of nucleic-acid-containing immune complexes (NA-IC), which trigger plasmacytoid dendritic cells (pDC) activation through Toll-like receptor 7 (TLR7) and TLR9, the TLRs for single-stranded RNA (ssRNA) and dsDNA respectively [89]. Activated pDC then migrate to peripheral lymphoid tissues and sites of inflammation where they release large quantities of IFN α [90], responsible for a characteristic IFN α -signature in blood cells of many SLE patients [4]. Data suggest that pDC also play a central role in promoting IL-17 secretion in SLE. First, *in vitro* studies have shown that, in addition to IFN α , TLR7-stimulated pDC release IL-1 β , IL-6 and IL-23, making them potent inducers of Th17 cell differentiation and amplification [91]. However, whether pDC stimulated with NA-IC from SLE patients can drive Th17 cell differentiation has not been explored yet. Second, two studies have shown that TLR9 stimulation in pDC, by DNA-LL37 and DNA-HMGB1 complexes released by neutrophils undergoing NETosis, promotes the secretion of inflammatory cytokines including IL-6 [92,93]. Unfortunately, IL-1 β and IL-23 production has not been analyzed. Third, IFN α production by pDC has been shown to promote inflammatory DC (inFDC) differentiation from monocytes in SLE patients [90]. Interestingly, a recent

paper has suggested that human monocyte-derived BDCA1⁺ CD14⁺ CD16⁻ infDC in inflammatory fluids and secondary lymphoid organs (SLO) are potent inducers of Th17 cells through production of IL-1 β , IL-6 and IL-23 upon TLR1/2 or CD40L stimulation [94]. Interestingly, these cells highly express the transcription factor interferon regulatory factor 4 (IRF4) which has recently been shown important for conferring Th17 polarization capacity to mouse and human conventional DC [95,96]. Furthermore, infDC express high levels of TLR7 and TLR8, suggestive of ssRNA responsiveness. Moreover, whether infDC described in this study are the same as those observed during SLE remains to be confirmed. Finally, as IL-23 triggers IL-17 secretion by $\gamma\delta$ T cells, group 3 ILCs and neutrophils [47,48,97], it is likely that IL-17 production by innate cells is driven by IL-23-secreting pDC and infDC in inflamed tissues of SLE patients.

In addition to pDC, monocytes may also be important producers of IL-17-inducing cytokines. First, a study has shown that hyperactivation of TANK-binding kinase 1 (TBK-1) in SLE patients favors the phosphorylation of the transcription factor IRF3. Phosphorylated-IRF3 then binds to the IL-23p19 promoter and induces IL-23 production. This is exacerbated after TLR3 stimulation, the TLR for dsRNA, which increases TBK-1 activation, suggesting a role for this receptor in SLE pathophysiology [98]. Second, anti-dsDNA/DNA immune complexes have been shown to trigger TLR9 in monocytes thus inducing NF- κ B activation and pro-IL-1 β synthesis as well as NLRP3 inflammasome formation and secretion of active IL-1 β [99]. Culture of naive CD4⁺ T lymphocytes with supernatants from anti-dsDNA/DNA-stimulated monocytes induces Th17 polarization. Finally, 6-sulfo LacNac (slan) DC, a subset of CD16⁺ monocytes [100], has been shown to be enriched in the skin of SLE patients [101]. These cells also strongly express TLR7 and TLR8, respond to SLE serum as well as ssRNA and were previously shown to be potent inducers of Th17 cells [102]. Thus, the stimulation by circulating NA-IC of TLR7 and TLR9 in pDC, TLR3 and TLR9 in monocytes, TLR7 and TLR8 in infDC and slanDC, might be responsible for creating an inflammatory milieu enriched in IL-6, IL-23 and IL-1 β , which promotes IL-17 production by T lymphocytes and innate cells (Fig. 1).

In addition, a number of alterations in T cell signaling and activation have been described in SLE patients that appear to skew their production of cytokines toward IL-17. First, studies have reported that elevated CREM α expression in T cells is responsible for the diminished production of IL-2 [103], a cytokine that impairs Th17 development [28,104], as well as for enhanced IL-17A production [105,106]. Enhanced CREM α levels in SLE are due to altered signaling and faster calcium flux. Indeed, replacement of the CD3 ζ chain with the FcR γ chain in the TCR complex in SLE results in the use of the adaptor molecule SYK instead of ZAP-70, and to the activation of CAMK4 which in turn promotes CREM α [107]. Second, enhanced expression of the costimulatory molecules signaling lymphocyte activation molecule 3 and 6 (SLAMF3 and SLAMF6) has been described on SLE T cells and promotes Th17 differentiation as well as expansion of IL-17-producing memory T cells [108]. Finally, a study has reported elevated activation of Rho-associated protein kinase (ROCK) in PBMCs of some SLE patients, and confirms that this enzyme is associated with Th17 cell differentiation in human [109].

3.4. Pathological features of IL-17 in SLE

Knowledge on IL-17 pathological properties in SLE mostly comes from studies in mouse models (Table 1 and Fig. 1) in which, as in human, IL-17 induction is a common feature. Thus, high levels of IL-17 have been observed in the MRL-Fas^{lpr/lpr} and C57BL/6-Fas^{lpr/lpr} models, in which a mutation in the Fas gene (CD95) impairs lymphocyte apoptosis and leads to spontaneous development of lupus-like pathology, with antinuclear antibodies (ANA), anti-dsDNA antibodies and renal disease [67,110,111]. In MRL-Fas^{lpr/lpr} mice, IL-17-producing DN T cells are expanded in spleen and lymph nodes and infiltrate the tubulointerstitial area in kidneys [110]. Also, dermal infiltration of IL-17⁺ cells has been found in these mice [112]. IL-17 production by DN T cells is dependent on IL-23 and transferring IL-23-stimulated DN T cells from MRL-Fas^{lpr/lpr} mice into RAG-1^{-/-} mice, which lack adaptive immunity, and is sufficient to induce nephritis. Further supporting the importance of the IL-23/IL-17 axis in lupus nephritis, IL-23R deletion in C57BL/6-Fas^{lpr/lpr} mice has resulted in less severe disease accompanied by a significant decrease of IL-17-producing DN T cells [111]. Interestingly, IL-23R-deficient mice produce less anti-dsDNA antibodies and show less immune complexes and C3 deposition in renal glomeruli. The finding that abrogation of IL-23 signaling is accompanied by significant reduction in auto-antibody production and renal deposition is intriguing as it suggests that IL-17 could provide help to auto-reactive B cells. In agreement with this, a role for IL-17 in germinal centers (GC) formation has been demonstrated in the BXD2 mouse, a strain that spontaneously develops a lupus-like disease with erosive arthritis, glomerulonephritis, auto-antibodies and immune complexes circulation [113]. In this model, elevated levels of IL-17 have been detected in the serum as well as in the spleen of mice. In the spleen, IL-17 is produced by CD4⁺ T lymphocytes in close contact to IL-17R⁺ B cells. IL-17 does not enhance B cell proliferation but rather sustains GC formation through inhibiting CXCL12 and CXCL13-dependent chemotactic migration of GC B cells [113]. Also, injection of an IL-17 coding adenoviral vector has resulted in high levels of circulating IL-17 as well as GC formation in the spleen of C57BL/6 mice [113]. Moreover, continuous IL-17 signaling is necessary to maintain the integrity of GC structures as neutralization of IL-17 has reversed their formation in sick BXD2 mice. IL-17 actions are dependent on IL-17R signaling because BXD2 *Il17r*^{-/-} mice have lower GC, auto-antibodies and renal disease [113].

The ability of IL-17 in inducing auto-antibody-mediated immune diseases has been further exemplified in Ro52^{-/-} (*Trim21*^{-/-}) mice [114]. Following slight tissue injury due to ear tagging, Ro52-deficient mice present an increase in IRF3 and IRF5 activation resulting from a loss of Ro52-mediated ubiquitination. This leads to subsequent pro-inflammatory cytokines production, including mostly IL-17 but not IFN γ or IL-4. Mice then develop systemic autoimmunity with ANA and anti-dsDNA antibodies production, skin disease and nephropathy characterized by immune complex deposition in kidneys. Pathologic features are abrogated in Ro52 and IL-23 double-deficient animals, highlighting the role of the IL-23/IL-17 axis in this model.

