



# Étude du rôle des lymphocytes T dans l'homéostasie des cellules lymphoïdes innées de type 2 des ganglions mésentériques chez la souris

Emmanuel Tejerina

## ► To cite this version:

Emmanuel Tejerina. Étude du rôle des lymphocytes T dans l'homéostasie des cellules lymphoïdes innées de type 2 des ganglions mésentériques chez la souris. Immunologie. 2019. hal-02870999

**HAL Id: hal-02870999**

**<https://ephe.hal.science/hal-02870999>**

Submitted on 17 Jun 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



École Pratique  
des Hautes Études



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES  
Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE  
présenté  
par  
Emmanuel TEJERINA

Pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

## Étude du rôle des lymphocytes T dans l'homéostasie des cellules lymphoïdes innées de type 2 des ganglions mésentériques chez la souris

Soutenu le

devant le jury suivant :

Pr Catherine PAUL - **Présidente**  
Dr Marie CHERRIER – **Tuteur scientifique**  
Pr Bruno CANQUE – **Tuteur pédagogique**  
Dr Marie-Laure MICHEL – **Rapporteur**  
Dr Julien DIANA - **Examineur**

Mémoire préparé sous la direction de :

Dr Marie CHERRIER

**Intitulé de la structure d'accueil :** Institut Necker Enfants Malades – INSERM U1151 Equipe  
13

**Directeur :** Dr Sophie EZINE

# TABLE DES MATIERES

|                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------|----|
| TABLE DES MATIERES .....                                     | 2  |
| LISTE DES ABBREVIATIONS .....                                | 4  |
| LISTE DES FIGURES.....                                       | 6  |
| I] PROBLÉMATIQUE DU PROJET .....                             | 8  |
| II] INTRODUCTION .....                                       | 11 |
| 1) Les ILC.....                                              | 12 |
| A] Historique de découverte .....                            | 12 |
| B] Présentation des ILC.....                                 | 12 |
| C] Le Développement des ILC.....                             | 15 |
| D] Facteurs de migration .....                               | 17 |
| 2) Les ILC2 .....                                            | 19 |
| A] Facteurs de survie et d'activation.....                   | 19 |
| B] Hétérogénéité des ILC2 .....                              | 20 |
| C] Les ILC2 mémoires.....                                    | 21 |
| D] Les ILC2 régulatrices .....                               | 21 |
| E] Plasticité des ILC2 .....                                 | 21 |
| F] Rôle des ILC2 en pathologie .....                         | 22 |
| 3) Interactions connues entre les ILC2 et lymphocytes T..... | 22 |
| A] ILC2 et Th2 .....                                         | 22 |
| B] ILC2 et Tregs .....                                       | 23 |
| III] MATERIEL ET METHODES .....                              | 25 |
| Souris .....                                                 | 26 |
| Préparation des suspensions cellulaires .....                | 26 |
| Marquage d'immunofluorescence pour cytométrie en flux .....  | 27 |
| Traitement des animaux avec des antibiotiques .....          | 29 |
| Transferts adoptifs de lymphocytes T .....                   | 30 |
| RT-qPCR sur tissu .....                                      | 30 |
| Amorces utilisées pour la PCR quantitative .....             | 31 |

|                                                                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| RT-qPCR sur les cellules stromales .....                                                                                                               | 31 |
| Traitement anti-ST2.....                                                                                                                               | 31 |
| Préparation des cellules stromales .....                                                                                                               | 32 |
| Greffe de lobes thymiques sous la capsule rénale.....                                                                                                  | 32 |
| Statistiques.....                                                                                                                                      | 32 |
| IV] RESULTATS .....                                                                                                                                    | 33 |
| 1. Etude de l'effet de l'absence des lymphocytes T sur les ILC .....                                                                                   | 34 |
| 1) Modèle animal et stratégie expérimentale.....                                                                                                       | 34 |
| 2) Le contrôle de l'homéostasie des ILC par les lymphocytes T s'exerce de façon distincte en fonction de la localisation tissulaire .....              | 36 |
| 2. Effets de la reconstitution du compartiment T sur la composition et l'activité des ILC des ganglions mésentériques.....                             | 41 |
| 1) Effets du transfert adoptif de lymphocytes T sur l'homéostasie des ILC2 dans les ganglions mésentériques.....                                       | 41 |
| 2) Effet de l'activation des lymphocytes T par le microbiote sur l'homéostasie du compartiment ILC dans les ganglions mésentériques.....               | 45 |
| 3. Etude de l'influence des lymphocytes T sur l'environnement local des ILC .....                                                                      | 51 |
| 1) Rôle de l'IL-33 dans l'expansion des ILC2 dans les ganglions mésentériques de souris déficientes en cellules T .....                                | 51 |
| a) Etude du compartiment non-hématopoïétique des ganglions mésentériques en présence et en absence de lymphocytes T .....                              | 54 |
| b) Etude de l'expression de l'IL-33 par les cellules non-hématopoïétiques des ganglions mésentériques en présence et en absence de lymphocytes T ..... | 55 |
| c) La reconstitution du compartiment T rétablit l'expression de l'IL-33 dans les cellules non-hématopoïétiques des ganglions mésentériques .....       | 56 |
| V] CONCLUSION.....                                                                                                                                     | 58 |
| VI] DISCUSSION.....                                                                                                                                    | 62 |
| Sous-type de lymphocytes T.....                                                                                                                        | 63 |
| Survie des ILC2.....                                                                                                                                   | 64 |
| Activation des lymphocytes T.....                                                                                                                      | 65 |
| Rôle des lymphocytes B.....                                                                                                                            | 66 |
| Rôle de l'IL-2 produite par les ILC.....                                                                                                               | 67 |
| VII] BIBLIOGRAPHIE .....                                                                                                                               | 69 |

## LISTE DES ABBREVIATIONS

**AHR:** Airway hyper-responsiveness

**Areg:** Amphiregulin

**CHILP:** Common helper ILC progenitor

**CLP:** Common lymphoid progenitor

**FOXP3:** Forkhead box P3

**GATA-3:** GATA-Binding protein 3

**GM-CSF:** Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

**ICOS:** Inducible T-cell co-stimulator

**Id2:** Inhibitor of DNA Binding 2

**IFN $\gamma$ :** Interferon gamma

**Ig:** Immunoglobuline

**IL:** Interleukin

**ILC2:** ILC de type 2

**ILC3:** ILC de type 3

**ILC3 DN:** ILC3 Doubles négatives

**ILCP:** ILC Precursor

**Lin:** Lineage

**LTi:** Lymphoid tissue inducer cells

**MAdCAM:** Mucosal vascular Addressin Cell Adhesion Molecule

**Nfil3:** Nuclear Factor, Interleukin 3 Regulated

**NK:** Natural Killer

**NKP:** NK precursor

**PLZF:** Promyelocytic Leukaemia Zinc Finger

**ROR $\alpha$ :** RAR-Related Orphan Receptor alpha

**ROR $\gamma$ t:** RAR-Related Orphan Receptor gamma t

**T-bet:** T-box transcription factor

**TCF7:** T Cell Specific Transcription Factor 7

**TGF $\beta$ :** Transforming growth factor beta

**TNF $\alpha$ :** Tumor necrosis factor  $\alpha$

**Tox:** Thymocyte selection-associated HMG box protein

**Treg:** Lymphocytes T régulateurs

**TSLP:** Thymic stromal lymphopoietin

**VCAM:** Vascular Cell Adhesion Molecule

**VEGF-C:** Vascular Endothelial Growth Factor

**$\alpha$ -LP :**  $\alpha$ 4b7-Lymphoid Precursor

## LISTE DES FIGURES

|                                                                                                                                                                                                                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Figure 1. Sous-types d'ILC et comparaison avec les lymphocytes T</i> .....                                                                                                                                                                                                           | 13 |
| <i>Figure 2. Le développement précoce des ILC repose sur l'expression séquentielle de nombreux facteurs de transcription (adaptée de (Ishizuka et al., 2016))</i> .....                                                                                                                 | 15 |
| <i>Figure 3 (Adaptée de Klose and Artis, 2016, Nat Immunol) : Les ILC2 interagissent avec un grand nombre de types cellulaires de leur environnement</i> .....                                                                                                                          | 20 |
| <i>Figure 4 : Interactions ILC2-Treg (Issu de (Aron and Akbari), Allergy, 2017):</i> .....                                                                                                                                                                                              | 23 |
| <i>Tableau 1 : Liste des anticorps utilisés, de leurs clones, de leur dilution et de la fonction du marqueur étudié</i> .....                                                                                                                                                           | 29 |
| <i>Tableau 2 : Liste des amorces utilisées et leur séquence 5'-&gt;3'</i> .....                                                                                                                                                                                                         | 31 |
| <i>Figure 5 : Stratégie d'analyse des ILC par cytométrie en flux</i> .....                                                                                                                                                                                                              | 35 |
| <i>Figure 6 : Comparaison de la fréquence et du nombre absolu des 3 sous types d'ILC entre souris déficientes en lymphocytes T et contrôles compétents de la même portée</i> .....                                                                                                      | 36 |
| <i>Figure 7 : Comparaison de la fréquence des ILC exprimant l'IL-13 ou l'IL-13 et l'IL-5 entre souris déficientes en lymphocytes T et contrôles compétents de la même portée</i> .....                                                                                                  | 39 |
| <i>Figure 10 : Protocole de reconstitution des souris déficientes en lymphocytes T</i> .....                                                                                                                                                                                            | 43 |
| <i>Figure 11 : Comparaison de la fréquence des ILC2 au sein des ganglions mésentériques de souris CD3e<sup>-/-</sup> ayant reçu ou non différentes combinaisons de lymphocytes T</i> .....                                                                                              | 43 |
| <i>Figure 12 : Comparaison de la fréquence des ILC exprimant l'IL-13 ou l'IL-13 et l'IL-5 au sein des ganglions mésentériques de souris CD3e<sup>-/-</sup> ayant reçu ou non différentes combinaisons de lymphocytes T</i> .....                                                        | 44 |
| <i>Figure 13 : Traitement antibiotique et greffe de lymphocytes T</i> .....                                                                                                                                                                                                             | 46 |
| <i>Figure 14 : Comparaison de la fréquence des ILC exprimant l'IL-13 ou l'IL-13 et l'IL-5 au sein des ganglions mésentériques de souris CD3e<sup>-/-</sup> ayant reçu des antibiotiques dès la naissance et différentes combinaisons de lymphocytes T ou du PBS.</i> .....              | 47 |
| <i>Figure 15 : Activation des lymphocytes T OTII avec l'OVA par voie orale</i> .....                                                                                                                                                                                                    | 48 |
| <i>Figure 16 : Comparaison de la fréquence des ILC2 dans les ganglions mésentériques de souris CD3e<sup>-/-</sup> greffées ou non avec les LT CD4<sup>+</sup> OTII TCR<sup>tg</sup> avec ou sans administration orale d'ovalbumine</i> .....                                            | 49 |
| <i>Figure 17 : Comparaison de la fréquence des ILC positives pour l'IL-13 ou l'IL-13 et l'IL-5 dans les ganglions mésentériques de souris CD3e<sup>-/-</sup> greffées ou non avec les LT CD4<sup>+</sup> OTII TCR<sup>tg</sup> avec ou sans administration orale d'ovalbumine</i> ..... | 49 |
| <i>Figure 18 : Expression relative des transcrits codant TSLP, IL-25 et IL-33 dans les ganglions périphériques et mésentériques</i> .....                                                                                                                                               | 52 |
| <i>Figure 19 : Comparaison de la fréquence des ILC2 dans les ganglions mésentériques de souris CD3e<sup>-/-</sup> traitées avec un anticorps anti ST2 ou un isotype contrôle.</i> .....                                                                                                 | 53 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <i>Figure 20 : Comparaison de la composition en cellules stromales des ganglions mésentériques issus de souris <math>CD3\epsilon^{-/-}</math> et de souris contrôles hétérozygotes <math>CD3\epsilon^{+/-}</math> .....</i>                                                                                                        | <i>54</i> |
| <i>Figure 21 : Expression relative des transcrits codant l'IL-33 au sein des cellules <math>CD45^{-}</math> issues des ganglions mésentériques. ....</i>                                                                                                                                                                           | <i>56</i> |
| <i>Figure 22 : Fréquence des ILC2 et expression relative des transcrits de l'IL-33 par les cellules <math>CD45^{-}</math> dans les ganglions mésentériques de souris déficientes en cellules T comparées aux valeurs observées chez les contrôles hétérozygotes et chez des souris ayant subi une greffe de lobe thymique.....</i> | <i>57</i> |
| <i>Figure 23 : Les lymphocytes T régulent l'homéostasie des ILC2 du ganglion mésentérique via les cellules stromales.....</i>                                                                                                                                                                                                      | <i>61</i> |
| <i>Figure 24 : Axes possibles de recherches dans le prolongement de ce mémoire .....</i>                                                                                                                                                                                                                                           | <i>63</i> |
| <i>Figure 25 : Fréquence des ILC positives pour l'Annexin V au sein des ganglions mésentériques issus de souris <math>CD3\epsilon^{-/-}</math> traitées avec un anti-ST2 ou un isotype contrôle. ....</i>                                                                                                                          | <i>65</i> |
| <i>Figure 26 : Comparaison de la fréquence des ILC productrices d'IL-2 dans les ganglions mésentériques de souris déficientes en cellules T, de contrôles immuno-compétents et de souris déficientes reconstituées.....</i>                                                                                                        | <i>68</i> |

## I] PROBLÉMATIQUE DU PROJET

De nombreuses études ont rapporté que les ILC participent à la réparation des tissus endommagés (poumons, intestins, thymus). Les ILC jouent également un rôle dans les réponses anti-microbiennes (virus, bactéries, parasites et champignons)(von Moltke et al., 2016; Weizman et al., 2017) et le confinement du microbiote intestinal (Sanos et al., 2011; Sonnenberg and Artis, 2012). Cependant, la mise en évidence du rôle des ILC dans certaines de ces réponses a essentiellement reposé sur l'utilisation de lignées murines immunodéficientes ( $RAG^{-/-}$ ). Ainsi, les interactions et les synergies entre les ILC et les autres cellules du système immunitaire adaptatif restent mal connues et peu étudiées, nous interrogeant sur le rôle des ILC au sein d'organismes immunocompétents. En effet, les ILC3 sécrétrices d'IL-22 sont essentielles dans la protection contre la bactérie entéropathogène murine *C.rodentium* en absence de système immunitaire adaptatif (Buonocore et al., 2010; Satoh-Takayama et al., 2008b; Sonnenberg and Artis, 2012). Cependant, des études indépendantes menées par les équipes de Marco Colonna et d'Eric Vivier ont démontré l'existence d'une redondance fonctionnelle entre les lymphocytes T et les ILC3 NKp46<sup>+</sup> sécrétrices d'IL-22 dans la protection contre *C.rodentium* (Rankin et al., 2015; Song et al., 2015). Ces études confirment l'importance d'étudier les ILC en prenant en compte de l'environnement cellulaire adaptatif. En outre, redondance n'est pas synonyme d'inutilité car le dialogue entre cellules T et ILC est nécessaire pour mettre en place de meilleures réponses anti-parasitaire de type 2 (Oliphant et al., 2014) et pour assurer la sélection négative des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> spécifiques des antigènes du microbiote en périphérie (Hepworth et al., 2013, 2015).

Cependant, il existe diverses situations où le système immunitaire adaptatif est immature ou diminué (naissance, vieillissement, leucémie...). Nous pouvons alors nous questionner sur le rôle des ILC dans ce contexte. Ces dernières compenseraient-elles un déficit en lymphocytes T? La régulation des ILC est-elle impactée dans ces conditions ? Les travaux de plusieurs équipes font état de modifications de l'homéostasie des ILC en absence de système immunitaire adaptatif chez la souris. Ainsi, les ILC3 de la lamina propria de l'intestin sont anormalement activées chez des souris  $RAG^{-/-}$  ou  $TCR\beta\delta^{-/-}$  (Korn et al., 2014; Mao et al., 2018) tandis que la fréquence des ILC2 augmente dans les ganglions mésentériques au détriment des ILC3 CCR6<sup>+</sup> (Mackley et al., 2015). Le rétablissement de la réponse adaptative par transfert adoptif de splénocytes ou de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> suffit à réprimer l'activité des ILC3 dans la

lamina propria de l'intestin *in vivo* (Korn et al., 2014; Mao et al., 2018). Par ailleurs, certaines populations de cellules T régulatrices (ICOS-L<sup>+</sup>) ont la capacité de moduler la sécrétion de cytokines de type 2 par les ILC *in vitro* suggérant un rôle possible des Tregs dans la régulation de l'homéostasie des ILC *in vivo* (Korn et al., 2014; Mao et al., 2018; Rigas et al., 2017). En accord avec les travaux mentionnés précédemment, notre laboratoire a fait l'observation de modifications du nombre et de la composition des ILC dans les ganglions mésentériques et la lamina propria de l'intestin de souris déficientes en lymphocytes T (CD3ε<sup>-/-</sup>). Alors que la fréquence et l'activité des ILC3 NKp46<sup>+</sup> se trouvent significativement augmentées dans la lamina propria de l'intestin de ces souris, les ILC sécrétrices de cytokines de type 2 deviennent majoritaires au sein des ganglions drainant ce tissu. Les différences de composition et d'activité des ILC constatées au sein de la lamina propria de l'intestin d'une part et des tissus lymphoïdes d'autre part ont poussé notre équipe à approfondir cette étude. Ainsi, l'objectif de ce mémoire est de décrire les mécanismes par lesquels les lymphocytes T participent à la régulation de l'homéostasie des ILC2.

- Par quels facteurs tissulaires et environnementaux les ILC2 des ganglions mésentériques sont-elles activées en absence de cellules T ?
- Comment les lymphocytes T agissent-ils sur ces facteurs pour contrôler le nombre et l'activité des ILC?

## II] INTRODUCTION

## *1) Les ILC*

### **A] Historique de découverte**

Les ILC (Innate Lymphoid Cells) constituent un groupe de cellules lymphoïdes dépourvues de récepteur spécifique des antigènes. Elles sont néanmoins capables de réagir rapidement aux modifications de leur environnement et jouent par conséquent un rôle clé dans l'immunité innée. Parmi ces cellules, les cellules NK (Natural Killer) furent les premières découvertes, grâce à leur action cytotoxique sur les cellules cancéreuses (Kiessling et al., 1975). Depuis, de nombreux autres sous-types cellulaires sont venus étoffer ce groupe. C'est notamment le cas des LTi (Lymphoid Tissue Inducer cells) découvertes en 1997 (Mebius et al., 1997) qui jouent un rôle essentiel dans la formation des organes lymphoïdes secondaires durant le développement foetal (Eberl et al., 2004). Plus tard, des cellules capables de produire des cytokines de type 2 (IL-5 et IL-13) en réponse à l'infection par des helminthes ont été découvertes en parallèle par deux équipes et furent nommées respectivement « nuocytes » (Neill et al., 2010) et « natural helper cells » (Moro et al., 2009; Neill et al., 2010). Depuis, de nombreux groupes se sont intéressés au développement de ces cellules.

### **B] Présentation des ILC**

Devant l'abondance d'appellations diverses pour les mêmes populations, en 2013 un consortium de scientifiques travaillant sur ces populations a proposé une nomenclature basée sur des homologies fonctionnelles et transcriptionnelles avec les lymphocytes T helpers (Spits et al., 2013). On retrouve donc les ILC1, 2 et 3, correspondant aux lymphocytes Th1, Th2 et Th17 et exprimant les facteurs de transcriptions T-bet, GATA-3 et ROR $\gamma$ t respectivement (Figure 1).

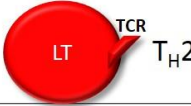
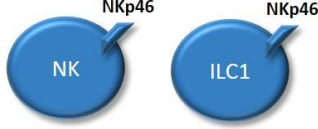
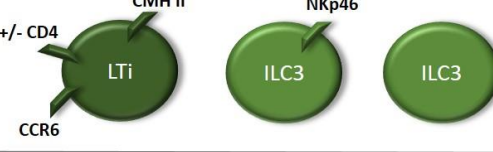
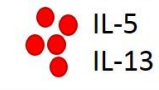
|                           |                                                                                   |  |                                                                                   |                                                                                     |                                                                                                          |
|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|--|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Lymphocyte T effecteur    |  |  |  |  |                                                                                                          |
| Sous-type d'ILC associé   |  |  |  |   |                                                                                                          |
| Facteurs de transcription | T-bet<br>EOMES                                                                    |  | T-bet                                                                             | GATA-3<br>ROR $\alpha$                                                              |                                                                                                          |
| Cytokines produites       |  |  |  |  |                                                                                                          |
| Rôles des ILC             | Fonction cytotoxique sur les cellules transformées ou infectées                   |  | Elimination de pathogènes intracellulaires et activation de macrophages           | Elimination de parasites intestinaux, de virus aériens, rôle délétère dans l'asthme | Au stade foetal : formation des organes lymphoïdes secondaires<br>Après la naissance : formation des ILF |
|                           |                                                                                   |  |                                                                                   |                                                                                     | Maintien de l'homéostasie des épithéliums, notamment l'épithélium intestinal                             |

Figure 1. Sous-types d'ILC et comparaison avec les lymphocytes T

Les ILC sont des lymphocytes appartenant au système immunitaire inné, se développant de manière indépendante de recombinaisons (RAG= Recombination Activating Gene) et n'exprimant pas de récepteur spécifique aux antigènes. Les ILC constituent 3 groupes ayant des caractéristiques fonctionnelles proches des lymphocytes T effecteurs. Les ILC de type 1 (bleu) comprenant les ILC1 non-NK EOMES<sup>-</sup> et les NK conventionnelles (cNK) EOMES<sup>+</sup>. De manière similaire aux lymphocytes T cytotoxiques CD8<sup>+</sup> (LTc) les cNK EOMES<sup>+</sup> T-bet<sup>+</sup> possèdent une activité cytotoxique (sécrétion de perforine et granzyme) en plus de l'interféron gamma (IFN $\gamma$ ). Les ILC1 T-bet<sup>+</sup> sécrètent de l'interféron gamma (IFN $\gamma$ ), sont indépendantes d'EOMES et participent à l'immunité anti-infectieuse et anticancéreuse comme leurs homologues T effecteurs (Th1). Les ILC de type 2 (rouge), sont dépendantes de GATA-3 et ROR $\alpha$ , sécrètent des cytokines de type Th2 (IL-5, IL-13, IL-4) ainsi que de l'IL-9 et de l'Amphiréguline (Areg). Ces cellules sont les analogues innés des lymphocytes Th2 et sont impliquées dans l'immunité anti-parasitaire et la réparation tissulaire. Enfin, les ILC de type 3 (vert) sont dépendantes du facteur de transcription ROR $\gamma$ t, comme les lymphocytes Th17 et sont constituées de deux groupes majeurs, les ILC3 CCR6<sup>+</sup> sécrétrices d'IL-17 et d'IL-22 (composées des LTi) et CCR6<sup>-</sup> (composées des ILC3 NKp46<sup>+</sup> et NKp46<sup>-</sup>) sécrétrices d'IL-22, de GM-CSF, d'IFN $\gamma$  et d'IL-17. Les ILC3 interviennent dans le développement des organes lymphoïdes secondaires et le maintien de l'homéostasie intestinale.

Les ILC1 expriment NKp46 et produisent de l'Interféron Gamma (IFN- $\gamma$ ). On en distingue deux principaux sous-types : les NK conventionnelles expriment le facteur de transcription EOMES et se rapprochent des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques par la production de Perforine et de Granzyme (Kiessling et al., 1975; Vivier et al., 2011). Les ILC1 non-NK ne possèdent pas d'activité cytotoxique mais agissent via l'IFN- $\gamma$  sur les pathogènes intracellulaires comme *Toxoplasma gondii* (Klose et al., 2014).

Les ILC2 expriment le facteur de transcription GATA-3 et produisent de l'IL-4, de l'IL-5, de l'IL-9 et de l'IL-13 de façon similaire aux lymphocytes Th2 (Moro et al., 2009; Neill et al., 2010). Les ILC2 participent à l'élimination des parasites intestinaux (Neill and McKenzie, 2011) et exacerbent l'inflammation des voies respiratoires au cours des réponses anti-virales et des allergies (Kim et al., 2016). On les retrouve dans la lamina propria de l'intestin grêle, dans les poumons et dans les organes lymphoïdes secondaires. Elles produisent également de l'amphiréguline, un facteur de croissance qui se lie au récepteur de l'EGF (Epidermal Growth Factor). L'amphiréguline promeut le renouvellement et la croissance des cellules épithéliales, notamment dans l'intestin et les poumons (Monticelli et al., 2015).

Les ILC3 expriment le facteur de transcription ROR $\gamma$ t et produisent de l'IL-17A et F, de l'IL-22, du GM-CSF et du TNF $\alpha$  (Cella et al., 2009). On distingue 3 principaux sous types d'ILC3 suivant l'expression de CCR6 (récepteur de la chimiokine CCL20) et de NKp46 : les ILC3 CCR6<sup>+</sup> incluent les LT $\alpha$ i, des cellules jouant un rôle crucial dans la formation des organes lymphoïdes secondaires (Mebius et al., 1997). Les ILC3 NKp46<sup>+</sup> sécrètent de l'IL-22 qui stimule la production de peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales de l'intestin. Dans le contexte d'infections ou d'inflammations locales, les ILC3 NKp46<sup>+</sup> produisent également de l'IFN- $\gamma$  qui favorise l'élimination de pathogènes intra-cellulaires (Spits et al., 2016). Les ILC3 CCR6<sup>-</sup> NKp46<sup>-</sup> sont capables de générer des ILC3 NKp46<sup>+</sup> sous l'influence de l'IL-23 et de façon dépendante de la voie Notch (Melo-Gonzalez and Hepworth, 2017).

## C] Le Développement des ILC

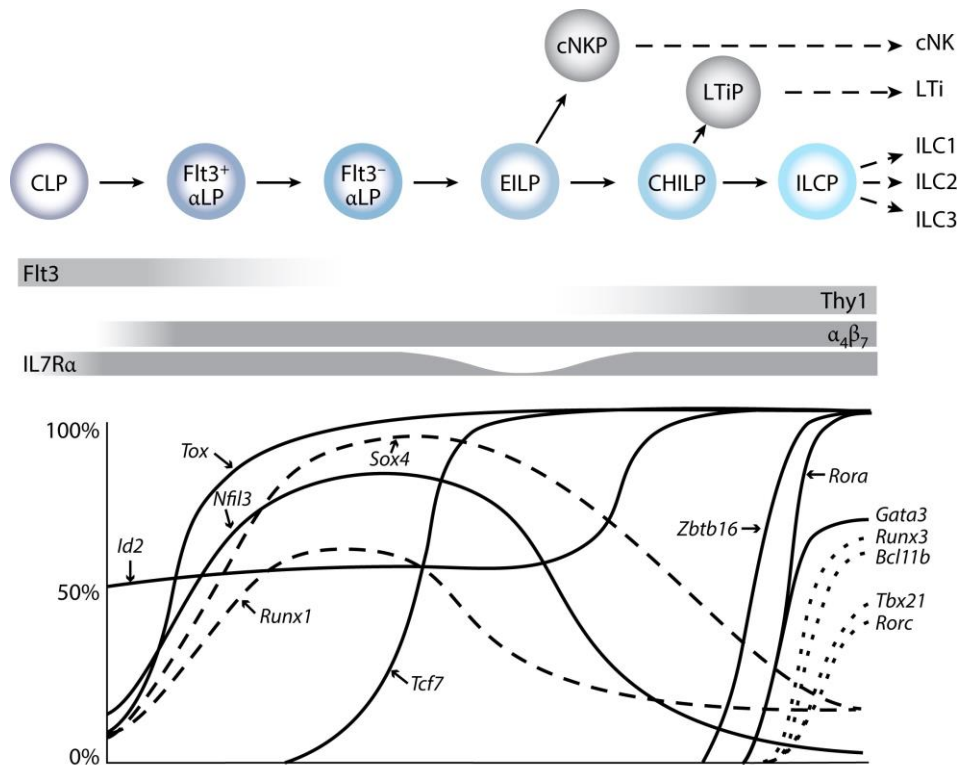


Figure 2. Le développement précoce des ILC repose sur l'expression séquentielle de nombreux facteurs de transcription (adaptée de (Ishizuka et al., 2016))

Différents facteurs de transcription contrôlent la différenciation des ILC: Id2: Inhibitor of DNA Binding 2; Tox: Thymocyte selection associated high mobility group box; Nfil3: Nuclear Factor Interleukin 3 Regulated; Runx: Runt-related transcription factor; Tcf7: T Cell Specific Transcription Factor 7; Sox4: Sry-related HMG box; Zbtb16 (Plzf): Zinc Finger And BTB Domain Containing 16; Rora: RAR Related Orphan Receptor A; Gata3: GATA Binding Protein 3; Bcl11b: B-Cell CLL/Lymphoma 11B; Tbx21: T-Box 21; Rorc: RAR Related Orphan Receptor C; Flt3: Fms Related Tyrosine Kinase 3. CLP: Common Lymphoid Progenitor; α-LP: α4β7-Lymphoid Precursor; cNKP: conventional Natural Killer Progenitor; CHILP: Common Helper ILC Progenitor. ILCP: Innate Lymphoid Cell Precursor; LTiP: Lymphoid Tissue inducer cell Precursor.

### Origine

L'ensemble des cellules sanguines des organismes vertébrés dérive des Cellules Souches Hématopoïétiques (HSC= Hematopoietic Stem Cells). La différenciation des HSC induit la génération de deux progéniteurs majeurs : le Progéniteur Myéloïde Commun (CMP= Common

Myeloid Progenitor) donnant lieu au lignage myéloïde et erythroïde et le Progéniteur Lymphoïde Commun (CLP= Common lymphoid progenitor) donnant lieu au lignage lymphoïde (Seita and Weissman, 2010). La première description du lien entre le CLP foetal et les LTi a été fournie par R. Mebius et al. en 2001. Dans leur article, les auteurs ont rapporté que le transfert adoptif du CLP foetal au sein de souriceaux permet de générer des LTi (Mebius et al., 2001). Dix années plus tard, Possot et al. rapportent que la totalité des ILC CXCR6<sup>+</sup> post-natales peuvent être générées à partir du CLP de la moelle osseuse chez la souris adulte (Possot et al., 2011). Enfin, l'équipe d'Andrew McKenzie a démontré que les « Nuocytes » étaient issus du CLP de la moelle osseuse chez la souris et représentaient un nouveau lignage lymphoïde (Wong et al., 2012). Ainsi, deux origines ont pu être mises en évidence pour les précurseurs de ces cellules : le foie foetal et la moelle osseuse adulte.

### **Facteurs de transcription**

Dans ces deux compartiments, l'expression du facteur de transcription Id2 (Inhibitor of DNA binding 2) marque l'émergence des progéniteurs appelés  $\alpha$ LP ( $\alpha$ 4 $\beta$ 7-lymphoid precursor) à partir du CLP (Common Lymphoid Progenitor) (Yu et al., 2014). L'expression d'Id2 interfère avec l'activation transcriptionnelle induite par E2A et compromet le programme de différenciation du lignage B (Boos et al., 2007; Hoyler et al., 2012). D'autres facteurs de transcription essentiels à la lignée ILC ont été mis en évidence au sein de la population  $\alpha$ LP comme Nfil3, Tcf7 et Tox (Yu et al., 2014). L' $\alpha$ LP génère ensuite le précurseur spécifique des cellules NK, le CHILP (Common Helper ILC Progenitor) décrit en 2014 par l'équipe d'Andreas Dieffenbach (Klose et al., 2014) ainsi que l'ILCP (ILC Progenitor) qui se distingue du CHILP par l'expression du facteur de transcription PLZF (Promyelocytic Leukaemia Zinc Finger) (Constantinides et al., 2015). Dans le foie foetal, l' $\alpha$ LP génère les LTi qui migrent en périphérie pour initier la formation des structures lymphoïdes secondaires (Cherrier et al., 2012; Possot et al., 2011). Enfin, le précurseur unique des ILC2 exprimant CD25 (IL-2R) émerge de l'ILCP (Hoyler et al., 2012; Klose et al., 2014; Tindemans et al., 2014) et représente une fraction majoritaire des cellules Lin<sup>-</sup> CD127<sup>+</sup> de la moelle osseuse chez la souris adulte (données du laboratoire).