Finally, the role of IL-17 cytokines in SLE has been recently addressed more directly in *Fcgr2b*^{-/-} mice. The lack of this inhibitory receptor is responsible for the loss of B cell

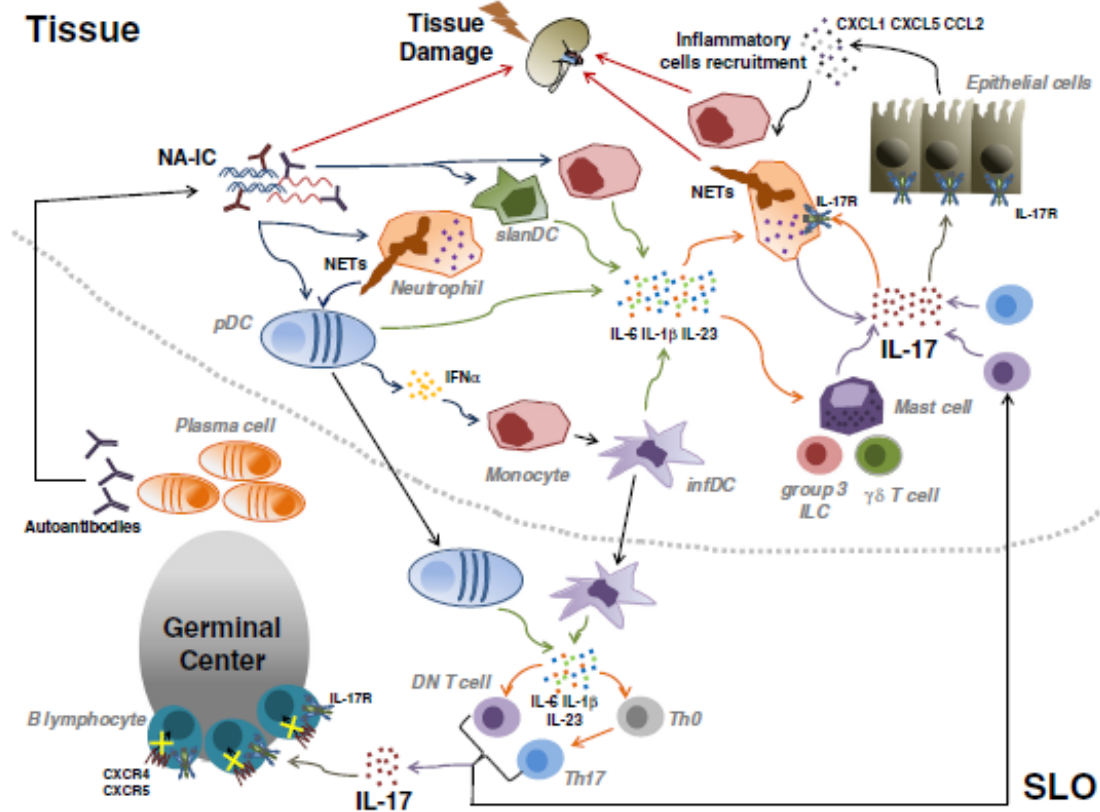


Figure 1 Proposed mechanisms for IL-17 induction and pathological features during SLE. NA-IC act on neutrophils to induce NET formation which, in conjunction with NA-IC, stimulate TLR7 and 9 in pDCs to produce IFN α . IFN α promotes the differentiation of monocytes into infDC which are in turn activated by NA-IC through TLR7 and 8. Both activated pDC and infDC produce the inflammatory cytokines IL-6, IL-1 β and IL-23 in SLO and induce the differentiation of naive CD4 $^+$ T cells into Th17 as well as the production of IL-17 by DN T lymphocytes. IL-17-producing Th17 and DN T cells then infiltrate target tissues like skin and kidneys. In addition, NA-IC stimulate TLR3 and 9 in monocytes and TLR7 and 8 in slanDC and infDC. Activated pDC, monocytes, slanDC and infDC produce huge amounts of IL-6, IL-1 β and IL-23 and induce IL-17 production by tissue group 3 ILCs, mast cells and $\gamma\delta$ T cells. IL-17 in target tissues acts on epithelial cells and induces the secretion of the pro-inflammatory chemokines CXCL1, CCL2 and CXCL5 that further recruit circulating monocytes and neutrophils. By acting directly on neutrophils, IL-17 also supports NET formation. In SLO, IL-17 sustains GC formation through inhibiting CXCR4 and CXCR5 signaling in B cells. This favors the generation of auto-antibodies-producing long-lived plasma cells. Auto-antibodies bind to nuclear antigens and form additional NA-IC, creating a vicious circle. NA-IC deposition and inflammatory cells cause tissue injury in target tissues. NA-IC: nucleic-acid-containing immune complexes; NET: neutrophils extracellular traps; TLRs: Toll-like receptors; pDCs: plasmacytoid dendritic cells; infDCs: inflammatory dendritic cells; SLO: secondary lymphoid organs; DN T lymphocytes: double-negative T lymphocytes; slanDC: 6-sulfo LacNAc dendritic cells; ILCs: innate lymphoid cells; GC: germinal centers.

tolerance leading to auto-antibodies formation and fatal lupus-like glomerulonephritis [115]. Fc γ R1b-deficient mice also present an increase in IL-17 and IL-17-producing CD4 $^+$ and DN T lymphocytes in lymph nodes, and to a lesser extent in spleen. In this study, the authors have evaluated the role of IL-17 cytokines through analysis of Fcgr2b $^{-/-}$ mice also deficient in Act1 (encoded by Traf3ip2), the crucial adaptor molecule downstream the IL-17RA/IL-17RC complex. Like in the BXD2 strain, IL-17 is important for spontaneous GC development in Fcgr2b $^{-/-}$ mice, as their formation is significantly reduced Fcgr2b $^{-/-}$ Traf3ip2 $^{-/-}$ animals. However, no changes in ANA, anti-dsDNA and anti-snRNP titers or

isotypes have been observed, suggesting that IL-17 is required for GC formation but not for auto-antibody production, a finding already described in C57BL/6 injected with the IL-17 encoding adenovirus [113]. Surprisingly, specific deletion of IL-17A in Fcgr2b $^{-/-}$ mice has no impact on spontaneous GC formation, suggesting compensation by IL-17F, although it has not been formally demonstrated. Importantly, IL-17A deletion significantly reduces inflammatory monocytes and neutrophils infiltration and thus severity of glomerulonephritis. IL-17A induces the expression of the monocyte and neutrophil-attracting chemokines CXCL1, CXCL5 and CCL2, probably in synergy with TNF α , and favors

Table 1 Pathophysiological findings on IL-17 in SLE obtained from mouse models.

Mouse models for SLE	Main findings on IL-17 roles in SLE pathophysiology	References
MRL-Fas ^{lpr/lpr}	<ul style="list-style-type: none"> • Expansion of IL-17 producing DN T cells in spleen and lymph nodes • Infiltration of tubulointerstitial area in kidneys by IL-17⁺ DN T cells • Dermal infiltration by IL-17⁺ cells • Nephritis induction after transfer of IL-23-stimulated DN T cells in RAG1^{-/-} recipients 	[110,112]
C57BL/6-Fas ^{lpr/lpr}	<ul style="list-style-type: none"> • Deletion of IL-23R decreases IL-17⁺ DN T cells and leads to less severe disease • Deletion of IL-23R leads to less anti-dsDNA antibodies formation and less immune complexes and C3 deposition in renal glomeruli 	[111]
BXD2	<ul style="list-style-type: none"> • Elevated IL-17 levels in serum and spleen • IL-17⁺ CD4⁺ T cells sustain GC formation in the spleen • Blockade of IL-17 reverse GC formation in sick mice • Lower levels of GC, auto-antibodies and renal disease in BXD2 IL-17R^{-/-} mice 	[113]
C57BL/6 injected with an IL-17 coding adenoviral vector	<ul style="list-style-type: none"> • GC formation • No auto-antibodies induction 	[113]
Ro52 ^{-/-}	<ul style="list-style-type: none"> • High levels of IL-17 production with ANA, anti-dsDNA production, skin and renal diseases with immune complexes deposition after slight tissue injury • Abrogation of IL-17 production and pathological features in Ro52^{-/-} IL-23^{-/-} mice 	[114]
Fcgr2b ^{-/-}	<ul style="list-style-type: none"> • Increased IL-17-producing DN and CD4⁺ T cells in lymph nodes and spleen • Reduction of GC formation but not of auto-antibodies titers in mice deficient for IL-17R signaling (Fcgr2b^{-/-} Traf3ip2^{-/-}) • High levels of IL-17A and IL-17C expression in kidneys • Induction of monocytes and neutrophils recruiting chemokines by IL-17A in kidneys • NET formation favored by IL-17A • Reduction of glomerulonephritis in Fcgr2b^{-/-} IL-17a^{-/-} mice 	[115]

DN T cells: double-negative T cells; anti-dsDNA: anti-double-stranded deoxyribonucleic acid; GC: germinal centers; ANA: antinuclear antibodies; NET: neutrophils extracellular traps.