## La voie Notch

Il a été démontré que la voie de signalisation Notch jouait un rôle essentiel dans le développement des ILC. L'équipe de Gérard Eberl a montré qu'une activation de la voie Notch concomitante à l'expression d'Id2 peut promouvoir l'émergence des précurseurs  $\alpha 4\beta 7^+$  à partir du CLP. Cependant, une activation prolongée bloque la différenciation des LTi au profit des cellules T (Cherrier et al., 2012). Plus récemment, l'équipe de Kazuyo Moro a montré *in vitro* que la voie Notch contrôle le choix du destin cellulaire des ILC (Koga et al., 2018). En effet, un contact intermédiaire avec des ligands de Notch en présence d'importantes concentrations d'IL-7 favorise la différenciation des ILC2 alors qu'un contact plus long et plus intense favorise l'émergence d'ILC3.

## Cytokines

L'IL-7 est nécessaire au développement et à la survie de tous les sous-types d'ILC, à l'exception des NK (Vonarbourg and Diefenbach, 2012) qui dépendent de l'IL-15 pour leur différenciation et leur survie (Goh and Huntington, 2017). L'IL-7 est également cruciale pour la maturation fonctionnelle des LTi, en permettant l'expression de surface de  $LT\alpha 1\beta 2$  nécessaire à l'organogénèse des tissus lymphoïdes secondaires (Honda et al., 2001; Luther et al., 2003; Yoshida et al., 1999). Aux stades précoces du développement, plusieurs études suggèrent que la maturation des ILC a lieu dans les tissus où elles résident. L'équipe de Richard Locksley a identifié une population de précurseurs capables de se différencier en chacun des sous types d'ILC au niveau des ébauches des plaques de Peyer (Bando et al., 2015). L'équipe de Kazuyo Moro a récemment mis en évidence que l'expression d'IL-33 par une population de cellules mésenchymateuses  $PDGFR\alpha^+ gp38^+$  du mésentère contribue à la maturation des ILC2 à partir des progéniteurs issus du foie fœtal (Koga et al., 2018). A l'exception des ILC2 dont le précurseur spécifique a été identifié dans la moelle osseuse chez la souris, l'environnement tissulaire au sein duquel la spécification des lignages ILC1 et ILC3 a lieu reste à identifier chez la souris adulte.

## D] Facteurs de migration

L'abondance relative des ILC dans les muqueuses et les tissus non lymphoïdes a soulevé la question du « mode de vie » de ces cellules. S'agit-il de populations sédentaires, résidant de

façon permanente dans les tissus ou de cellules capables de circuler dans le sang et la lymphe pour être rapidement mobilisées au site de l'infection ?

Plusieurs études aux conclusions parfois contradictoires ont été publiées à ce propos. Une étude menée chez des animaux parabiotiques démontre le caractère essentiellement sédentaire des ILC à l'état d'équilibre et au cours de l'inflammation (Gasteiger et al., 2015). Cependant, deux d'entre elles abordent le rôle des récepteurs de chimiokines CCR7 et CCR9 dans la migration des ILC entre les ganglions mésentériques et la lamina propria de l'intestin. Ainsi, CCR7 est détecté à la surface des ILC1 et des ILC3 issues des ganglions, de la rate et du colon tandis que CCR9 est exprimé par les ILC2 et les ILC3 T-bet<sup>+</sup> dans les intestins (Kim et al., 2015). Par ailleurs, la diminution significative de la fréquence et du nombre d'ILC1 et d'ILC3 dans les ganglions des souris CCR7<sup>-/-</sup> d'une part et d'ILC2 dans la lamina propria de l'intestin des souris CCR9<sup>-/-</sup> d'autre part suggère un rôle essentiel de ces récepteurs dans la migration vers ces deux compartiments (Kim et al., 2015; Mackley et al., 2015). L'expression de CCR9 et de l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  par les ILC1 et les ILC3 peut être induite par l'acide rétinoïque. En revanche, l'acide rétinoïque n'agit pas sur l'expression de CCR9 et  $\alpha 4\beta 7$  par les ILC2 et leur migration vers la lamina propria ou les ganglions drainants la muqueuse intestinale n'est pas impactée en absence de vitamine A.

Le rôle de l'IL-33 dans l'export des ILC2P à partir de la moelle osseuse a récemment été décrit (Stier et al., 2018). Les auteurs ont rapporté que l'IL-33 réprime l'expression de CXCR4 par les ILC2P. CXCR4 est le récepteur à la chimiokine CXCL12 (SDF-1= *Stromal derived factor 1*), une molécule qui favorise la migration et la rétention des cellules hématopoïétiques vers la moelle osseuse (Stier et al., 2018). Ainsi, l'injection d'IL-33 recombinante favorise la sortie des ILC2P vers la périphérie. D'autre part, l'équipe de Huang et al. a récemment mis en évidence les capacités migratoires des ILC2 inflammatoires chez des animaux congéniques parabiotiques (chirurgicalement liées) infectés par le parasite *Nippostrongylus brasiliensis* (Huang et al., 2018). Les ILC2 inflammatoires de l'intestin, induites de manière dépendante de l'IL-25, auraient ainsi la capacité à migrer vers les poumons suivant un gradient de sphingosine 1 phosphate (S1P) (Huang et al., 2018).

Par la suite, ce mémoire se concentrera sur l'homéostasie d'une sous-population des ILC, les ILC2. Intéressons-nous plus particulièrement à celle-ci.

## 2) *Les ILC2*

### A] Facteurs de survie et d'activation

Les ILC2 sont activées par les alarmines IL-33 et TSLP produites par les cellules épithéliales et myéloïdes et par l'IL-25 produite par les cellules en brosse (Tuft cells) (McKenzie et al., 2014). Certaines populations de cellules stromales des tissus lymphoïdes produisent des facteurs de survie essentiels aux ILC2 tels que l'IL-33 et l'IL-7 (Cayrol and Girard, 2018; Martin et al.). L'IL-25, TSLP et l'IL-33 sont également des facteurs importants pour la survie et l'activation des ILC2 humaines (Camelo et al., 2017). Cette conservation inter-espèce renforce le rôle crucial de ces cytokines dans la biologie des ILC2. Enfin, l'IL-2 et l'IL-9 sécrétées de manière autocrine ou paracrine favorisent la survie des ILC2 (Klose and Artis, 2016).

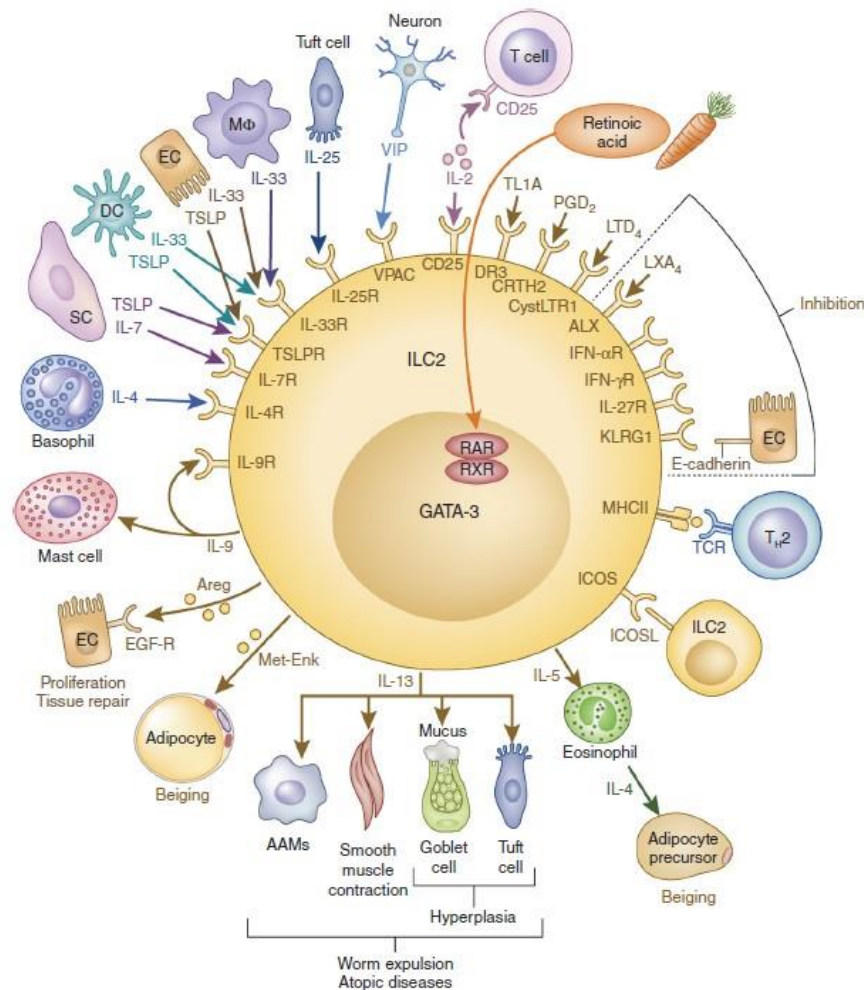


Figure 3 (Adaptée de Klose and Artis, 2016, Nat Immunol) : Les ILC2 interagissent avec un grand nombre de types cellulaires de leur environnement

De nombreux facteurs solubles et contacts cellulaires jouent un rôle dans la fonction et le destin des ILC2. Ces facteurs peuvent provenir de cellules hématopoïétiques (IL-4, IL-2...) ou non (IL-25, IL-33, TSLP...) voire de l'alimentation (Acide rétinoïque).

## B) Hétérogénéité des ILC2

La découverte des « nuocytes » a signé le début de nombreuses recherches qui ont mené à l'identification de plusieurs sous-types d'ILC2. On distingue les ILC2 dites « naturelles » (nILC2) dépendantes de l'IL-33 des ILC2 « inflammatoires » (iILC2) qui répondent préférentiellement à l'IL-25. L'IL-25 est notamment libérée en situation inflammatoire suite à une infection parasitaire intestinale. Dans ces conditions, l'expression de ST2 (récepteur à l'IL-33) est réprimée au profit de KLRG1 (marqueur de maturité des ILC2) (Huang et al., 2015).

## C] Les ILC2 mémoires

Martinez-Gonzalez et al. ont montré que des ILC IL-25R<sup>+</sup> émergent et persistent suite à l'exposition à un allergène et à l'inflammation des voies respiratoires qui en résulte. Une nouvelle exposition à l'allergène réactive ces cellules et exacerbe les réactions inflammatoires de façon similaire à ce qui est observé dans une réponse de type mémoire (Martinez-Gonzalez et al., 2016).

## D] Les ILC2 régulatrices

L'équipe de Jonathan Kaye a décrit une sous population d'ILC2 présentes dans les poumons de souris traitées à l'IL-33, produisant de l'IL-10, exprimant des molécules inhibitrices TIGIT et CTLA4, et présentant ainsi des caractéristiques régulatrices (Seehus et al., 2017).

Shuo Wang et al. ont récemment mis en évidence une population lymphoïde innée régulatrice (ILCreg) jouant un rôle important dans la régulation de l'activation des ILC1 et des ILC3 (Wang et al., 2017). Les ILCreg sont localisées dans la *lamina propria* de l'intestin et du colon (humain et murin) et produisent de l'IL-10 et du TGF- $\beta$ . Ces cytokines anti-inflammatoires leur confèrent un rôle protecteur et participent au maintien de l'homéostasie intestinale. À ce jour, l'identité entre ces deux populations d'ILC régulatrices n'est pas établie. Des études transcriptomiques comparatives pourraient, à terme, faciliter la classification de telles populations.

## E] Plasticité des ILC2

Tous les sous-types d'ILC sont capables de plasticité et de prendre certaines caractéristiques d'autres sous-types d'ILC. Concernant les ILC2, deux mécanismes ont été décrits :

ILC2 vers ILC1 : deux groupes ont décrit chez l'Homme des conversions ILC2 vers ILC1 productrices d'IFN- $\gamma$  sous l'influence de l'IL-12 et de l'IL-1 $\beta$ , *in vitro* ou dans le cadre de la Bronchopathie Pulmonaire Chronique Obstructive (BPCO). Cette conversion est réversible par l'IL-4 (Bal et al., 2016; Ohne et al., 2016).

ILC2 vers ILC3 : chez la souris, les iILC2 peuvent produire de l'IL-17 et exprimer ROR $\gamma$ t dans le contexte d'une infection par *Candida albicans* sous l'effet de l'IL-6 et du TGF- $\beta$  (Huang et al., 2015). Ce type de plasticité n'a pas encore été décrit chez l'Homme (Krabbendam et al., 2018). Ces sous populations d'ILC2 peuvent être impliquées dans de nombreux processus biologiques, notamment pathologiques.

## F] Rôle des ILC2 en pathologie

Les ILC2 jouent un rôle délétère dans des pathologies comme l'asthme. Dans ce contexte, les alarmines IL-33, IL-25 et TSLP induisent la production de cytokines de type 2 (IL-13 et IL-5) par les ILC (Hirose et al., 2017). L'IL-5 provoque une inflammation dépendante des éosinophiles alors que l'IL-13 entraîne une destruction du tissu épithélial bronchique (Sugita et al., 2018). Dans la BPCO, les ILC2 répriment l'expression de GATA-3 et induisent celle de T-bet et de l'IFN- $\gamma$  sous l'influence de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-12. Le recrutement de neutrophiles qui en résulte entraîne la destruction du tissu épithélial bronchique (Bal et al., 2016).

Les ILC2 jouent un rôle protecteur dans les infections par les parasites intestinaux comme les helminthes (Walker and McKenzie, 2013). Un rôle protecteur a aussi été décrit dans l'athérosclérose où leur expansion permet de diminuer le taux de cholestérol circulant et d'atténuer les dépôts de collagènes des plaques d'athérome par leur sécrétion de cytokines de type 2, alors que l'élimination sélective des ILC2 aggrave ces symptômes (Engelbertsen et al., 2015; Newland et al., 2017).

## 3) Interactions connues entre les ILC2 et lymphocytes T

### A] ILC2 et Th2

Le groupe de Fumio Takei a montré que les ILC2 sont capables de promouvoir la réponse Th2 dans le cadre d'une réponse allergique à la papaïne dans les poumons (Halim et al., 2014). En effet, chez des souris dépourvues d'ILC2 (ROR $\alpha^{-/-}$ ), la réponse Th2 est compromise et restaurée lorsque ces animaux sont complétés par des ILC2 issues de souris sauvages.

Dans ce contexte, la production d'IL-13 par les ILC2 promeut la différenciation des lymphocytes Th2 par l'intermédiaire des cellules dendritiques activées.

De plus, les ILC2 sont capables d'interagir directement avec les lymphocytes Th2 via les molécules du CMH de classe II. En effet, l'équipe d'Andrew McKenzie a montré que les ILC2 induisent la production d'IL-2 par les lymphocytes Th2 dans le cadre d'une infection par *Nippostrongylus brasiliensis*. La production d'IL-2 favorise à son tour la prolifération des ILC productrices d'IL-13, cytokine indispensable à l'expulsion des vers intestinaux (Oliphant et al., 2014).

## B] ILC2 et Tregs

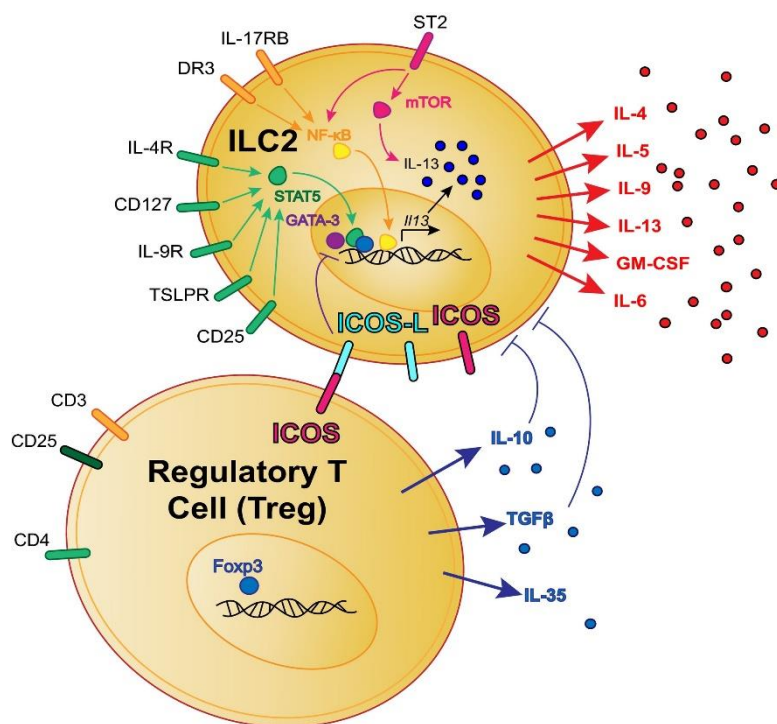


Figure 4 : Interactions ILC2-Treg (Issu de (Aron and Akbari), Allergy, 2017):

Les ILC2 sont capables d'interagir de plusieurs manières avec les lymphocytes T régulateurs via un contact ICOS-ICOSL ou via les cytokines sécrétées par les lymphocytes T régulateurs telles que l'IL-10 et le TGF-β.

La co-expression de ICOS et ICOSL par les ILC2 promeut la sécrétion de cytokines de type II (IL-5, IL-13) et l'induction de l'AHR dépendante de l'asthme (Maazi et al., 2015). L'expression du récepteur de co-stimulation ICOS (ICOS= *Inducible T-cell COStimulator*) par les lymphocytes T régulateurs induits (iTregs) en combinaison avec la production de TGF- $\beta$  et d'IL-10 conduisent à une réduction drastique de la concentration d'IL-5 et d'IL-13 dans le surnageant des co-cultures associant iTregs et ILC2. Ces observations ont été confirmées *in vivo* dans un modèle d'asthme induit au sein de souris NSG où le co-transfert d'ILC2 et d'iTregs atténue les symptômes médiés par l'AHR. Ces observations suggèrent que les cellules du système immunitaire adaptatif pourraient agir directement sur la fonction des ILC2 dans un contexte inflammatoire.

L'interaction entre Treg et ILC2 a également été étudiée dans un modèle d'allergie alimentaire chez la souris. Au contact des allergènes alimentaires, les cellules épithéliales intestinales produisent de l'IL-33 qui active les ILC2 dont la production d'IL-4 bloque la prolifération des Tregs spécifiques de l'allergène, favorisant ainsi l'allergie alimentaire (Noval Rivas et al., 2016)

### III] MATERIEL ET METHODES

## *Souris*

Les lignées murines suivantes ont été utilisées :

- CD3 $\epsilon^{-/-}$  CD45.1
- RORc( $\gamma$ t)GFP<sup>TG</sup>
- Foxp3EGFP
- RAG2 $^{-/-}$  OTII TCR tg

Les animaux de la lignée CD3 $\epsilon^{-/-}$  CD45.1 ont été fournis par Benedita Rocha (INEM) et utilisés comme receveurs pour les expériences de transferts adoptifs. Les animaux de la lignée RORc( $\gamma$ t)GFP<sup>TG</sup> ont été générés et fournis par Gérard Eberl (Institut Pasteur). Les animaux de la lignée Foxp3EGFP ont été générés par Bernard Malissen (CIML) et fournis par David Gross (INEM). Ces lignées ont été utilisées comme source de cellules T pour les expériences de transfert adoptif.

Les animaux des lignées CD3 $\epsilon^{-/-}$  CD45.1 et RORc( $\gamma$ t)GFP<sup>TG</sup> ont été croisés afin d'obtenir des animaux porteurs de la mutation dans CD3 $\epsilon$  à l'état homozygote (déficients en cellules T) et hétérozygote (possédant les lymphocytes T) chez lesquels l'expression de ROR $\gamma$ t est reportée par la GFP. Les animaux de la lignée RAG2 $^{-/-}$  OTII ont été fournis par Nadine Cerf-Bensussan (Institut Imagine). L'élevage, l'hébergement et les procédures d'expérimentation animale ont été réalisés dans des conditions SPF (Specific Pathogen Free) au LEAT (Laboratoire d'expérimentation animale et de transgénèse) de la Structure Fédérative de Recherche (SFR) Necker en collaboration avec les zootechniciens et sous le contrôle du vétérinaire référent. L'ensemble des procédures utilisées ont été soumises à l'évaluation du comité d'éthique de l'Université Paris Descartes et approuvées par le Ministère de la Recherche et de l'Innovation.

## *Préparation des suspensions cellulaires*

### **A] Lymphocytes de la lamina propria de l'intestin grêle (SILP):**

L'intestin grêle est prélevé du duodénum au caecum après euthanasie gazeuse. Après élimination des fèces, du mucus et des plaques de Peyer, le tube digestif est ouvert longitudinalement et découpé en morceaux d'1 à 2 cm, l'épithélium est séparé de la

muqueuse à l'aide d'EDTA 30 mM (30' à 4°C). Après plusieurs lavages en PBS 1X, le tissu est à nouveau découpé en morceaux d'environ 2-3mm et digéré sous agitation douce en présence de Collagénase D (Sigma-Aldrich) (1mg/mL) et de DNase I (Roche) (1U/mL) dans du milieu DMEM 2% SVF 10 mM Hepes. Trois étapes de digestions de 15' à 37°C se succèdent et sont entrecoupées de trois étapes de dissociation mécanique par aller-retours à l'aide d'une pipette 1mL. Le surnageant de chaque digestion est ensuite collecté et filtré à travers un tamis cellulaire de 70 µm. Les cellules hématopoïétiques vivantes sont séparées des débris et cellules mortes sur un gradient de Percoll (40/80%) à 1500g pendant 20' à température ambiante.

#### **B] Ganglions périphériques et mésentériques :**

Les ganglions périphériques (inguinaux, axillaires, brachiaux et cervicaux) et mésentériques sont prélevés après euthanasie gazeuse. Les ganglions périphériques sont regroupés et traités séparément des ganglions mésentériques. Les suspensions cellulaires sont obtenues après découpe et digestion à 37°C pendant 15' en présence de Collagénase D et de DNase I comme indiqué plus haut.

#### **C] Stimulation ex vivo**

Afin de procéder à la détection des cytokines intracellulaires, les suspensions sont préalablement incubées à 37°C pendant 3 heures en présence de 100 ng/mL de phorbol-12-myristate-13-acetate [PMA], 1 µg/mL de Ionomycine et 10 µg/mL de Brefeldine A (Sigma-Aldrich) dans du milieu OPTI-MEM + 10% SVF en atmosphère à 5% de CO<sub>2</sub>. La PMA et la Ionomycine stimulent l'expression des cytokines intracellulaires alors que la Brefeldine A bloque la sécrétion dans le milieu extérieur. De l'IL-23 recombinante murine (ImmunoTools) est ajoutée à 40 ng/mL pour la détection de l'IL-22.

### ***Marquage d'immunofluorescence pour cytométrie en flux***

La viabilité des cellules est évaluée à l'aide du Live/Dead Fixable Aqua (Invitrogen) qui marque, de façon compatible avec la fixation, la perte d'intégrité de la membrane cellulaire.

#### **A] Marquage de surface**

Les marquages de surface sont réalisés en PBS 1X, 1% SVF, 1mM EDTA à température ambiante pendant 10' ou à 4°C pendant 30'. Les anticorps couplés à la biotine sont révélés par de la streptavidine couplée à un fluorochrome (Pacific Blue) et incubée à température ambiante pendant 5'. 2 lavages sont réalisés après chaque étape de marquage.

#### **B] Marquage de facteurs de transcription**

La détection des facteurs de transcription a été réalisée selon les instructions du fournisseur à l'aide du « Foxp3 staining kit » commercialisé par eBiosciences. Les anticorps utilisés pour la détection de ROR $\gamma$ t et GATA-3 sont indiqués dans le tableau fourni plus bas.

#### **C] Marquage des cytokines intracellulaires**

Après avoir procédé au marquage de surface, les suspensions cellulaires sont fixées en présence de PBS 1X paraformaldehyde 2% 15 minutes à température ambiante. Après fixation et lavage en PBS 1X, les cellules sont perméabilisées en présence de saponine 0,5% PBS 1X 1% SVF EDTA 1mM. Les suspensions sont ensuite incubées avec les anticorps spécifiques des cytokines intracellulaires à détecter (voir tableau) en présence de saponine 0,5% PBS 1X 1% SVF EDTA 1mM 60' à température ambiante ou 12h à 4°C. Les suspensions sont lavées et resuspendues en PBS 1X 1% SVF 1mM EDTA pour l'acquisition.

#### **D] Anticorps:**

Les ILC sont détectées au sein des cellules hématopoïétiques vivantes (Live/Dead<sup>-</sup> CD45<sup>+</sup>). Elles sont dépourvues des marqueurs de lignage (CD3 $\epsilon$ , TCR $\beta$ , TCR $\gamma\delta$ , CD19, B220, CD11b, CD11c, GR-1, Ter119) et expriment la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-7 (IL-7R $\alpha$  ou CD127) Live/Dead<sup>-</sup> CD45<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup> CD127<sup>+</sup>. L'utilisation des marqueurs NKp46, ROR $\gamma$ t et GATA-3 permet de distinguer 3 principaux sous types d'ILC murines.

- les ILC1 : NKp46<sup>+</sup> ROR $\gamma$ t<sup>-</sup> GATA3<sup>-/lo</sup>
- les ILC2 : NKp46<sup>-</sup> ROR $\gamma$ t<sup>-</sup> GATA3<sup>hi</sup>
- les ILC3 : NKp46<sup>+/-</sup> ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> GATA3<sup>lo</sup>

Au sein des ILC3 la combinaison des marqueurs NKp46 et CCR6 permet de distinguer 3 sous types d'ILC3

ILC3 NKp46<sup>-</sup> CCR6<sup>+</sup>

ILC3 NKp46<sup>+</sup> CCR6<sup>-</sup>

ILC3 NKp46<sup>-</sup> CCR6<sup>-</sup>

| Fluorochrome associé                                                   | Anticorps | Clone    | Dilution | Fonction                                                                |
|------------------------------------------------------------------------|-----------|----------|----------|-------------------------------------------------------------------------|
| Lineage :<br>FITC, PE ou Biotine                                       | CD3ε      | 145-2C11 | 1/100    | Marqueurs des lymphocytes T                                             |
|                                                                        | TCRβ      | H57-597  | 1/100    |                                                                         |
|                                                                        | TRCγδ     | GL3      | 1/100    |                                                                         |
|                                                                        | CD19      | 6D5      | 1/100    | Marqueurs des lymphocytes B                                             |
|                                                                        | B220      | RA3-6B2  | 1/100    |                                                                         |
|                                                                        | CD11b     | M1/70    | 1/100    | Marqueurs de cellules myéloïdes                                         |
|                                                                        | CD11c     | HL3      | 1/100    |                                                                         |
|                                                                        | Gr-1      | RB6-8C5  | 1/100    |                                                                         |
|                                                                        | Ter-119   | TER-119  | 1/100    | Marqueur d'érythrocytes                                                 |
| Identification des sous types d'ILC et de leur production de cytokines |           |          |          |                                                                         |
| APCeF780                                                               | CD45.1    | A20      | 1/100    | Marqueurs de cellules lymphoïdes, étude du chimérisme                   |
| PerCP-Cy5.5                                                            | CD45.2    | 104      | 1/100    |                                                                         |
| PE-Cy7                                                                 | CD127     | A7R34    | 1/100    | Récepteur de l'IL-7                                                     |
| Biotine                                                                | NKp46     | 29A1.4   | 1/50     | Marqueur de cellules NK, d'ILC1, identification d'un sous type des ILC3 |
| BV605                                                                  | CCR6      | 29-2L17  | 1/100    | Récepteur de MIP-3 alpha, identification d'un sous type des ILC3        |
| BV786                                                                  | Ki67      | B56      | 1/100    | Marqueur de prolifération                                               |
| APC                                                                    | RORγt     | AFKJS-9  | 1/100    | Facteur de transcription spécifique des ILC3                            |
| PE                                                                     | GATA-3    | TWAI     | 1/100    | Facteur de transcription spécifique des ILC2                            |
| APC                                                                    | IL-5      | TRFK5    | 1/100    | Cytokines de type 2                                                     |
| PE                                                                     | IL-13     | ebio13A  | 1/100    |                                                                         |
| APC                                                                    | IL-17A    | ebio17B7 | 1/100    | Cytokines de type 17                                                    |
| PE                                                                     | IL-22     | 1H8PWSR  | 1/100    |                                                                         |

*Tableau 1 : Liste des anticorps utilisés, de leurs clones, de leur dilution et de la fonction du marqueur étudié*

L'acquisition des données a été effectuée à l'aide des cytomètres FACS Canto II et LSR FORTESSA SORP (BD) et les données ont été analysées avec le logiciel FlowJo (Tristar).

### *Traitement des animaux avec des antibiotiques*

Les souris CD3ε<sup>-/-</sup> CD45.1 en gestation ont été traitées par un cocktail d'antibiotiques à large spectre administrés dans l'eau de boisson :

- Ampicilline à 0,5 g/L agissant sur les bactéries Gram positives et certaines Gram négatives
- Streptomycine à 1 g/L agissant sur les bacilles Gram négatifs

- Métronidazole à 0,5 g/L agissant sur les bacilles gram négatifs anaérobies et les Clostridiums

Les nouveau-nés sont traités jusqu'à la fin de la procédure (à l'âge de 18 à 20 semaines).

### *Transferts adoptifs de lymphocytes T*

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> sont triés à partir des splénocytes de souris Foxp3 EGFP ou RORc(gt)GFPtg CD45.2 ou RAG2<sup>-/-</sup> OTII à l'aide d'un FACS Aria IIIu (BD).

Une combinaison de 1,5 millions de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et 1,5 millions de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> ou une suspension de 3 millions de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont injectés par voie intraveineuse aux souris CD3ε<sup>-/-</sup> CD45.1. Les souris contrôles sont injectées avec du PBS 1X. Une anesthésie à l'isofluorane a été réalisée lors des injections. Douze semaines plus tard les souris sont euthanasiées au CO<sub>2</sub> et leurs tissus collectés pour analyse.

Dans le cas de l'étude du rôle de l'activation des LT CD4<sup>+</sup> issus des souris RAG OTII, l'ovalbumine a été administrée à 1,5% dans l'eau de boisson durant toute la durée de la procédure. Le poids des animaux a été suivi de façon hebdomadaire durant toute la durée des procédures.

### *RT-qPCR sur tissu*

Les ganglions mésentériques, périphériques, et 5 mm d'iléon distal de souris CD3ε<sup>-/-</sup> et CD3ε<sup>+/-</sup> âgées de 8 semaines ont été prélevés et plongés dans l'azote liquide en présence de RNeasy lysis buffer (Qiagen). Après décongélation sur glace, les tissus sont dissociés et lysés en RNeasy lysis buffer. Les acides nucléiques sont extraits par séparation de phase après ajout de chloroforme. La phase supérieure est récupérée et les acides nucléiques sont précipités en présence d'isopropanol. Après lavage en éthanol à 70°C et séchage rapide le culot est dissout dans l'eau. Cette suspension contient les ARN totaux qui sont ensuite séparés sur colonne à l'aide du RNeasy mini kit (Qiagen) selon les instructions du fournisseur. La synthèse d'ADN complémentaire est réalisée à partir d'1µg d'ARN totaux en présence de 2,5 µM d'amorces aléatoires grâce à la Transcriptase inverse MuLV (Thermofischer) selon les instructions du fournisseur. La détection et la quantification des transcrits HPRT, IL-33, IL-25 et TSLP sont réalisées en présence d'amorces spécifiques (Eurogentec et QIAGEN) et de SYBRgreen (QIAGEN) à l'aide du ABI 7900HT real-time PCR system de chez Applied Biosystem.