NET formation [115]. Also, the authors have suggested that recruitment of DN T cells mostly depends on IL-17C produced by epithelial cells, as only IL-17A and IL-17C are highly expressed in kidneys and recruitment of these cells is not impaired in *Fcgr2b^{-/-} Il17a^{-/-}* mice.

Taken together, these studies highlight the role of the IL-23/IL-17 axis in mediating pathological autoimmunity in murine models of SLE. IL-17 consistently supports GC formation, even if conflicting results have been obtained for its role in auto-antibodies induction. Interestingly, IL-17-dependent GC formation is not unique to SLE as ectopic lymphoid follicle formation in EAE and IgA-producing GC in Peyer's patches have also been shown to critically depend on IL-17 [116,117]. In addition, pro-inflammatory properties of IL-17 are also crucial in lupus nephritis. However, whether IL-17 also supports pathological inflammation in other target organs of SLE like skin and CNS warrants further investigations.

4. Therapeutic targeting of IL-17 in human immune-mediated inflammatory diseases

IL-17 has not yet been therapeutically targeted in human SLE but data from recent clinical trials in other IMIDs can partially inform us about the efficacy and safety of targeting this cytokine in human disease.

IL-17 can be indirectly targeted by ustekinumab, a monoclonal antibody directed against the common p40 subunit of IL-23 and IL-12 and thus expected to inhibit both Th17 and Th1 responses. In line with the role of IL-23 and downstream cytokines such as IL-17 and IL-22 in experimental psoriasis in animal models [118,119], ustekinumab has been successfully tested in phase II and III trials in psoriasis [120,121] and more recently psoriatic arthritis [122,123] and is registered for these indications. An open-label pilot study has also suggested clinical efficacy in the related disease, ankylosing spondylitis [124]. In contrast, p40 blockade by ustekinumab in Crohn's disease has yielded mixed results with only the anti-TNF refractory subgroup showing improvement [125,126]. The overall safety profile looks favorable, although long-term data are only available for psoriasis. In the context of the potential benefits of this drug for SLE, it is interesting to note that three case reports indicate significant improvement of cutaneous lupus upon ustekinumab treatment [127–129].

Drugs directly targeting IL-17 include secukinumab and ixekinumab, both monoclonal antibodies directed towards IL-17A, and brodalumab, a monoclonal antibody towards IL-17RA. All three drugs have major clinical efficacy in psoriasis [130–133]. Secukinumab has also demonstrated proof-of-concept (PoC) clinical efficacy in ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis and multiple sclerosis [134–136]. In contrast, anti-IL-17A treatment has only shown modest

clinical efficacy in rheumatoid arthritis [137,138] and no efficacy in Crohn's disease [139]. Although these PoC trials with the different IL-17 blockers have not revealed unexpected safety signals, the exposure (both in terms of number of patients and time of treatment) is probably not yet sufficient to reach solid conclusions. There are currently no publically available data on the use of these IL-17 blockers in SLE or related diseases such as cutaneous lupus or Sjögrens syndrome.

5. Conclusions

Accumulating lines of evidence suggest a role for IL-17 in the pathophysiology of SLE. The constant production of NA-IC, responsible for a chronic stimulation of several PRRs like TLR7, 8 and 9, creates an environment characterized by the release of inflammatory cytokines, which, combined with a number of cell-intrinsic alterations, promotes the production of IL-17 by T lymphocytes. In addition, those inflammatory cytokines, and particularly IL-23, are likely to induce IL-17 secretion by a number of innate cells including neutrophils, group 3 ILCs and mast cells in tissues. Nevertheless, the exact contribution, as well as the tissue specificities, of these cells deserves further exploration in SLE. Moreover, as discussed above, IL-17 properties are largely dependent on the environment in which the cytokine is produced [136]. Thus, although numerous studies have described high levels of IL-17 in serum, skin and kidneys of SLE patients, future studies should examine in greater detail the tissue context and associated cytokines of IL-17 secretion. Interestingly, the importance of the IL-23/IL-17 axis also seems to hold true in the SLE-related disease Sjögren's syndrome (SS) [140]. Indeed, high levels of IL-17 were found in serum and salivary glands of SS patients, and mouse models suggested a key function in sialadenitis generation [141,142]. Very importantly, animal studies directly addressing IL-17/IL-17R axis in lupus-like models suggested a crucial role of this pathway in sustaining auto-reactive GC formation and organ damage. The most convincing results were obtained in kidneys as abrogating IL-17R signaling prevented the development of lupus nephritis in two mouse models [113,115]. This is of particular importance given the severity of lupus nephritis in human. Thus, both human descriptive and mouse pre-clinical studies have provided solid proofs for a role of IL-17 in SLE. It is now critical to clearly demonstrate in mouse models the efficiency of selective IL-17/IL-17R pathway inhibitors, including monoclonal anti-IL-17 and anti-IL-17R antibodies already available. In parallel, it is critical to start planning PoC studies in human SLE as several compounds targeting IL-17 have demonstrated marked clinical efficacy in other human IMIDs and did not show unexpected short-term safety concerns. Although these efficacy and safety data cannot be extrapolated to SLE, the encouraging case reports of ustekinumab treatment in cutaneous lupus [127–129] support the initiation of PoC trials in SLE.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

We thank Kristine Germar (Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands) for help in editing the manuscript.

References

- [1] G.C. Tsokos, Systemic lupus erythematosus, *N. Engl. J. Med.* 365 (2011) 2110–2121.
- [2] G.J. Pons-Estel, G.S. Alarcón, L. Scofield, L. Reinlib, G.L. Cooper, Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus, *Semin. Arthritis Rheum.* 3 (2010) 257–268.
- [3] Z. Liu, A. Davidson, Taming lupus—a new understanding of pathogenesis is leading to clinical advances, *Nat. Med.* 1 (2012) 871–882.
- [4] L. Bennett, A.K. Palucka, E. Arce, V. Cantrell, J. Borvak, J. Banchereau, et al., Interferon and granulopoiesis signature in systemic lupus erythematosus blood, *J. Exp. Med.* 19 (2003) 711–723.
- [5] G. Murphy, L. Lisnevskaja, D. Isenberg, Systemic lupus erythematosus and other autoimmune rheumatic disease challenges to treatment, *Lancet* 382 (2013) 809–818.
- [6] S.V. Navarra, R.M. Guzmán, A.E. Gallacher, S. Hall, R.A. Levy, R.E. Jimenez, et al., Efficacy and safety of belimumab in patients with active systemic lupus erythematosus: a randomised placebo-controlled, phase 3 trial, *Lancet* 377 (2011) 721–731.
- [7] R. Furie, M. Petri, O. Zamani, R. Cervera, D.J. Wallace, I. Tegzová, et al., A phase III, randomized, placebo-controlled study of belimumab, a monoclonal antibody that inhibits B lymphocyte stimulator, in patients with systemic lupus erythematosus, *Arthritis Rheum.* 63 (2011) 3918–3930.
- [8] Y. Yao, L. Richman, B.W. Higgs, C.A. Morehouse, M. de la Reyes, P. Brohawn, et al., Neutralization of interferon-alpha beta-inducible genes and downstream effect in a phase I trial of an anti-interferon-alpha monoclonal antibody in systemic lupus erythematosus, *Arthritis Rheum.* 60 (2009) 1785–1796.
- [9] G.G. Illei, Y. Hirota, C.H. Yarboro, J. Daruwalla, E. Tacke, K. Takada, et al., Tocilizumab in systemic lupus erythematosus: data on safety, preliminary efficacy, and impact on circulating plasma cells from an open-label phase I dosage escalation study, *Arthritis Rheum.* 62 (2010) 542–552.
- [10] E. Rouvier, M.F. Luciano, M.G. Mattéi, F. Denizot, P. Golstein, CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to herpesvirus saimiri gene, *J. Immunol.* 150 (1993) 5445–5454.
- [11] C.T. Weaver, R.D. Hatton, P.R. Mangan, L.E. Harrington, IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector cell lineages, *Annu. Rev. Immunol.* 25 (2007) 821–852.
- [12] S.L. Gaffen, Structure and signalling in the IL-17 receptor family, *Nat. Rev. Immunol.* 9 (2009) 556–567.
- [13] C. Liu, W. Qian, Y. Qian, N.V. Giltiay, Y. Lu, S. Swaidani, et al., Act1, a U-box E3 ubiquitin ligase for IL-17 signaling, *Sci. Signal.* (2009) ra63.
- [14] J. Hartupece, C. Liu, M. Novotny, X. Li, T. Hamilton, IL-1 enhances chemokine gene expression through mRNA stabilization, *J. Immunol.* 179 (2007) 4135–4141.
- [15] S. Zhu, Y. Qian, IL-17/IL-17 receptor system in autoimmune disease: mechanisms and therapeutic potential, *Clin. Sci. (Lond.)* 122 (2012) 487–511.
- [16] K. Bulek, C. Liu, S. Swaidani, L. Wang, R.C. Page, M.F. Guler, et al., The inducible kinase IKKi is required for IL-17-dependent signaling associated with neutrophilia and pulmonary inflammation, *Nat. Immunol.* 12 (2011) 844–852.
- [17] D. Sun, M. Novotny, K. Bulek, C. Liu, X. Li, T. Hamilton, Treatment with IL-17 prolongs the half-life of chemokine

- CXCL1 mRNA via the adaptor TRAF5 and the splicing-regulatory factor SF2 (ASF), *Nat. Immunol.* 12 (2011) 853–860.
- [18] C.T. Weaver, C.O. Elson, L.A. Fouser, J.K. Kolls, The Th17 pathway and inflammatory diseases of the intestines, lungs, and skin, *Annu. Rev. Pathol.* 8 (2013) 477–512.
- [19] A. Puel, R. Döfninger, A. Natividad, M. Chrabieh, G. Barcenas-Morales, C. Picard, et al., Autoantibodies against IL-17A, IL-17F, and IL-22 in patients with chronic mucocutaneous candidiasis and autoimmune polyendocrine syndrome type I, *J. Exp. Med.* 207 (2010) 291–297.
- [20] A. Puel, S. Cypowyj, J. Bustamante, J.F. Wright, L. Liu, H.K. Lim, et al., Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity, *Science* 332 (2011) 65–68.
- [21] L. Liu, S. Okada, X.-F. Kong, A.Y. Kreins, S. Cypowyj, A. Abhyankar, et al., Gain-of-function human STAT1 mutations impair IL-17 immunity and underlie chronic mucocutaneous candidiasis, *J. Exp. Med.* 208 (2011) 1635–1648.
- [22] B. Boisson, C. Wang, V. Pedergrana, L. Wu, S. Cypowyj, M. Rybojad, et al., An ACT1 mutation selectively abolishes interleukin-17 responses in humans with chronic mucocutaneous candidiasis, *Immunity* 39 (2013) 676–686.
- [23] C.S. Ma, G.Y.J. Chew, N. Simpson, A. Priyadarshi, M. Wong, B. Grimbacher, et al., Deficiency of Th17 cells in hyper IgE syndrome due to mutations in STAT3, *J. Exp. Med.* 205 (2008) 1551–1557.
- [24] F. Fossiez, O. Djossou, P. Chomarat, L. Flores-Romo, S. Ait-Yahia, C. Maat, et al., T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines, *J. Exp. Med.* 183 (1996) 2593–2603.
- [25] L.E. Harrington, R.D. Hatton, P.R. Mangan, H. Tumer, T.L. Murphy, K.M. Murphy, et al., Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages, *Nat. Immunol.* 6 (2005) 1123–1132.
- [26] H. Park, Z. Li, X.O. Yang, S.H. Chang, R. Nurieva, Y.-H. Wang, et al., A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17, *Nat. Immunol.* 6 (2005) 1133–1141.
- [27] I.I. Ivanov, B.S. McKenzie, L. Zhou, C.E. Tadokoro, A. Lepelletier, J.J. Lafaille, et al., The orphan nuclear receptor ROR γ mat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells, *Cell* 126 (2006) 1121–1133.
- [28] E. Bettelli, Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T.B. Strom, M. Oukka, et al., Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells, *Nature* 441 (2006) 235–238.
- [29] P.R. Mangan, L.E. Harrington, D.B. O'Quinn, W.S. Helms, D.C. Bullard, C.O. Elson, et al., Transforming growth factor- β induces development of the T(H)17 lineage, *Nature* 441 (2006) 231–234.
- [30] M. Veldhoen, R.J. Hocking, C.J. Atkins, R.M. Locksley, B. Stockinger, TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells, *Immunity* 24 (2006) 179–189.
- [31] E. Volpe, N. Servant, R. Zollinger, S.I. Bogiatzi, P. Hupé, E. Barillot, et al., A critical function for transforming growth factor- β , interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses, *Nat. Immunol.* 9 (2008) 650–657.
- [32] M.J. McGeachy, Y. Chen, C.M. Tato, A. Laurence, B. Joyce-Shaikh, W.M. Blumenschein, et al., The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo, *Nat. Immunol.* 10 (2009) 314–324.
- [33] D.J. Cua, J. Sherlock, Y. Chen, C.A. Murphy, B. Joyce, B. Seymour, et al., Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain, *Nature* 421 (2003) 744–748.
- [34] C.L. Langrish, Y. Chen, W.M. Blumenschein, J. Mattson, B. Basham, J.D. Sedgwick, et al., IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation, *J. Exp. Med.* 201 (2005) 233–240.
- [35] C.A. Murphy, C.L. Langrish, Y. Chen, W. Blumenschein, T. McClanahan, R.A. Kastelein, et al., Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation, *J. Exp. Med.* 198 (2003) 1951–1957.
- [36] M.J. McGeachy, K.S. Bak-Jensen, Y. Chen, C.M. Tato, W. Blumenschein, T. McClanahan, et al., TGF- β 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 (2007) 1390–1397.
- [37] E. Esplugues, S. Huber, N. Gagliani, A.E. Hauser, T. Town, Y.Y. Wan, et al., Control of TH17 cells occurs in the small intestine, *Nature* 475 (2011) 514–518.
- [38] M.E. Zielinski, F. Mele, D. Aschenbrenner, D. Jarrossay, F. Ronchi, M. Gattorno, et al., Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN- γ or IL-10 and are regulated by IL-1 β , *Nature* 484 (2012) 514–518.
- [39] M. El-Behi, B. Ciric, H. Dai, Y. Yan, M. Cullimore, F. Safavi, et al., The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF, *Nat. Immunol.* 12 (2011) 568–575.
- [40] L. Codarri, G. Gyölvézi, V. Tosevski, L. Hesske, A. Fontana, L. Magnenat, et al., ROR- γ t drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation, *Nat. Immunol.* 12 (2011) 560–567.
- [41] Y. Lee, A. Awasthi, N. Yosef, F.J. Quintana, S. Xiao, A. Peters, et al., Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells, *Nat. Immunol.* 13 (2012) 991–999.
- [42] K. Hirota, J.H. Duarte, M. Veldhoen, E. Homsby, Y. Li, D.J. Cua, et al., Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses, *Nat. Immunol.* 12 (2011) 255–263.
- [43] S.C. Liang, X.-Y. Tan, D.P. Luxenberg, R. Karim, K. Dunussi-Joannopoulos, M. Collins, et al., Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides, *J. Exp. Med.* 203 (2006) 2271–2279.
- [44] K. Wolk, H.S. Haugen, W. Xu, E. Witte, K. Waggie, M. Anderson, et al., IL-22 and IL-20 are key mediators of the epidermal alterations in psoriasis while IL-17 and IFN- γ are not, *J. Mol. Med.* 87 (2009) 523–536.
- [45] G.F. Sonnenberg, M.G. Nair, T.J. Kirn, C. Zaph, L.A. Fouser, D. Artis, Pathological versus protective functions of IL-22 in airway inflammation are regulated by IL-17A, *J. Exp. Med.* 207 (2010) 1293–1305.
- [46] A. Peters, Y. Lee, V.K. Kuchroo, The many faces of Th17 cells, *Curr. Opin. Immunol.* 23 (2011) 702–706.
- [47] D.J. Cua, C.M. Tato, Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system, *Nat. Rev. Immunol.* 10 (2010) 479–489.
- [48] C.E. Sutton, L.A. Mielke, K.H.G. Mills, IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells and innate lymphoid cells, *Eur. J. Immunol.* 42 (2012) 2221–2231.
- [49] T.J. Kenna, M.A. Brown, The role of IL-17-secreting mast cells in inflammatory joint disease, *Nat. Rev. Rheumatol.* 9 (2013) 375–379.
- [50] J.P. Sherlock, B. Joyce-Shaikh, S.P. Turner, C.-C. Chao, M. Sathe, J. Grein, et al., IL-23 induces spondyloarthritis by acting on ROR- γ t + CD3 + CD4-CD8- entheseal resident T cells, *Nat. Med.* 18 (2012) 1069–1076.
- [51] H. Appel, R. Maier, P. Wu, R. Scheer, A. Hempfing, R. Kayser, et al., Analysis of IL-17(+) cells in facet joints of patients with spondyloarthritis suggests that the innate immune pathway might be of greater relevance than the Th17-mediated adaptive immune response, *Arthritis Res. Ther.* 13 (2011) R95.