## Amorces utilisées pour la PCR quantitative

|                  | Séquence (5'→3')               |
|------------------|--------------------------------|
| <b>IL-25</b>     |                                |
| <b>Sens</b>      | AAC-GGG-ACT-TGA-ATC-GGG-TC     |
| <b>Anti-sens</b> | TGG-TAA-AGT-GGG-ACG-GAG-TTG    |
| <b>TSLP</b>      |                                |
| <b>Sens</b>      | ACG-GAT-GGG-GCT-AAC-TTA-CAA    |
| <b>Anti-sens</b> | AGT-CCT-CGA-TTT-GCT-CGA-ACT    |
| <b>IL-33</b>     |                                |
| <b>Sens</b>      | TCC-AAC-TCC-AAG-ATT-TCC-CCG    |
| <b>Anti-sens</b> | CAT-GCA-GTA-GAC-ATG-GCA-GAA    |
| <b>HPRT</b>      |                                |
| <b>Sens</b>      | AGG-CCA-GAC-TTT-GTT-GGA-TTT-GA |
| <b>Anti-sens</b> | CTT-GCG-CTC-ATC-TTA-GGC-TTT-GT |

**Tableau 2 : Liste des amorces utilisées et leur séquence 5'→3'**

## RT-qPCR sur les cellules stromales

Ces expériences ont été réalisées par nos collaborateurs. Une fois les ganglions mésentériques prélevés, ils ont été digérés par de la Collagenase D et DNase I comme décrit plus haut. Sur la suspension cellulaire obtenue, une déplétion magnétique des cellules CD45<sup>+</sup> est réalisée. Après un marquage par des anticorps couplés à des fluorochromes, les cellules CD45<sup>-</sup> sont triées sur un FACS ARIA (BD).

L'ARN total de ces cellules CD45<sup>-</sup> a été extrait grâce au kit RNeasy micro (Quiagen). Une amplification linéaire de ces ARN a été réalisée grâce au kit Message Booster (Ambion). La transcription inverse est réalisée en utilisant l'enzyme SuperScript Reverse Transcriptase de chez Invitrogen. La qPCR a été réalisée comme décrit plus haut.

## Traitement anti-ST2

Les souris CD3ε<sup>-/-</sup> CD45.1 ont reçu 200 µg d'anticorps anti-ST2/IL-33R (R&D Systems clone 245707) ou la même quantité d'isotype contrôle par voie intra-péritonéale et ont été sacrifiées 24 heures plus tard pour les prélèvements.

### *Préparation des cellules stromales*

Les ganglions mésentériques et/ou périphériques ont été dilacérés à l'aide d'aiguilles (25G) et digérés dans du DMEM en présence 2% SVF, 1,2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mg/mL de Collagenase de type IV et 40 µg/mL de DNase I à 37°C pendant 15 minutes sous agitation lente. Après prélèvement du surnageant et ajout d'1 volume équivalent de milieu de digestion, les échantillons ont été digérés une seconde fois pendant 10' dans les mêmes conditions et dissociés mécaniquement par pipetage avant d'être dilués et filtrés à travers un tamis de 70 µM.

### *Greffe de lobes thymiques sous la capsule rénale*

Dans des conditions stériles, une incision d'environ 2 cm est réalisée au niveau du rein dans la peau de souris CD3ε<sup>-/-</sup> anesthésiées par injection de 100 µL d'un mélange de Kétamine (10 mg/mL) et Xylazine (1 mg/mL). Le péritoine est ensuite incisé sur 1cm. Un rein est sorti par cette incision à l'aide d'une pince de dissection. Une fois celui-ci posé sur le péritoine, le parenchyme rénal est percé à l'aide de la pointe d'une pince de dissection. Une poche est ainsi formée entre le rein et le parenchyme sans endommager le rein. Un lobe de thymus prélevé sur un souriceau nouveau-né est ensuite inséré le plus loin possible dans la poche créée. Une fois le greffon placé, le rein est remis doucement à l'intérieur du péritoine. On rapproche alors les bords de l'incision de la peau, et celle-ci est refermée grâce à du fil chirurgical résorbable.

### *Statistiques*

Selon les expériences, les tests statistiques Anova à deux voies ou Mann Whitney non appariés ont été réalisés et analysés grâce au logiciel Prism (GraphPad). Les résultats sont indiqués sur chaque histogramme et expliqués dans la légende de chaque figure.

## IV] RESULTATS

# 1. Etude de l'effet de l'absence des lymphocytes T sur les ILC

## 1) *Modèle animal et stratégie expérimentale*

Afin d'étudier le rôle des lymphocytes T dans la régulation de l'homéostasie des ILC, des souris déficientes en lymphocytes T ( $CD3\epsilon^{-/-}$ ) ont été comparées à leurs homologues immunocompétents issus de la même cage ( $CD3\epsilon^{+/+}$ ). Ces animaux ont été obtenus par croisement de souris déficientes pour  $CD3\epsilon$  (molécule de co-stimulation essentielle à la maturation des lymphocyte T) avec des souris  $RORc(gt)GFP^{tg}$ . Nous avons ensuite analysé la composition et l'activité des ILC chez les animaux homozygotes ( $CD3\epsilon^{-/-}$ ) et hétérozygotes ( $CD3\epsilon^{+/-}$ ) à l'état d'équilibre dans trois compartiments: les ganglions périphériques (inguinaux, brachiaux, axillaires et cervicaux), les ganglions mésentériques et la lamina propria de l'intestin.

Les ILC ont été identifiées parmi les cellules lymphoïdes vivantes comme étant  $Lin^{-} CD45^{+} CD127^{+}$ . Ici, Lin désigne un ensemble de marqueurs de lignage exprimés par les populations hématopoïétiques : ( $CD3\epsilon$ ,  $TCR\beta$ ,  $TCR\gamma\delta$ ,  $CD19$ ,  $B220$ ,  $CD11b$ ,  $CD11c$ ,  $GR-1$ ,  $Ter119$ ).

Parmi les cellules  $Lin^{-} CD45^{+} CD127^{+}$ , les 3 principaux sous-types d'ILC ont été identifiés comme suit :

- ILC1:  $NKp46^{+} ROR\gamma t^{-} GATA3^{-}$
- ILC2:  $NKp46^{-} ROR\gamma t^{-} GATA3^{hi}$
- ILC3:  $NKp46^{+/-} ROR\gamma t^{+} GATA3^{-} CCR6^{+/-}$

Ces sous-populations ont été détectées et analysées au sein de suspensions cellulaires issues des 3 compartiments cités plus haut (voir matériel et méthodes) par cytométrie en flux comme indiqué dans le schéma suivant.

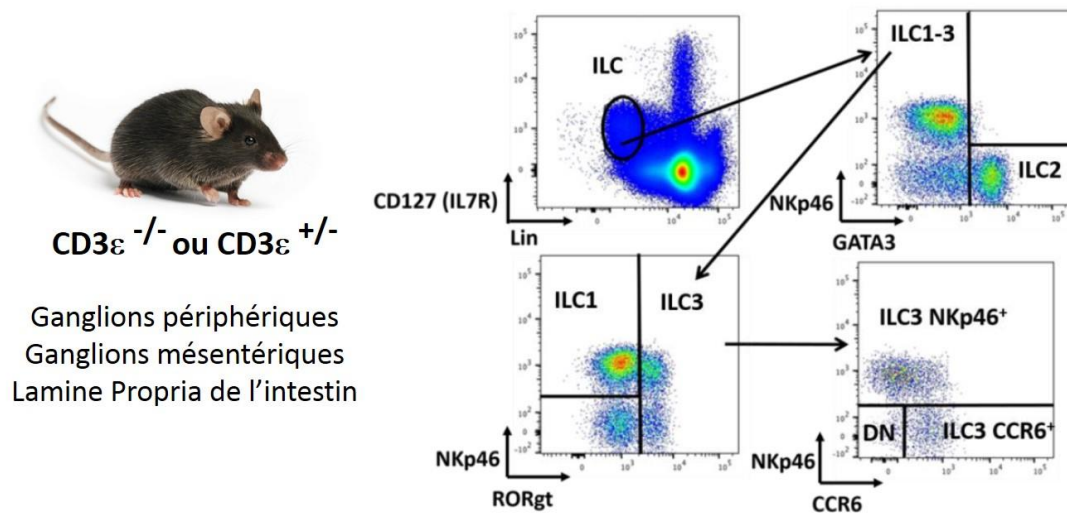


Figure 5 : Stratégie d'analyse des ILC par cytométrie en flux

Exemple d'analyse des ILC dans les ganglions mésentériques. Les ILC sont définies comme étant Lin<sup>-</sup> CD127<sup>+</sup> au sein des cellules hématopoïétiques vivantes. Au sein des Lin<sup>-</sup> CD127<sup>+</sup>, les ILC2 sont identifiées comme étant NKp46<sup>-</sup> GATA-3<sup>hi</sup>. Les ILC3 sont identifiées comme étant RORγt<sup>+</sup> au sein de la fraction NKp46<sup>+/-</sup> GATA-3<sup>lo/-</sup> et les ILC1 comme étant NKp46<sup>+</sup> RORγt<sup>-</sup>. Les ILC3 peuvent ensuite être divisées en trois sous-populations en fonction de l'expression de NKp46 et CCR6.

## 2) Le contrôle de l'homéostasie des ILC par les lymphocytes T s'exerce de façon distincte en fonction de la localisation tissulaire

### A) La composition des ILC est-elle affectée en absence de cellules T ?

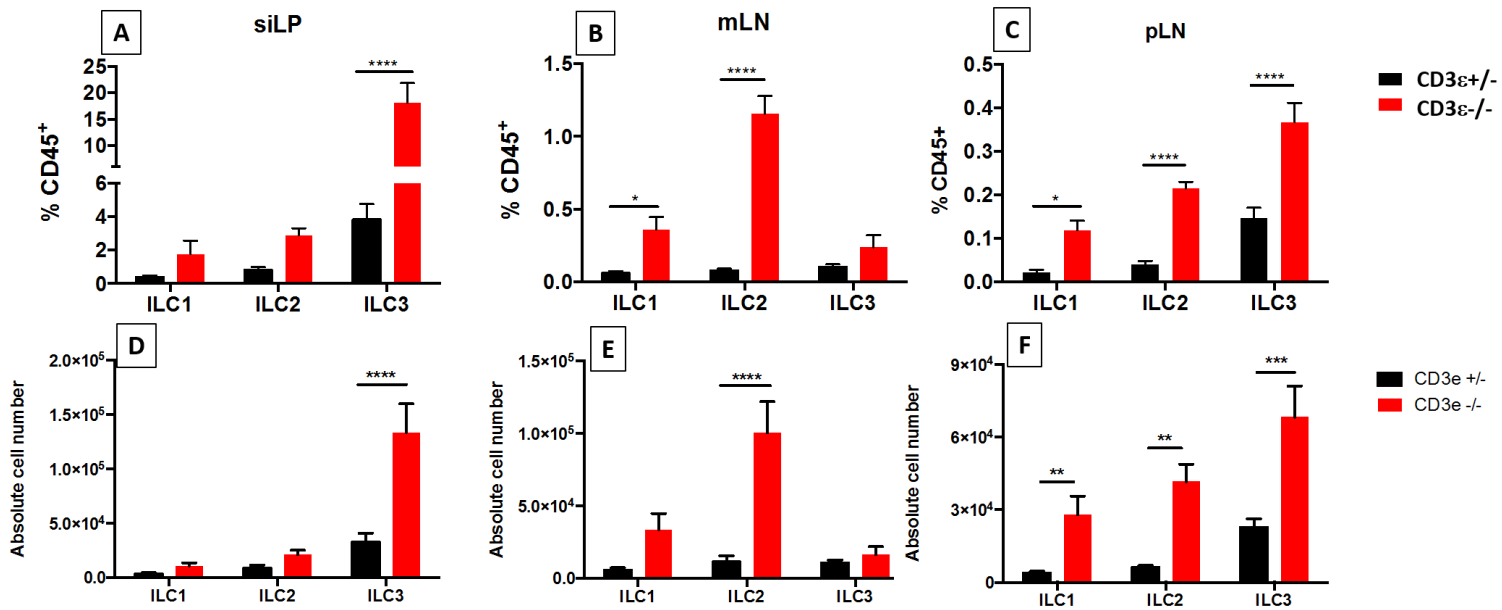


Figure 6 : Comparaison de la fréquence et du nombre absolu des 3 sous types d'ILC entre souris déficientes en lymphocytes T et contrôles compétents de la même portée

Fréquence des 3 sous-types d'ILC au sein des cellules CD45<sup>+</sup> dans la lamina propria de l'intestin grêle (A), les ganglions mésentériques (B) et les ganglions périphériques (C) et nombre absolu des sous-types d'ILC dans la lamina propria de l'intestin grêle (D), les ganglions mésentériques (E) et les ganglions périphériques (F) des souris CD3ε<sup>-/-</sup> (n=14) et CD3ε<sup>+/-</sup> (N=10) âgées de 8 semaines et issues de mêmes portées. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant un test ANOVA à deux voies avec alpha=0.05 \*\*\*\* : p<0,0001 ; \*\*\* : p<0,001 ; \*\* p<0.01\* : p<0,05. Les barres d'erreurs représentent l'écart à la moyenne. Les résultats présentés ont été obtenus à partir d'un minimum de 3 expériences indépendantes.

L'abondance des ILC est exprimée en fréquence au sein des cellules CD45<sup>+</sup> plutôt qu'en nombres absolus afin de limiter la variabilité attribuable aux différences inter-individuelles de cellularité. En effet, les lymphocytes sont isolés de la lamina propria de l'intestin grêle et des

ganglions suite à une combinaison de digestion enzymatique et de dissociations mécaniques dont l'efficacité peut varier significativement d'un échantillon à l'autre. Comme nous n'avons pas observé de différence significative de cellularité entre les échantillons issus des souris  $CD3\epsilon^{-/-}$  et  $CD3\epsilon^{+/-}$ , nous avons choisi cette représentation afin de nous affranchir de la variabilité liée aux expérimentations tout en fournissant des valeurs cohérentes et reproductibles.

La composition des ILC a tout d'abord été analysée dans la lamina propria de l'intestin grêle connue pour abriter une population abondante d'ILC (5 à 10% des cellules hématopoïétiques). On constate que dans la lamina propria de l'intestin de souris déficientes en cellules T, la proportion d'ILC3 est significativement augmentée (20% des cellules hématopoïétiques chez les souris  $CD3\epsilon^{-/-}$  contre 5% chez les souris contrôles) alors que les ILC1 et les ILC2 sont nettement moins impactées (Fig. 6A). Cette augmentation n'est pas liée à une expansion homéostatique dépendante de l'IL-7 ni à un effet « mathématique » de l'absence d'un compartiment cellulaire puisqu'elle n'affecte pas l'ensemble des ILC de façon homogène.

Un réseau de vaisseaux lymphatiques relie l'intestin aux ganglions mésentériques et assure la circulation des cellules du système immunitaire et des antigènes captés au niveau de la lumière intestinale. Afin de déterminer si la composition des ILC est affectée de façon similaire dans les intestins et les ganglions qui y sont reliés, nous avons analysé les ganglions mésentériques des souris déficientes en lymphocytes T. Dans les ganglions mésentériques on observe que la proportion d'ILC2 et d'ILC1 sont augmentées significativement alors que les ILC3 ne sont dans l'ensemble pas affectées (Fig. 6B). Il est à noter que ces observations sont faites chez des animaux âgés de 8 semaines, stade auquel la composition du microbiote résultant de la colonisation du tube digestif par les bactéries commensales s'est stabilisée. Nous avons effectué les mêmes mesures au moment du sevrage (3 semaines d'âge) et n'avons pas observé de différences dans la lamina propria de l'intestin entre les animaux déficients et compétents en lymphocytes T. En revanche la proportion d'ILC3 est sélectivement augmentée au sein des ganglions mésentériques des souris  $CD3\epsilon^{-/-}$  suggérant que les modifications observées dans ce tissu chez l'adulte sont induites par un ou plusieurs facteurs régulés sur le plan ontogénique et tissulaire (cf article en annexe). Nous aborderons plus particulièrement le rôle de l'IL-33 dans la suite de ce mémoire.