- [52] T. Noordenbos, N. Yeremenko, I. Gofita, M. van de Sande, P.P. Tak, J.D. Cañete, et al., Interleukin-17-positive mast cells contribute to synovial inflammation in spondylarthritis, *Arthritis Rheum.* 64 (2012) 99–109.
- [53] T.J. Kenna, S.I. Davidson, R. Duan, L.A. Bradbury, J. McFarlane, M. Smith, et al., Enrichment of circulating interleukin-17-secreting interleukin-23 receptor-positive γ/δ T cells in patients with active ankylosing spondylitis, *Arthritis Rheum.* 64 (2012) 1420–1429.
- [54] E. Sánchez, B. Rueda, J.L. Callejas, J.M. Sabio, N. Ortego-Centeno, J. Jimenez-Alonso, et al., Analysis of interleukin-23 receptor (IL23R) gene polymorphisms in systemic lupus erythematosus, *Tissue Antigens* 70 (2007) 233–237.
- [55] H.-S. Kim, I. Kim, J.O. Kim, J.S. Bae, H.D. Shin, S.-C. Bae, No association between interleukin 23 receptor gene polymorphisms and systemic lupus erythematosus, *Rheumatol. Int.* 30 (2009) 33–38.
- [56] A.L. Sestak, B.G. Fürtrohr, J.B. Harley, J.T. Merrill, B. Namjou, The genetics of systemic lupus erythematosus and implications for targeted therapy, *Ann. Rheum. Dis.* 70 (Suppl. 1) (2011) i37–i43.
- [57] B. Yu, M. Guan, Y. Peng, Y. Shao, C. Zhang, X. Yue, et al., Copy number variations of interleukin-17 F, interleukin-21, and interleukin-22 are associated with systemic lupus erythematosus, *Arthritis Rheum.* 63 (2011) 3487–3492.
- [58] C.K. Wong, L.C.W. Lit, L.S. Tam, E.K.M. Li, P.T.Y. Wong, C.W.K. Lam, Hyperproduction of IL-23 and IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus: implications for Th17-mediated inflammation in auto-immunity, *Clin. Immunol.* 127 (2008) 385–393.
- [59] F. Cheng, Z. Guo, H. Xu, D. Yan, Q. Li, Decreased plasma IL22 levels, but not increased IL17 and IL23 levels, correlate with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus, *Ann. Rheum. Dis.* 68 (2009) 604–606.
- [60] X.Q. Chen, Y.C. Yu, H.H. Deng, J.Z. Sun, Z. Dai, Y.W. Wu, et al., Plasma IL-17A is increased in new-onset SLE patients and associated with disease activity, *J. Clin. Immunol.* 30 (2010) 221–225.
- [61] X.-F. Zhao, H.-F. Pan, H. Yuan, W.-H. Zhang, X.-P. Li, G.-H. Wang, et al., Increased serum interleukin 17 in patients with systemic lupus erythematosus, *Mol. Biol. Rep.* 37 (2010) 81–85.
- [62] C. Tanasescu, E. Balanescu, P. Balanescu, R. Olteanu, C. Badea, C. Grancea, et al., IL-17 in cutaneous lupus erythematosus, *Eur. J. Intern. Med.* 21 (2010) 202–207.
- [63] F.B. Vincent, M. Northcott, A. Hoi, F. Mackay, E.F. Morand, Clinical associations of serum interleukin-17 in systemic lupus erythematosus, *Arthritis Res. Ther.* 15 (2013) R97.
- [64] X. Yang, H. Wang, X. Zhao, L. Wang, Q. Lv, Q. Wang, Th22, but not Th17 might be a good index to predict the tissue involvement of systemic lupus erythematosus, *J. Clin. Immunol.* 33 (2013) 767–774.
- [65] K. Kurasawa, K. Hirose, H. Sano, H. Endo, H. Shinkai, Y. Nawata, et al., Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis, *Arthritis Rheum.* 43 (2000) 2455–2463.
- [66] J.C. Crispin, M. Oukka, G. Bayliss, R.A. Cohen, C.A. Van Beek, I.E. Stillman, et al., Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys, *J. Immunol.* 181 (2008) 8761–8766.
- [67] J. Yang, Y. Chu, X. Yang, D. Gao, L. Zhu, X. Yang, et al., Th17 and natural Treg cell population dynamics in systemic lupus erythematosus, *Arthritis Rheum.* 60 (2009) 1472–1483.
- [68] S.H. Oh, H.J. Roh, J.E. Kwon, S.H. Lee, J.Y. Kim, H.J. Choi, et al., Expression of interleukin-17 is correlated with interferon- α expression in cutaneous lesions of lupus erythematosus, *Clin. Exp. Dermatol.* 36 (2011) 512–520.
- [69] K. Shah, W.-W. Lee, S.-H. Lee, S.H. Kim, S.W. Kang, J. Craft, et al., Dysregulated balance of Th17 and Th1 cells in systemic lupus erythematosus, *Arthritis Res. Ther.* 12 (2010) R53.
- [70] S. Dolff, M. Bijl, M.G. Huitema, P.C. Limburg, C.G.M. Kallenberg, W.H. Abdulahad, Disturbed Th1, Th2, Th17 and T(reg) balance in patients with systemic lupus erythematosus, *Clin. Immunol.* 141 (2011) 197–204.
- [71] Q. Xing, B. Wang, H. Su, J. Cui, J. Li, Elevated Th17 cells are accompanied by FoxP3+ Treg cells decrease in patients with lupus nephritis, *Rheumatol. Int.* 32 (2012) 949–958.
- [72] E.V. Acosta-Rodriguez, L. Rivino, J. Geginat, D. Jarrossay, M. Gattomo, A. Lanzavecchia, et al., Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells, *Nat. Immunol.* 8 (2007) 639–646.
- [73] H.-F. Pan, X.-F. Zhao, H. Yuan, W.-H. Zhang, X.-P. Li, G.-H. Wang, et al., Decreased serum IL-22 levels in patients with systemic lupus erythematosus, *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 401 (2009) 179–180.
- [74] L. Zhao, Z. Jiang, Y. Jiang, N. Ma, K. Wang, Y. Zhang, et al., IL-22 + CD4+ T-cells in patients with active systemic lupus erythematosus, *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 238 (2013) 193–199.
- [75] T. Duhon, R. Geiger, D. Jarrossay, A. Lanzavecchia, F. Sallusto, Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells, *Nat. Immunol.* 10 (2009) 857–863.
- [76] S. Trifari, C.D. Kaplan, E.H. Tran, N.K. Crellin, H. Spits, Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells, *Nat. Immunol.* 10 (2009) 864–871.
- [77] S. Huber, N. Gagliani, L.A. Zewewicz, F.J. Huber, L. Bosurgi, B. Hu, et al., IL-22BP is regulated by the inflammasome and modulates tumorigenesis in the intestine, *Nature* 491 (2012) 259–263.
- [78] J.C. Martin, G. Bériou, M. Heslan, C. Chauvin, L. Utriainen, A. Aumeunier, et al., Interleukin-22 binding protein (IL-22BP) is constitutively expressed by a subset of conventional dendritic cells and is strongly induced by retinoic acid, *Mucosal Immunol.* 7 (2013) 101–113.
- [79] S. Shivakumar, G.C. Tsokos, S.K. Datta, T cell receptor alpha/beta expressing double-negative (CD4-/CD8-) and CD4+ T helper cells in humans augment the production of pathogenic anti-DNA autoantibodies associated with lupus nephritis, *J. Immunol.* 143 (1989) 103–112.
- [80] J.C. Crispin, G.C. Tsokos, Human TCR-alpha beta+ CD4- CD8- T cells can derive from CD8+ T cells and display an inflammatory effector phenotype, *J. Immunol.* 183 (2009) 4675–4681.
- [81] E.E. Solomou, Y.T. Juang, M.F. Gourley, G.M. Kammer, G.C. Tsokos, Molecular basis of deficient IL-2 production in T cells from patients with systemic lupus erythematosus, *J. Immunol.* 166 (2001) 4216–4222.
- [82] V.C. Kytaris, Y. Wang, Y.T. Juang, A. Weinstein, G.C. Tsokos, cAMP response element modulator α expression in patients with systemic lupus erythematosus, *Lupus* 15 (2006) 840–844.
- [83] C.M. Hedrich, T. Rauen, J.C. Crispin, T. Koga, C. Ioannidis, M. Zajdel, et al., cAMP-responsive element modulator α (CREM α) trans-represses the transmembrane glycoprotein CD8 and contributes to the generation of CD3 + CD4-CD8- T cells in health and disease, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 31880–31887.
- [84] C.M. Hedrich, J.C. Crispin, T. Rauen, C. Ioannidis, T. Koga, N. Rodriguez Rodriguez, et al., cAMP responsive element modulator (CREM) α mediates chromatin remodeling of CD8 during the generation of CD3+CD4-CD8- T cells, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 1880–1887.
- [85] Y. Wang, S. Ito, Y. Chino, D. Goto, I. Matsumoto, H. Murata, et al., Laser microdissection-based analysis of cytokine balance in the kidneys of patients with lupus nephritis, *Clin. Exp. Immunol.* 159 (2010) 1–10.
- [86] H. Kebir, K. Kreymborg, I. Ifergan, A. Dodelet-Devillers, R. Cayrol, M. Bernard, et al., Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation, *Nat. Med.* 13 (2007) 1173–1175.

- [87] E. Villanueva, S. Yalavarthi, C.C. Berthier, J.B. Hodgins, R. Khandpur, A.M. Lin, et al., Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus, *J. Immunol.* 187 (2011) 538–552.
- [88] M. Linker-Israeli, R.J. Deans, D.J. Wallace, J. Prehn, T. Ozeri-Chen, J.R. Klinenberg, Elevated levels of endogenous IL-6 in systemic lupus erythematosus. A putative role in pathogenesis, *J. Immunol.* 147 (1991) 117–123.
- [89] F.J. Barrat, T. Meeker, J. Gregorio, J.H. Chan, S. Uematsu, S. Akira, et al., Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus, *J. Exp. Med.* 202 (2005) 1131–1139.
- [90] P. Blanco, A.K. Palucka, M. Gill, V. Pascual, J. Banchereau, Induction of dendritic cell differentiation by IFN- α in systemic lupus erythematosus, *Science* 294 (2001) 1540–1543.
- [91] C.-F. Yu, W.-M. Peng, J. Oldenburg, J. Hoch, T. Bieber, A. Limmer, et al., Human plasmacytoid dendritic cells support Th17 cell effector function in response to TLR7 ligation, *J. Immunol.* 184 (2010) 1159–1167.
- [92] G.S. Garcia-Romo, S. Caielli, B. Vega, J. Connolly, F. Allantaz, Z. Xu, et al., Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus, *Sci. Transl. Med.* 3 (2011) 73ra20.
- [93] R. Lande, D. Ganguly, V. Facchinetti, L. Frasca, C. Conrad, J. Gregorio, et al., Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus, *Sci. Transl. Med.* 3 (2011) 73ra19.
- [94] E. Segura, M. Touzot, A. Bohineust, A. Cappuccio, G. Chiochia, A. Hosmalin, et al., Human inflammatory dendritic cells induce Th17 differentiation, *Immunity* 38 (2013) 336–348.
- [95] E.K. Persson, H. Uronen-Hansson, M. Semmrich, A. Rivollier, K. Hägerbrand, J. Marsal, et al., IRF4 transcription-factor-dependent CD103⁺CD11b⁺ dendritic cells drive mucosal T helper 17 cell differentiation, *Immunity* 38 (2013) 958–969.
- [96] A. Schlitzer, N. McGovern, P. Teo, T. Zelante, K. Atarashi, D. Low, et al., IRF4 transcription factor-dependent CD11b⁺ dendritic cells in human and mouse control mucosal IL-17 cytokine responses, *Immunity* 38 (2013) 970–983.
- [97] P.R. Taylor, S. Roy, S.M. Leal Jr., Y. Sun, S.J. Howell, B.A. Cobb, et al., Activation of neutrophils by autocrine IL-17A-IL-17RC interactions during fungal infection is regulated by IL-6, IL-23, ROR γ t and dectin-2, *Nat. Immunol.* 15 (2013) 143–151.
- [98] S. Smith, J.N. Gabhann, R. Higgs, K. Stacey, M. Wahren-Herlenius, A. Espinosa, et al., Enhanced interferon regulatory factor 3 binding to the interleukin-23p19 promoter correlates with enhanced interleukin-23 expression in systemic lupus erythematosus, *Arthritis Rheum.* 64 (2012) 1601–1609.
- [99] M.S. Shin, Y. Kang, N. Lee, E.R. Wahl, S.H. Kim, K.S. Kang, et al., Self double-stranded (ds)DNA induces IL-1 β production from human monocytes by activating NLRP3 inflammasome in the presence of anti-dsDNA antibodies, *J. Immunol.* 190 (2013) 1407–1415.
- [100] J. Cros, N. Cagnard, K. Woollard, N. Patey, S.-Y. Zhang, B. Senechal, et al., Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors, *Immunity* 33 (2010) 375–386.
- [101] A. Hänsel, C. Günther, W. Baran, M. Bidier, H.-M. Lorenz, M. Schmitz, et al., Human 6-sulfo LacNAc (sIa) dendritic cells have molecular and functional features of an important pro-inflammatory cell type in lupus erythematosus, *J. Autoimmun.* 40 (2013) 1–8.
- [102] A. Hänsel, C. Günther, J. Ingwersen, J. Starke, M. Schmitz, M. Bachmann, et al., Human sIa (6-sulfo LacNAc) dendritic cells are inflammatory dermal dendritic cells in psoriasis and drive strong TH17/TH1 T-cell responses, *J. Allergy Clin. Immunol.* 127 (2011) 787–794 (e1–9).
- [103] J. Alcocer-Varela, D. Alarcón-Segovia, Decreased production of and response to interleukin-2 by cultured lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus, *J. Clin. Invest.* 69 (1982) 1388–1392.
- [104] A. Laurence, C.M. Tato, T.S. Davidson, Y. Kanno, Z. Chen, Z. Yao, et al., Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation, *Immunity* 26 (2007) 371–381.
- [105] C.M. Hedrich, J.C. Crispin, T. Rauen, C. Ioannidis, S.A. Apostolidis, M.S. Lo, et al., cAMP response element modulator α controls IL2 and IL17A expression during CD4 lineage commitment and subset distribution in lupus, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 16606–16611.
- [106] T. Rauen, C.M. Hedrich, Y.-T. Juang, K. Tenbrock, G.C. Tsokos, cAMP-responsive element modulator (CREM) α protein induces interleukin 17A expression and mediates epigenetic alterations at the interleukin-17A gene locus in patients with systemic lupus erythematosus, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 43437–43446.
- [107] V.R. Moulton, G.C. Tsokos, Abnormalities of T cell signaling in systemic lupus erythematosus, *Arthritis Res. Ther.* 13 (2011) 207.
- [108] M. Chatterjee, T. Rauen, K. Kis-Toth, V.C. Kytтарыs, C.M. Hedrich, C. Terhorst, et al., Increased expression of SLAM receptors SLAMF3 and SLAMF6 in systemic lupus erythematosus T lymphocytes promotes Th17 differentiation, *J. Immunol.* 188 (2012) 1206–1212.
- [109] J. Isgro, S. Gupta, E. Jacek, T. Pavri, R. Duculan, M. Kim, et al., Enhanced rho-associated protein kinase activation in patients with systemic lupus erythematosus, *Arthritis Rheum.* 65 (2013) 1592–1602.
- [110] Z. Zhang, V.C. Kytтарыs, G.C. Tsokos, The role of IL-23/IL-17 axis in lupus nephritis, *J. Immunol.* 183 (2009) 3160–3169.
- [111] V.C. Kytтарыs, Z. Zhang, V.K. Kuchroo, M. Oukka, G.C. Tsokos, Cutting edge: IL-23 receptor deficiency prevents the development of lupus nephritis in C57BL/6-lpr/lpr mice, *J. Immunol.* 184 (2010) 4605–4609.
- [112] M. Kido, S. Takeuchi, N. Sugiyama, H. Esaki, H. Nakashima, H. Yoshida, et al., T cell-specific overexpression of interleukin-27 receptor α subunit (WSX-1) prevents spontaneous skin inflammation in MRL/lpr mice, *Br. J. Dermatol.* 164 (2011) 1214–1220.
- [113] H.-C. Hsu, P. Yang, J. Wang, Q. Wu, R. Myers, J. Chen, et al., Interleukin 17-producing T helper cells and interleukin 17 orchestrate autoreactive germinal center development in autoimmune BXD2 mice, *Nat. Immunol.* 9 (2008) 166–175.
- [114] A. Espinosa, V. Dardalhon, S. Brauner, A. Ambrosi, R. Higgs, F.J. Quintana, et al., Loss of the lupus autoantigen Ro52/Trim21 induces tissue inflammation and systemic autoimmunity by deregulating the IL-23-Th17 pathway, *J. Exp. Med.* 206 (2009) 1661–1671.
- [115] P. Pisitkun, H.-L. Ha, H. Wang, E. Claudio, C.C. Tivy, H. Zhou, et al., Interleukin-17 cytokines are critical in development of fatal lupus glomerulonephritis, *Immunity* 37 (2012) 1104–1115.
- [116] A. Peters, L.A. Pitcher, J.M. Sullivan, M. Mitsdoerffer, S.E. Acton, B. Franz, et al., Th17 cells induce ectopic lymphoid follicles in central nervous system tissue inflammation, *Immunity* 35 (2011) 986–996.
- [117] K. Hirota, J.-E. Turner, M. Villa, J.H. Duarte, J. Demengeot, O.M. Steinmetz, et al., Plasticity of Th17 cells in Peyer's patches is responsible for the induction of T cell-dependent IgA responses, *Nat. Immunol.* 14 (2013) 372–379.
- [118] J.R. Chan, W. Blumenschein, E. Murphy, C. Diveu, M. Wiekowski, S. Abbondanzo, et al., IL-23 stimulates epidermal hyperplasia via TNF and IL-20R2-dependent mechanisms with implications for psoriasis pathogenesis, *J. Exp. Med.* 203 (2006) 2577–2587.
- [119] H.L. Rizzo, S. Kagami, K.G. Phillips, S.E. Kurtz, S.L. Jacques, A. Blauvelt, IL-23-mediated psoriasis-like epidermal hyperplasia is dependent on IL-17A, *J. Immunol.* 186 (2011) 1495–1502.