Afin de déterminer si les différences observées entre ganglions mésentériques et lamina propria de l'intestin peuvent être attribuées à la structure de ces deux compartiments (tissus lymphoïde et non lymphoïde) nous avons analysé la composition des ILC dans d'autres organes lymphoïdes non reliés à l'intestin, les ganglions périphériques (Fig. 6C). La proportion de tous les sous types d'ILC est augmentée dans les ganglions périphériques des souris dépourvues de lymphocytes T suggérant une expansion homéostatique dépendante de l'IL-7 contrairement aux situations observées dans la lamina propria de l'intestin et les ganglions mésentériques. Ainsi, on constate que le déficit constitutif en lymphocytes T altère significativement la composition en ILC mais que les modifications observées sont différentes en fonction des tissus étudiés. Ces observations suggèrent que l'architecture de ces derniers (lymphoïdes et non lymphoïdes) ne rend pas compte à elle seule des différences observées. Dans ce mémoire, je décrirai plus particulièrement les mécanismes par lesquels les lymphocytes T contrôlent l'homéostasie des ILC2 dans les ganglions mésentériques.

**B) L'accumulation des ILC de type 2 dans les ganglions mésentériques est-elle associée à une augmentation de la production des cytokines associées?**

L'augmentation de la fréquence des ILC2 est-elle associée à une augmentation de la fréquence des ILC productrices d'IL-13 et d'IL-5? Ces cytokines sont en effet produites spécifiquement par les ILC2 parmi les ILC (Klose and Artis, 2016; Neill et al., 2010). Au laboratoire nous avons pu également constater que la production de ces cytokines est confinée à une fraction d'ILC n'exprimant ni NKp46 ni ROR $\gamma$ t. La production de cytokines par les ILC a été mesurée par cytométrie en flux dans les ganglions mésentériques et périphériques. Les suspensions cellulaires ont été incubées 3h en présence de Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) et de Ionomycine afin de stimuler de manière non spécifique la production de cytokines, la Bréfeldine A a été utilisée pour bloquer leur sécrétion. Les cellules ont été marquées en surface puis fixées et perméabilisées afin de détecter les cytokines intracellulaires à l'aide d'anticorps spécifiques. Les suspensions ont ensuite été analysées par cytométrie en flux.

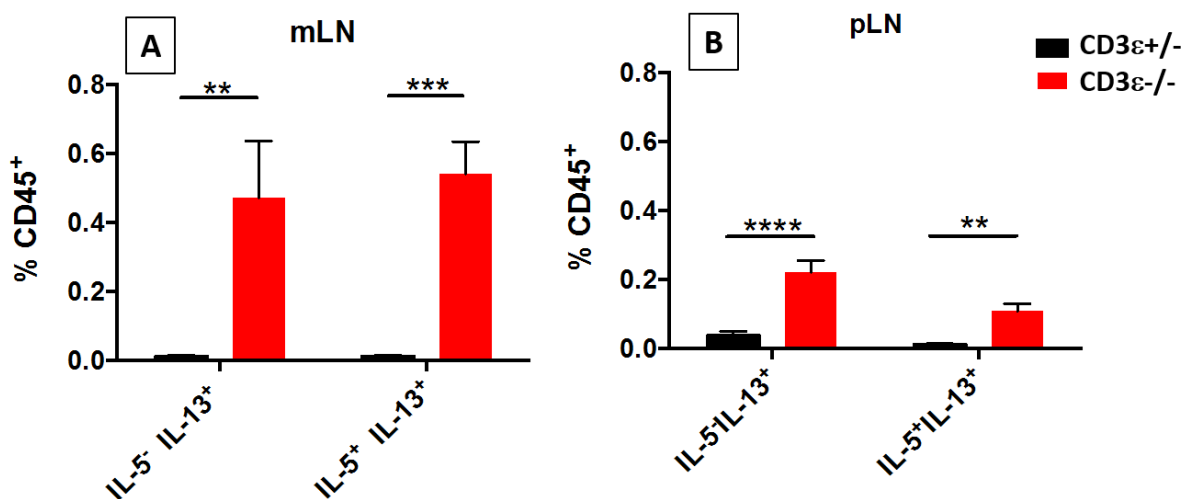


Figure 7 : Comparaison de la fréquence des ILC exprimant l'IL-13 ou l'IL-13 et l'IL-5 entre souris déficientes en lymphocytes T et contrôles compétents de la même portée

Fréquence d'ILC positives pour l'IL-13 ou pour l'IL-13 et l'IL-5 au sein des CD45<sup>+</sup> dans les ganglions mésentériques (A) et les ganglions périphériques (B) des souris CD3ε<sup>-/-</sup> (N= 14) et <sup>+/-</sup> (N= 10) issues d'une même portée. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant un test ANOVA à deux voies avec alpha=0.05 \*\*\*\* : p<0,0001 ; \*\*\* : p<0,001 ; \*\* p<0.01\* : p<0,05. Les barres d'erreurs représentent l'écart à la moyenne. Les résultats présentés ont été obtenus à partir d'un minimum de 3 expériences indépendantes.

Nous pouvons constater que l'absence de T se traduit par une augmentation de la proportion des ILC productrices d'IL-13 et d'IL-5 dans les ganglions périphériques et mésentériques (Fig. 7B et C). Cependant, la fraction des ILC produisant à la fois de l'IL-5 et de l'IL-13 est significativement plus élevée dans les ganglions mésentériques que dans les ganglions périphériques des souris déficientes en lymphocyte T. Ces observations sont en accord avec les modifications observées dans la composition des ILC et suggèrent que les lymphocytes T régulent à la fois la composition et l'activité des ILC dans chacun de ces compartiments.

Il est intéressant de noter que les proportions d'ILC productrices d'IFN-γ et de GM-CSF sont également augmentées au sein des ganglions mésentériques des souris déficientes en cellules T. Des travaux complémentaires concernant l'origine cellulaire de ces cytokines sont actuellement en cours dans notre laboratoire.

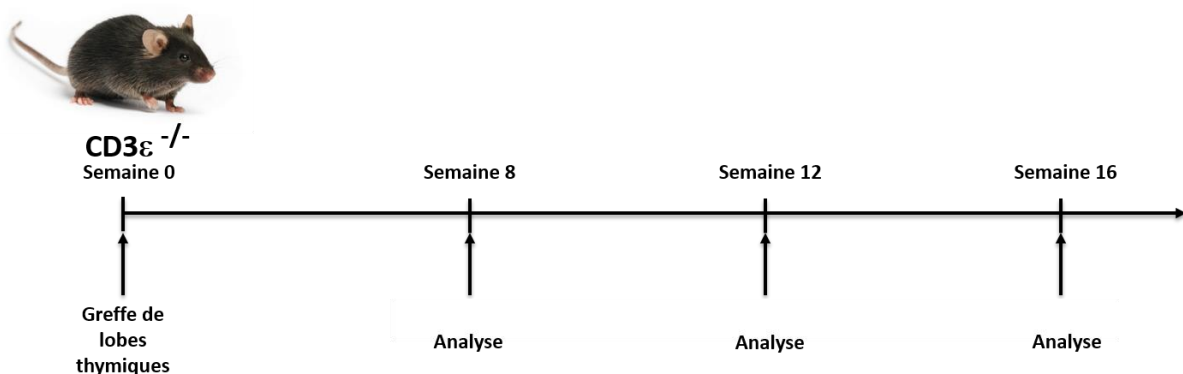
Il est également important de noter que nous n'avons pas constaté d'augmentation de la proportion d'ILC de type 2 positives pour Ki-67, qui est un marqueur de prolifération cellulaire (Scholzen and Gerdes, 2000) dans les ganglions périphériques et mésentériques des souris déficientes en lymphocytes T. Cette proportion est par ailleurs très faible (moins de 10%) suggérant que ces cellules prolifèrent très peu à l'état d'équilibre rendant une étude par incorporation de BrdU difficilement interprétable.

## 2. Effets de la reconstitution du compartiment T sur la composition et l'activité des ILC des ganglions mésentériques.

### 1) Effets du transfert adoptif de lymphocytes T sur l'homéostasie des ILC2 dans les ganglions mésentériques

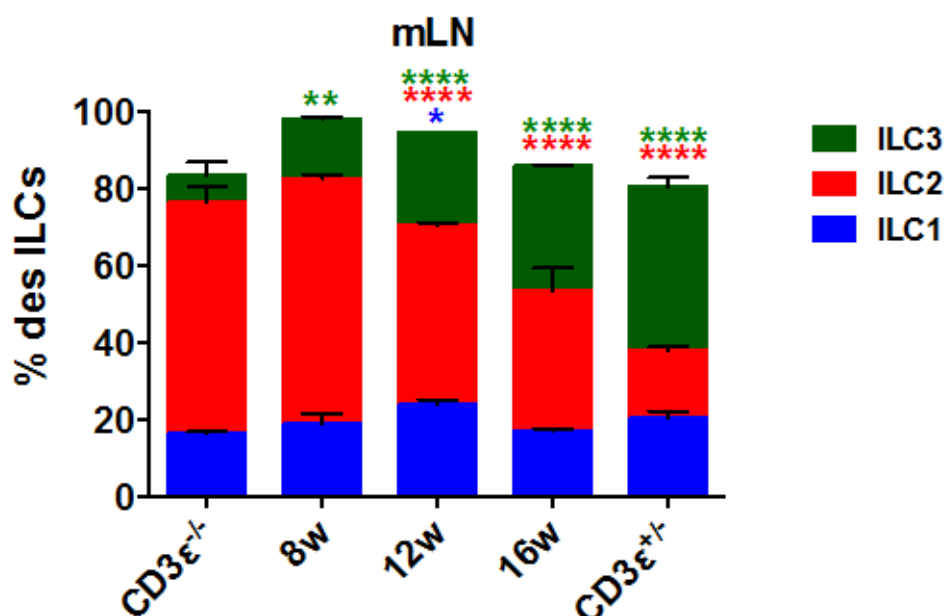
#### A) La reconstitution du compartiment T a-t-elle un effet sur l'abondance des ILC2 ?

Afin de répondre à cette question, des greffes de lobes thymiques ont été réalisées sous la capsule rénale de souris  $CD3\epsilon^{-/-}$  et la composition des ILC a été analysée dans les ganglions mésentériques à 8, 12 et 16 semaines après la greffe (Figure 8). Dans les ganglions mésentériques, la fréquence des ILC2 n'est significativement réduite qu'à partir de 12 semaines et continue à décroître à 16 semaines post-greffe (Figure 9). Par ailleurs nous avons observé que le chimérisme entre cellules T du donneur et cellules hématopoïétique du receveur reste stable tout au long de cette cinétique suggérant que les effets induits par la reconstitution du compartiment T sont retardés par rapport à celle-ci. Ceci peut être expliqué par la demie-vie relativement longue des ILC et leur faible taux de renouvellement (Sawa et al., 2010). Une autre explication pourrait être fournie par la cinétique de différenciation de certaines sous population de lymphocytes T responsables de la régulation observée. Enfin, l'effet des lymphocytes T pourrait être indirect et passer par des populations tierces à faible taux de renouvellement.



*Figure 8 : Cinétique de révélation après greffe de lobes thymiques sous la capsule rénale de souris déficientes en lymphocytes T*

Les souris  $CD3\epsilon^{-/-}$  ont été greffées avec des lobes thymiques de souriceaux nouveau-né WT sous la capsule rénale. L'analyse (prélèvement des ganglions mésentériques et analyse FACS) a lieu 8, 12 ou 16 semaines après la greffe.

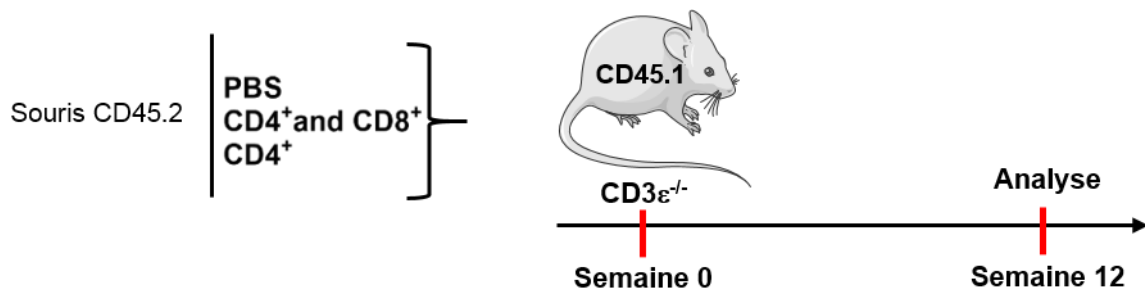


**Figure 9 : Cinétique reconstitution après greffe lobes thymiques (8wks, 12, 16 wks)**

Proportion des ILC2 dans les ganglions mésentériques parmi les cellules hématopoïétiques ( $CD45^+$ ) des souris receveuses ( $CD45.1$ ) après greffe de lobes thymiques. Les ganglions mésentériques des souris receveuses ont été analysés 8 ( $n=2$ ), 12 ( $n=2$ ) ou 16 ( $n=2$ ) semaines après greffe. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant un test ANOVA à deux voies avec  $\alpha=0.05$  \*\*\*\* :  $p<0,0001$  ; \*\*\* :  $p<0,001$  ; \*\*  $p<0.01$  :  $p<0,05$ . Les barres d'erreurs représentent l'écart à la moyenne. Les résultats ont été obtenus lors d'au moins 3 expériences indépendantes.

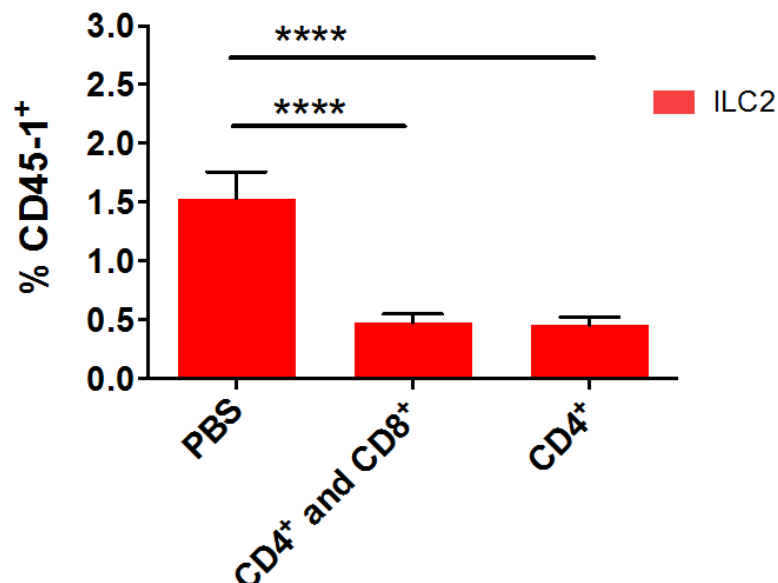
Afin de déterminer si l'ensemble du compartiment T est nécessaire à la diminution de la fréquence des ILC2, deux autres conditions de reconstitution ont été utilisées : soit les souris ont reçu  $3.10^6$  de cellules T constituées d'un mélange physiologique de cellules T  $CD4^+$  polyclonales et  $CD8^+$ , soit elles ont reçu  $3.10^6$  de cellules T  $CD4^+$ . Les souris contrôles ont reçu du PBS. Les ganglions mésentériques ont été prélevés 12 semaines après le transfert adoptif

(Fig. 10) et la composition du compartiment ILC, ainsi que la production des cytokines de type 2 ont été analysées par cytométrie en flux (Fig. 11 et 12). L'analyse des cellules CD45<sup>+</sup> des ganglions mésentériques des souris receveuses montre que le transfert adoptif de lymphocytes T réduit significativement la fraction des ILC2 parmi les cellules hématopoïétiques du receveur indépendamment de la composition de l'inoculât (Fig. 11).



*Figure 10 : Protocole de reconstitution des souris déficientes en lymphocytes T*

Les souris CD3ε<sup>-/-</sup> ont été greffées avec 3.10<sup>6</sup> de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ou CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. La révélation (prélèvement des ganglions mésentériques et analyse FACS) a lieu 12 semaines après la greffe.