- [120] C.L. Leonardi, A.B. Kimball, K.A. Papp, N. Yeilding, C. Guzzo, Y. Wang, et al., Efficacy and safety of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with psoriasis: 76-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial (PHOENIX 1), *Lancet* 371 (2008) 1665–1674.
- [121] K.A. Papp, R.G. Langley, M. Lebwohl, G.G. Krueger, P. Szapary, N. Yeilding, et al., Efficacy and safety of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with psoriasis: 52-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial (PHOENIX 2), *Lancet* 371 (2008) 1675–1684.
- [122] I.B. McInnes, A. Kavanaugh, A.B. Gottlieb, L. Puig, P. Rahman, C. Ritchlin, et al., Efficacy and safety of ustekinumab in patients with active psoriatic arthritis: 1 year results of the phase 3, multicentre, double-blind, placebo-controlled PSUMMIT 1 trial, *Lancet* 382 (2013) 780–789.
- [123] C. Ritchlin, P. Rahman, A. Kavanaugh, I.B. McInnes, L. Puig, S. Li, et al., Efficacy and safety of the anti-IL-12/23 p40 monoclonal antibody, ustekinumab, in patients with active psoriatic arthritis despite conventional non-biological and biological anti-tumour necrosis factor therapy: 6-month and 1-year results of the phase 3, multicentre, double-blind, placebo-controlled, randomised PSUMMIT 2 trial, *Ann. Rheum. Dis.* 73 (2014) 990–999.
- [124] D. Poddubnyy, K.-G.A. Hermann, J. Callhoff, J. Listing, J. Sieper, Ustekinumab for the treatment of patients with active ankylosing spondylitis: results of a 28-week, prospective, open-label, proof-of-concept study (TOPAS), *Ann. Rheum. Dis.* 73 (2014) 817–823.
- [125] W.J. Sandborn, B.G. Feagan, R.N. Fedorak, E. Scherl, M.R. Fleisher, S. Katz, et al., A randomized trial of Ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with moderate-to-severe Crohn's disease, *Gastroenterology* 135 (2008) 1130–1141.
- [126] W.J. Sandborn, C. Gasink, L.-L. Gao, M.A. Blank, J. Johanns, C. Guzzo, et al., Ustekinumab induction and maintenance therapy in refractory Crohn's disease, *N. Engl. J. Med.* 367 (2012) 1519–1528.
- [127] A. De Souza, T. Ali-Shaw, B.E. Strober, A.G. Franks Jr., Successful treatment of subacute lupus erythematosus with ustekinumab, *Arch. Dermatol.* 147 (2011) 896–898.
- [128] D. Winchester, K.C. Duffin, C. Hansen, Response to ustekinumab in a patient with both severe psoriasis and hypertrophic cutaneous lupus, *Lupus* 21 (2012) 1007–1010.
- [129] C. Dahl, C. Johansen, K. Kragballe, A.B. Olesen, Ustekinumab in the treatment of refractory chronic cutaneous lupus erythematosus: a case report, *Acta Derm. Venereol.* 93 (2013) 368–369.
- [130] W. Hueber, D.D. Patel, T. Dryja, A.M. Wright, I. Koroleva, G. Bruin, et al., Effects of AIN457, a fully human antibody to interleukin-17A, on psoriasis, rheumatoid arthritis, and uveitis, *Sci. Transl. Med.* 2 (2010) 52ra72.
- [131] K.A. Papp, R.G. Langley, B. Sigurgeirsson, M. Abe, D.R. Baker, P. Konno, et al., Efficacy and safety of secukinumab in the treatment of moderate-to-severe plaque psoriasis: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase II dose-ranging study, *Br. J. Dermatol.* 168 (2013) 412–421.
- [132] C. Leonardi, R. Matheson, C. Zachariae, G. Cameron, L. Li, E. Edson-Heredia, et al., Anti-interleukin-17 monoclonal antibody ixekizumab in chronic plaque psoriasis, *N. Engl. J. Med.* 366 (2012) 1190–1199.
- [133] K.A. Papp, C. Leonardi, A. Menter, J.-P. Ortonne, J.G. Krueger, G. Kricorian, et al., Brodalumab, an anti-interleukin-17-receptor antibody for psoriasis, *N. Engl. J. Med.* 366 (2012) 1181–1189.
- [134] D. Baeten, X. Baraliakos, J. Braun, J. Sieper, P. Emery, D. van der Heijde, et al., Anti-interleukin-17A monoclonal antibody secukinumab in treatment of ankylosing spondylitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial, *Lancet* 382 (2013) 1705–1713.
- [135] I.B. McInnes, J. Sieper, J. Braun, P. Emery, D. van der Heijde, J.D. Isaacs, et al., Efficacy and safety of secukinumab, a fully human anti-interleukin-17A monoclonal antibody, in patients with moderate-to-severe psoriatic arthritis: a 24-week, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase II proof-of-concept trial, *Ann. Rheum. Dis.* 73 (2014) 349–356.
- [136] D.L.P. Baeten, V.K. Kuchroo, How cytokine networks fuel inflammation: interleukin-17 and a tale of two autoimmune diseases, *Nat. Med.* 19 (2013) 824–825.
- [137] M.C. Genovese, P. Durez, H.B. Richards, J. Supronik, E. Dokoupilova, V. Mazurov, et al., Efficacy and safety of secukinumab in patients with rheumatoid arthritis: a phase II, dose-finding, double-blind, randomised, placebo controlled study, *Ann. Rheum. Dis.* 72 (2013) 863–869.
- [138] M.C. Genovese, M. Greenwald, C.-S. Cho, A. Berman, L. Jin, G.S. Cameron, et al., Phase 2 randomized study of subcutaneous ixekizumab, an Anti-IL-17 monoclonal antibody, in biologic-naïve or TNF-IR patients with rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheumatol.* (2014) (in press).
- [139] W. Hueber, B.E. Sands, S. Lewitzky, M. Vandemeulebroecke, W. Reinisch, P.D.R. Higgins, 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 (2012) 1693–1700.
- [140] M. Voulgarelis, A.G. Tzioufas, Pathogenetic mechanisms in the initiation and perpetuation of Sjögren's syndrome, *Nat. Rev. Rheumatol.* 6 (2010) 529–537.
- [141] T. Sumida, H. Tsuboi, M. Iizuka, T. Hirota, H. Asashima, I. Matsumoto, The role of M3 muscarinic acetylcholine receptor reactive T cells in Sjögren's syndrome: a critical review, *J. Autoimmun.* 51C (2014) 44–50.
- [142] C.Q. Nguyen, H. Yin, B.H. Lee, W.C. Carcamo, J.A. Chiorini, A.B. Peck, Pathogenic effect of interleukin-17A in induction of Sjögren's syndrome-like disease using adenovirus-mediated gene transfer, *Arthritis Res. Ther.* 12 (2010) R220.

Annexe 2 : Liste des publications

Martin, J., Bemer, P., Touchais, S., Asseray, N., and Corvec, S. (2009). Recurrent abscesses due to *Fingoldia magna*, *Dermabacter hominis* and *Staphylococcus aureus* in an immunocompetent patient. *Anaerobe* 15, 201–203.

Martin, J., Deslandes, G., Dailly, E., Renaud, C., Reliquet, V., Raffi, F., and Jolliet, P. (2009). A liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for quantification of nevirapine, indinavir, atazanavir, amprenavir, saquinavir, ritonavir, lopinavir, efavirenz, tipranavir, darunavir and maraviroc in the plasma of patients infected with HIV. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 877, 3072–3082.

Dailly, E., Raffi, F., Perré, P., **Martin, J.**, Deslandes, G., and Jolliet, P. (2009). Influence of darunavir coadministration on nevirapine pharmacokinetics in HIV-infected patients: a population approach. *HIV Med.* 10, 586–589.

Audrain, M., **Martin, J.**, Fromont, P., Prié, N., Thomas, C., and Muller, E.J.-Y. (2011). Autoimmune neutropenia in children: analysis of 116 cases. *Pediatr Allergy Immunol* 22, 494–496.

Durant, C., **Martin, J.**, Hervier, B., Gournay, J., and Hamidou, M. (2011). Takayasu arteritis associated with hepatic sinusoidal dilatation. *Annals of Hepatology: Official Journal of the Mexican Association of Hepatology* 10, 559–561.

Durant, C., **Martin, J.**, Godmer, P., Moreau, A., Masseur, A., and Hamidou, M. (2011). Exceptional osseous and meningeal spinal localization of ANCA-associated granulomatous vasculitis with hypertrophic spinal pachymeningitis. *J. Neurol.* 258, 1172–1173.

Martin, J., Audrain, M., Durant, C., Rimbart, M., Fromont, P., and Hamidou, M. (2011). [Autoimmune neutropenia]. *Rev Med Interne* 32, 26–32.

Anjubault, T., **Martin, J.**, Hubert, F.-X., Chauvin, C., Heymann, D., and Josien, R. (2012). Constitutive expression of TNF-related activation-induced cytokine (TRANCE)/receptor activating NF- κ B ligand (RANK)-L by rat plasmacytoid dendritic cells. *PLoS ONE* 7, e33713.

Martin, J., Durant, C., Rimbart, M., Hemont, C., Hamidou, M., and Audrain, M. (2012). Evaluation of two antibodies against double-stranded DNA assays in discriminating between

active and non-active systemic lupus erythematosus: correlation between the cut-off and the specificity. *Pathol. Biol.* 60, 387–391.

Martin, J.C., Baeten, D.L., and Josien, R. (2014). Emerging role of IL-17 and Th17 cells in systemic lupus erythematosus. *Clin. Immunol.* 154, 1–12.

Martin, J.C., Bériou, G., Heslan, M., Chauvin, C., Utriainen, L., Aumeunier, A., Scott, C.L., Mowat, A., Cerovic, V., Houston, S.A., et al. (2014). Interleukin-22 binding protein (IL-22BP) is constitutively expressed by a subset of conventional dendritic cells and is strongly induced by retinoic acid. *Mucosal Immunol* 7, 101–113

Berthelot JM., Le Goff B., **Martin J.**, Maugars Y. and Josien R. (2014). Essential role for CD103⁺ cells in the pathogenesis of spondyloarthritides. *Joint Bone Spine*. DOI: 10.1016/j.jbspin.2014.07.011.

Poli C., **Martin J.C.**, Braudeau C., Bériou G., Hemont C., Charrier C., Guerin S., Heslan M., and Josien R. Receptor activating NF-κB ligand (RANKL) is a constitutive intracellular protein in resting human basophils and is strongly induced on their surface by interleukin 3 (accepted *Immunobiology*).

Thèse de Doctorat

Jérôme MARTIN

Sources cellulaires, régulation et fonctions de l'inhibiteur soluble de l'interleukine 22, l'interleukine 22 binding protein (IL-22BP)

Cellular sources, regulation and functions of the soluble inhibitor of interleukin 22, interleukin 22 binding protein (IL-22BP),

Résumé

L'interleukine 22 (IL-22) est une cytokine majoritairement sécrétée par des populations de lymphocytes T et innés. Bien qu'uniquement produite par le système immunitaire, elle agit presque exclusivement sur les cellules épithéliales par l'intermédiaire d'un récepteur membranaire dénommé IL-22R, principalement au niveau des tissus formant les barrières de l'organisme comme l'intestin, les poumons ou la peau. Par ses actions, elle permet de renforcer efficacement les propriétés de barrière et la régénération des épithéliums, exerçant ainsi des fonctions majeures dans le maintien de l'homéostasie de ses tissus cibles. Pour autant, de nombreux travaux ont également indiqué que des effets de l'IL-22 majorés ou prolongés pouvaient s'avérer délétères. Un rôle de l'IL-22 est ainsi clairement admis dans la physiopathologie du psoriasis et fortement suggéré dans le cancer colorectal. Ceci implique donc que les propriétés de l'IL-22 soient finement régulées et justifie l'existence d'un inhibiteur soluble, l'IL-22 binding protein (IL-22BP). Très peu de choses sont encore connues sur l'IL-22BP. Ce travail présente donc pour objectifs principaux de mieux caractériser les sources cellulaires et la régulation, ainsi que de comprendre le rôle physiopathologique que son contrôle des actions de l'IL-22 pourrait exercer dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et le psoriasis. Une meilleure compréhension de l'impact de la régulation de l'IL-22BP sur l'axe IL-22/IL-22R est en effet importante afin de mieux définir la place de l'IL-22 dans la physiopathologie de ces maladies, et donc l'intérêt ou non d'en moduler les actions à des fins thérapeutiques.

Mots clés

Interleukine 22 ; Interleukine 22 binding protein ; maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ; immunomodulation ; muqueuse intestinale ; barrières épithéliales ; psoriasis

Abstract

IL-22 is a cytokine mostly produced by T and innate lymphocytes. Despite a restricted production to the immune system, IL-22 almost exclusively acts on epithelial cells at barrier surfaces, through binding to its membrane receptor, namely IL-22R. IL-22 actions allow reinforcing the barrier function and regeneration of its target tissues like gut, lungs and skin, and are thus important in maintaining tissue homeostasis. However, several studies also indicate that exacerbated or prolonged actions of IL-22 may become deleterious, as illustrated in psoriasis or colorectal cancer. A strict control of IL-22 actions is consequently required and justifies the existence of IL-22 binding protein (IL-22BP), its soluble inhibitor. Almost nothing is currently known on IL-22BP. This work thus aimed at characterizing the cellular sources and regulation of IL-22BP, as well as understanding its pathophysiological role in controlling IL-22 effects during inflammatory bowel diseases and psoriasis. A better understanding of the IL-22BP-mediated control of IL-22/IL-22R axis is indeed required in order to better define the pathophysiological relevance of IL-22 production in these diseases, and thus the benefits that would be expected or not from its therapeutic modulation.

Key Words

Interleukin 22; Interleukin 22 binding protein; inflammatory bowel diseases; immunomodulation; intestine mucosa; epithelial barriers; psoriasis