*Figure 11 : Comparaison de la fréquence des ILC2 au sein des ganglions mésentériques de souris CD3ε<sup>-/-</sup> ayant reçu ou non différentes combinaisons de lymphocytes T*

Proportion des ILC2 dans les ganglions mésentériques parmi les cellules hématopoïétiques (CD45<sup>+</sup>) des souris receveuses (CD45.1). Les conditions suivantes ont été testées :  $3.10^6$  de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (n=7),  $1,5.10^6$  de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et  $1,5.10^6$  de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (n=7), souris contrôles injectées avec du PBS (n=6). L'analyse statistique a été réalisée en utilisant un test ANOVA à deux voies avec alpha=0.05 \*\*\*\* : p<0,0001 ; \*\*\* : p<0,001 ; \*\* p<0.01\* : p<0,05. Les barres d'erreurs représentent l'écart à la moyenne. Les résultats ont été obtenus lors d'au moins 3 expériences indépendantes.

#### B) La reconstitution du compartiment T a-t-elle un effet sur l'activité des ILC2?

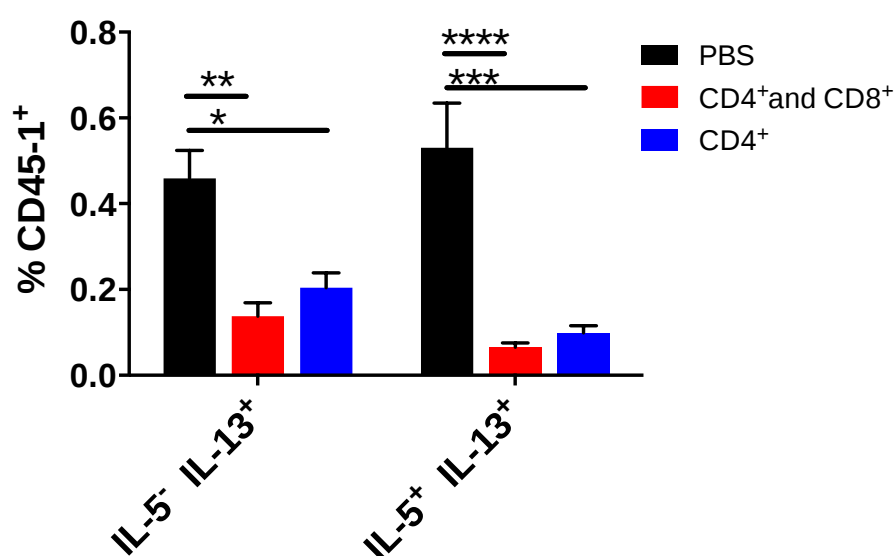


Figure 12 : Comparaison de la fréquence des ILC exprimant l'IL-13 ou l'IL-13 et l'IL-5 au sein des ganglions mésentériques de souris CD3ε<sup>-/-</sup> ayant reçu ou non différentes combinaisons de lymphocytes T

Proportion des ILC productrices de cytokines de type 2 dans les ganglions mésentériques parmi les cellules hématopoïétiques des souris receveuses. Les conditions suivantes ont été testées :  $3.10^6$  de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (n=7),  $1,5.10^6$  de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et  $1,5.10^6$  de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (n=7), souris contrôles injectées avec du PBS (n=6).

L'analyse statistique a été réalisée en utilisant un test ANOVA à deux voies avec alpha=0.05 \*\*\*\* : p<0,0001 ; \*\*\* : p<0,001 ; \*\* p<0.01\* : p<0,05. Les barres d'erreurs représentent l'écart à la moyenne. Les résultats ont été obtenus lors d'au moins 3 expériences indépendantes.

La proportion d'ILC productrices de cytokines de type 2 est significativement réduite au sein des cellules hématopoïétiques des souris receveuses indépendamment de la composition de l'inoculât (Fig. 12). Ces observations sont en accord avec la diminution de la fraction des ILC2 et indiquent que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> régulent directement ou indirectement la composition et l'activité des ILC dans les ganglions mésentériques. Nous pouvons donc conclure que le déséquilibre de l'homéostasie des ILC provoquée par l'absence de lymphocytes T peut être compensé par la réinjection de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. L'activation des lymphocytes T est-elle nécessaire à ce rétablissement de l'homéostasie des ILC2 ? Si oui, cette activation est-elle dépendante du microbiote ?

## ***2) Effet de l'activation des lymphocytes T par le microbiote sur l'homéostasie du compartiment ILC dans les ganglions mésentériques.***

### **A) Modèle d'activation indépendante du microbiote**

Lorsqu'une greffe de lymphocytes T est réalisée chez un hôte lymphopénique, les cellules T subissent une activation massive en réponse aux antigènes du microbiote de l'hôte (Feng et al., 2010; Kieper et al., 2005; Min et al., 2005). C'est également le cas dans nos expériences de transferts adoptifs de cellules T. Afin d'évaluer le rôle de l'activation des lymphocytes T par le microbiote de l'hôte, nous avons réalisé les mêmes transferts adoptifs dans des souris receveuses pré-traitées avec des antibiotiques à large spectre dès la naissance. L'Ampicilline agissant sur les bactéries Gram positives et certaines Gram négatives, la Streptomycine agissant sur les bacilles Gram négatifs et le Métronidazole agissant sur les bacilles gram négatifs anaérobies et les Clostridium. L'analyse de l'activité des ILC a été effectuée 12 semaines après greffe (Fig. 13) et le paramètre analysé a été la production de cytokines de type 2 par les ILC, révélateur de l'activité des ILC2.

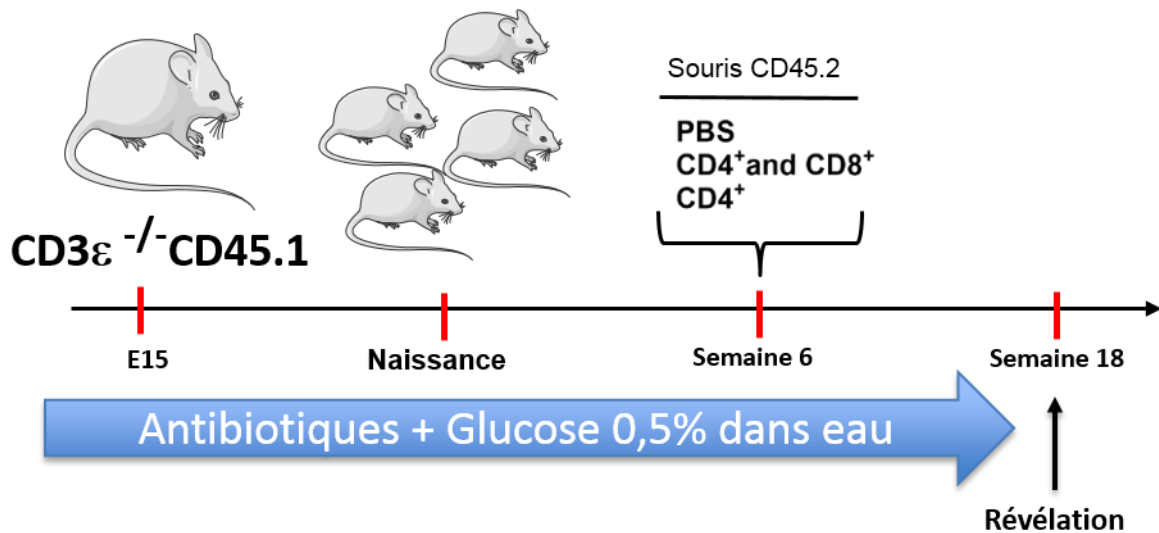
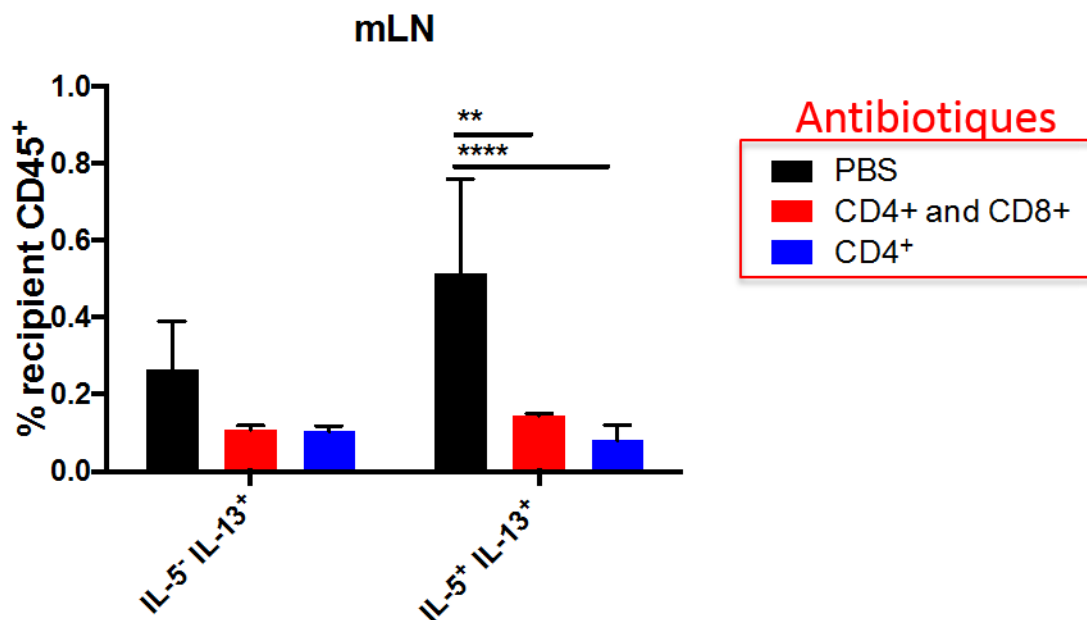


Figure 13 : Traitement antibiotique et greffe de lymphocytes T

Les souris déficientes en lymphocytes T ont été traitées pendant la gestation et après la naissance avec des antibiotiques à large spectre (Ampicilline et Métronidazole 0,5g/L ; Streptomycine 1g/L) dans l'eau de boisson supplémentée en glucose (0,5%). À 6 semaines d'âge, une greffe de lymphocytes T a été réalisée comme décrit précédemment. Douze semaines plus tard, la capacité de production des cytokines de type 2 a été évaluée par cytométrie en flux.



*Figure 14 : Comparaison de la fréquence des ILC exprimant l'IL-13 ou l'IL-13 et l'IL-5 au sein des ganglions mésentériques de souris CD3 $\epsilon$ <sup>-/-</sup> ayant reçu des antibiotiques dès la naissance et différentes combinaisons de lymphocytes T ou du PBS.*

*Proportion des ILC productrices de cytokines de type 2 dans les ganglions mésentériques au sein des cellules hématopoïétiques du receveur. Les souris receveuses pré-traitées par des antibiotiques ont reçu soit 3.10<sup>6</sup> de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (n=7), soit 1,5.10<sup>6</sup> de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et 1,5.10<sup>6</sup> de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (n=7), soit du PBS (n=8). L'analyse statistique a été réalisée en utilisant un test ANOVA à deux voies avec alpha=0.05 \*\*\*\* : p<0,0001 ; \*\*\* : p<0,001 ; \*\* p<0.01\* : p<0,05. Les barres d'erreurs représentent l'écart à la moyenne. Les résultats montrés ont été obtenus au cours de 3 expériences indépendantes.*

La figure 14 montre que l'effet du transfert adoptif de lymphocytes T sur la production de cytokines de type 2 par les ILC des ganglions mésentériques est maintenu lorsque les receveuses déficientes en cellules T ont été pré-traitées avec des antibiotiques. Ce résultat indique que cette régulation ne requiert pas l'activation des lymphocytes T greffés par les antigènes du microbiote. Ainsi l'activation par les antigènes du Soi ou par des antigènes alimentaires suffirait à conférer une fonction régulatrice aux lymphocytes T vis à vis des ILC2.

Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons utilisé un modèle dans lequel les lymphocytes T sont activés par un antigène administré par voie orale de façon similaire aux antigènes alimentaires.

#### **B) Modèle d'activation monoclonale par l'ovalbumine**

Nous avons réalisé des transferts adoptifs de cellules T porteuses d'un TCR spécifique d'un peptide 323-339 issu de l'ovalbumine présenté dans le contexte des molécules du CMH de classe II (RAG2<sup>-/-</sup> TCR tg OTII) dans des souris receveuses CD3 $\epsilon$ <sup>-/-</sup>. L'antigène (Ovalbumine) a été administré par voie orale dans l'eau de boisson et les animaux greffés traités ou non avec l'antigène ont été analysés 12 semaines après transfert adoptif de 3 millions de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> OTII (Fig. 15). En absence d'antigène, les cellules T transgéniques prolifèrent de façon homéostatique et dépendante de l'IL-7 (Feng et al., 2010). L'administration de l'antigène par voie orale induit la prolifération et l'activation des cellules T greffées. La composition et l'activité des ILC des ganglions mésentériques ont été analysées dans ces deux conditions et

comparées aux souris contrôles ( $CD3\epsilon^{-/-}$  injectées avec du PBS) et aux souris ayant reçu des lymphocytes T  $CD4^{+}$  polyclonaux (Fig. 16 et 17).

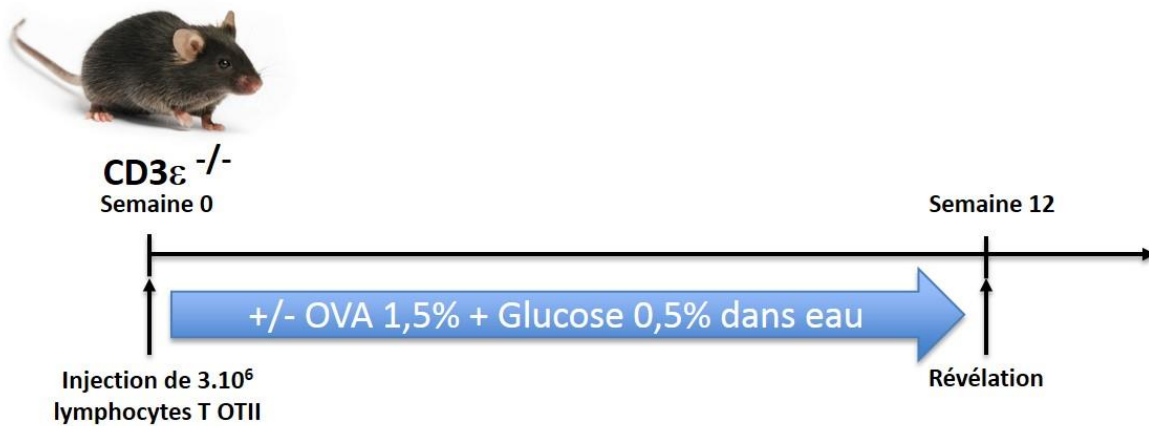


Figure 15 : Activation des lymphocytes T OTII avec l'OVA par voie orale

Les souris déficientes en lymphocytes T ont été greffées avec 3 millions de lymphocytes T  $CD4^{+}$  isolés des rates et des ganglions périphériques de souris  $CD45.2$   $RAG2^{-/-}$  TCR transgénique OTII ou avec du PBS. Quand cela est spécifié, de l'ovalbumine a été ajoutée de manière continue à l'eau de boisson à hauteur de 1.5%. La composition du compartiment ILC des ganglions mésentériques a été analysée 12 semaines plus tard.

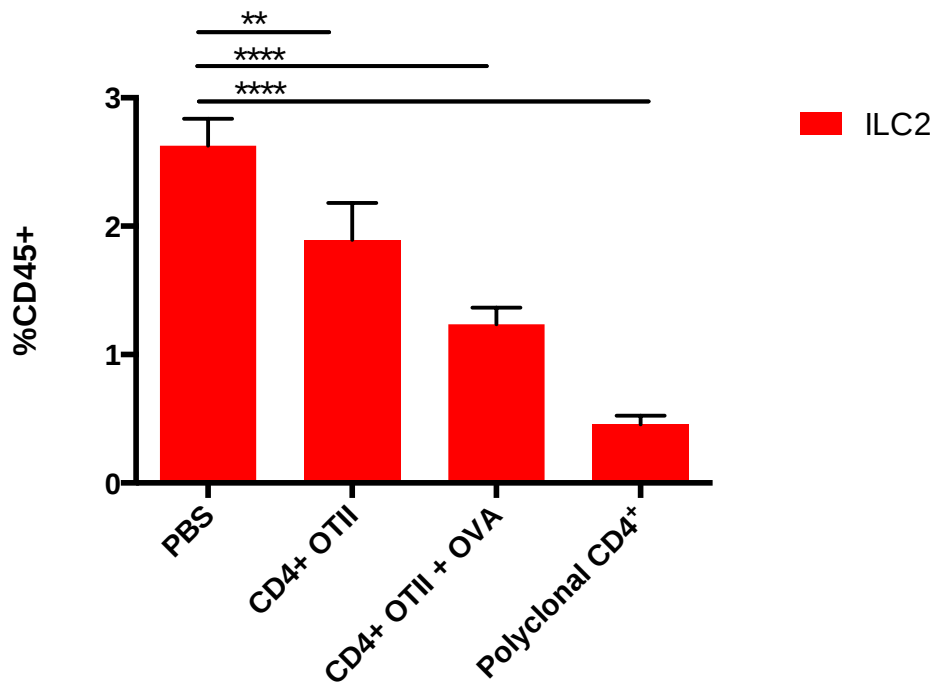


Figure 16 : Comparaison de la fréquence des ILC2 dans les ganglions mésentériques de souris  $CD3\epsilon^{-/-}$  greffées ou non avec les LT  $CD4^{+}$  OTII TCR<sup>tg</sup> avec ou sans administration orale d'ovalbumine

Proportion des ILC2 dans les ganglions mésentériques parmi les cellules hématopoïétiques ( $CD45^{+}$ ) du receveur. Les conditions suivantes ont été testées : les souris injectées avec  $3.10^6$  de lymphocytes T  $CD4^{+}$  OTII ont été traitées avec 1,5% ovalbumine dans l'eau de boisson ( $n=3$ ) ou laissées sans antigène durant toute la procédure ( $n=3$ ). Les souris  $CD3\epsilon^{-/-}$  injectées avec du PBS ( $n=6$ ) et les souris injectées avec des T  $CD4^{+}$  polyclonaux ( $n=6$ ). L'analyse statistique a été réalisée en utilisant un test ANOVA à deux voies avec  $\alpha=0.05$  \*\*\*\* :  $p<0,0001$  ; \*\*\* :  $p<0,001$  ; \*\*  $p<0.01$  ; \* :  $p<0,05$ . Les barres d'erreurs représentent l'écart à la moyenne. Les résultats montrés proviennent d'une expérience représentative de deux.

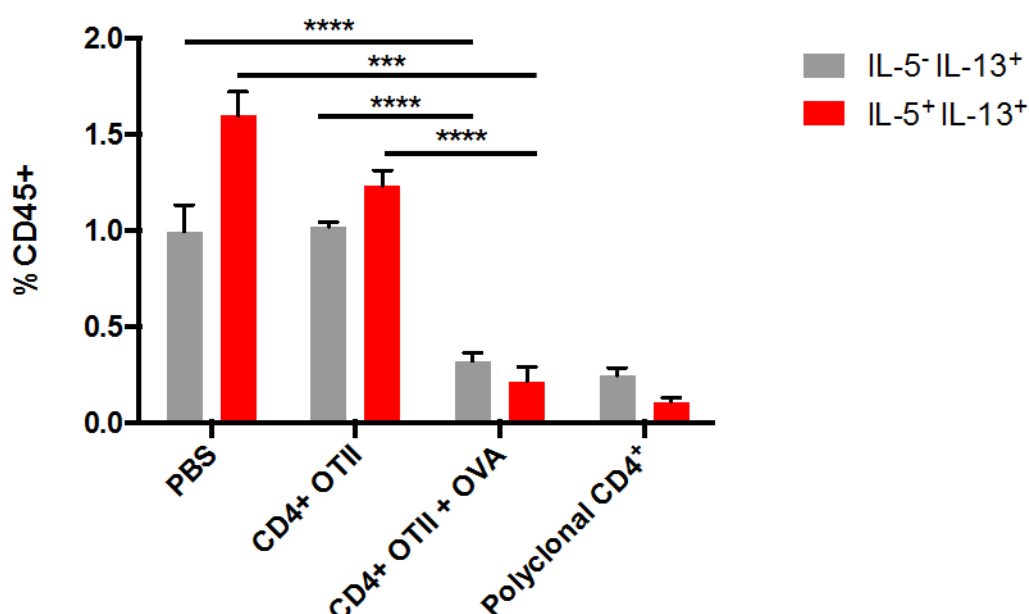


Figure 17 : Comparaison de la fréquence des ILC positives pour l'IL-13 ou l'IL-13 et l'IL-5 dans les ganglions mésentériques de souris  $CD3\epsilon^{-/-}$  greffées ou non avec les LT  $CD4^{+}$  OTII TCR<sup>tg</sup> avec ou sans administration orale d'ovalbumine

Proportion des ILC productrices de cytokines de type 2 dans les ganglions mésentériques parmi les cellules hématopoïétiques du receveur. Les conditions expérimentales testées et la répartition des groupes sont les même que celles décrites dans la légende de la figure 10. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant un test ANOVA à deux voies avec  $\alpha=0.05$

*\*\*\*\* :  $p < 0,0001$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; \*\*  $p < 0,01$  \* :  $p < 0,05$ . Les barres d'erreurs représentent l'écart à la moyenne. Les résultats montrés proviennent d'une expérience représentative de deux.*

Le transfert adoptif de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> OTII en absence d'antigène réduit de manière non significative la proportion des ILC2 au sein des ganglions mésentériques des souris receveuses. Lorsque les cellules transférées sont activées par l'ovalbumine, cette réduction devient significative (Fig. 16). Les mêmes résultats ont été obtenus lorsque la production de cytokines de type 2 par les ILC a été mesurée dans les ganglions mésentériques. En outre, la diminution de production de cytokines induite par l'activation antigénique (OTII + OVA) est plus marquée et s'avère comparable à celle observée lors du transfert adoptif de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> polyclonaux (Fig. 17). Ces observations suggèrent que l'activation des lymphocytes T participe à la régulation des ILC2 des ganglions mésentériques dans le contexte du transfert adoptif.

Dans cette deuxième partie nous nous sommes attachés à décrire les mécanismes responsables de la diminution de la fréquence des ILC2 en condition de reconstitution du compartiment T.

La troisième partie de ce mémoire sera consacrée à l'identification des facteurs environnementaux à l'origine de l'expansion des ILC2 dans les ganglions mésentériques des souris déficientes en cellules T à l'état d'équilibre.

### 3. Etude de l'influence des lymphocytes T sur l'environnement local des ILC

#### *1) Rôle de L'IL-33 dans l'expansion des ILC2 dans les ganglions mésentériques de souris déficientes en cellules T*

##### **A) Expression des facteurs trophiques des ILC2 dans les ganglions mésentériques de souris déficientes en lymphocytes T**

Nous venons d'élucider une partie des mécanismes qui participent à la régulation de l'expansion et de l'activité des ILC2 des ganglions mésentériques de souris déficientes en cellules T dans le contexte d'un transfert adoptif. Cependant, l'identité des facteurs environnementaux qui sont à l'origine de l'expansion et de l'activation de ces cellules en absence de cellules T reste à définir. Nous avons exploré l'environnement tissulaire des ILC2 dans les ganglions mésentériques. En premier lieu, nous avons déterminé si l'absence de lymphocytes T pouvait impacter l'expression de trois facteurs essentiels à la survie et à l'activation des ILC2 en périphérie : IL-33, IL-25 et la lymphopoïétine stromale thymique (TSLP).

L'expression des gènes codant pour chacun de ces facteurs a été mesurée dans les ganglions mésentériques et périphériques de souris déficientes en lymphocyte T ( $CD3\epsilon^{-/-}$ ) ainsi que chez les contrôles immunocompétents de la même portée ( $CD3\epsilon^{+/-}$ ). La détection et la quantification des transcrits ont été réalisées par RT-qPCR sur tissus entiers. L'expression du gène de ménage HPRT a été utilisée pour normaliser les résultats et calculer l'expression relative des gènes étudiés dans chaque échantillon.

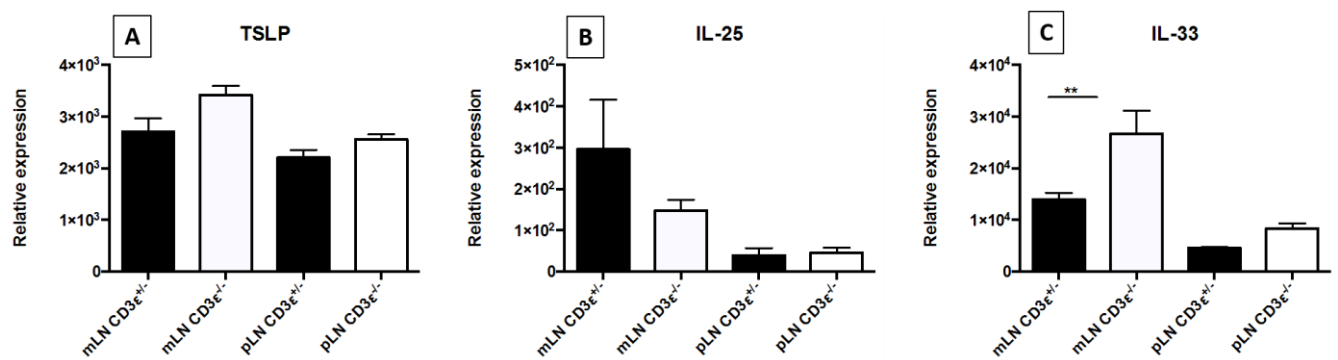


Figure 18 : Expression relative des transcrits codant TSLP, IL-25 et IL-33 dans les ganglions périphériques et mésentériques

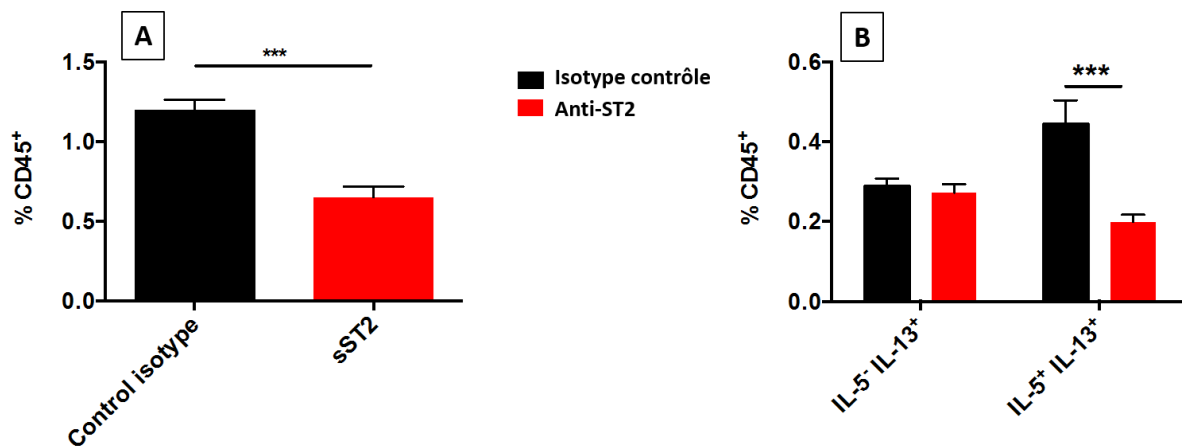
Histogrammes représentant l'expression relative des gènes codant pour TSLP (A), IL-25 (B) et IL-33 (C) dans les ganglions mésentériques et périphériques de souris de 8 semaines déficientes ( $n=4$ ) ou non ( $n=4$ ) pour  $CD3\epsilon$ . L'analyse statistique a été réalisée en utilisant un test de Mann-Whitney avec  $\alpha=0.05$  \*\*\*\* :  $p<0,0001$  ; \*\*\* :  $p<0,001$  ; \*\*  $p<0.01$  \* :  $p<0,05$ . Les barres d'erreurs représentent l'écart à la moyenne.

L'absence de lymphocytes T ne semble pas affecter l'expression relative de TSLP et IL-25 au sein des ganglions périphériques ou mésentériques (Fig. 18A et B). En revanche, on note une augmentation significative de l'expression relative de l'IL-33 dans les ganglions mésentériques des souris dépourvues de lymphocytes T (Fig. 18C). L'IL-33 étant une cytokine essentielle à l'activation, la survie et la migration des ILC2 vers la périphérie (Hammad and Lambrecht, 2015; Pulendran and Artis, 2012), une surexpression locale d'IL-33 pourrait rendre compte, au moins en partie, de l'expansion des ILC2 dans les ganglions mésentériques des souris dépourvues de lymphocytes T.

#### B) Expérience de blocage de la voie de l'IL-33 et effet sur l'homéostasie des ILC2 dans les ganglions mésentériques des souris déficientes les lymphocytes T

Afin d'évaluer la contribution de l'IL-33 dans l'accumulation des ILC2 au sein des ganglions mésentériques de souris dépourvues de cellules T, nous avons réalisé une expérience de blocage de la voie de l'IL-33 *in vivo*. Pour ce faire, nous avons injecté 200µg d'un anticorps bloquant l'interaction entre l'IL-33 et son récepteur ST2 à des souris  $CD3\epsilon^{-/-}$  par voie intra-

péritonéale. 24h après injection, nous avons étudié la proportion et l'état d'activation des ILC2 dans les ganglions mésentériques.



*Figure 19 : Comparaison de la fréquence des ILC2 dans les ganglions mésentériques de souris CD3 $\epsilon$ <sup>-/-</sup> traitées avec un anticorps anti ST2 ou un isotype contrôle.*

*Histogrammes représentant la proportion des ILC2 (A) et la proportion des ILC productrices de cytokines de type 2 (B) au sein des cellules hématopoïétiques des ganglions mésentériques 24h après injection de 200  $\mu$ g d'anti ST2 (n=4) ou d'un isotype contrôle (n=4). L'analyse statistique a été réalisée en utilisant un test ANOVA à deux voies avec  $\alpha=0.05$  \*\*\*\* :  $p<0,0001$  ; \*\*\* :  $p<0,001$  ; \*\*  $p<0.01$  ; \*  $p<0,05$ . Les barres d'erreurs représentent l'écart à la moyenne. Les résultats montrés proviennent d'une expérience représentative de deux.*

Le blocage de la voie IL-33 a permis de diminuer significativement la proportion d'ILC2 parmi les cellules CD45<sup>+</sup> (Fig. 19A) ainsi que la production d'IL-5 et d'IL-13 par celles-ci (Fig. 19B) en seulement 24h. Ces observations indiquent que l'IL-33 participe au déséquilibre de l'homéostasie des ILC2 chez les souris déficientes en lymphocytes T. Mais sont les sources de cette IL-33 ?

### C) Provenance de L'IL-33 dans les ganglions mésentériques et effet des lymphocytes T sur sa production

a) Etude du compartiment non-hématopoïétique des ganglions mésentériques en présence et en absence de lymphocytes T

L'IL-33 est une alarmine exprimée par les cellules endothéliales, les cellules épithéliales et les cellules fibroblastiques (Cayrol and Girard, 2018). L'utilisation d'une lignée murine où l'expression de l'IL-33 est reportée par l'activité de la Beta Galactosidase a permis de localiser l'expression de l'IL-33 dans les cellules fibroblastiques réticulaires (FRC) des ganglions lymphatiques (Pichery et al., 2012). Cela nous a poussés à examiner le compartiment non hématopoïétique des ganglions mésentériques. Afin de déterminer si l'absence de lymphocytes T a un effet sur la composition du compartiment stromal des ganglions et sur la fraction FRC de ce dernier nous avons analysé les cellules non-hématopoïétiques des ganglions mésentériques par cytométrie en flux. Une combinaison de marqueurs tels que MadCAM (Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule), Gp83 (Podoplanine) et CD31 (Platelet endothelial cell adhesion molecule PECAM-1) a été utilisée afin de définir différentes sous populations stromales des ganglions mésentériques identifiables par cytométrie en flux (Kellermayer et al., 2017; Malhotra et al., 2013; Mueller and Germain, 2009).

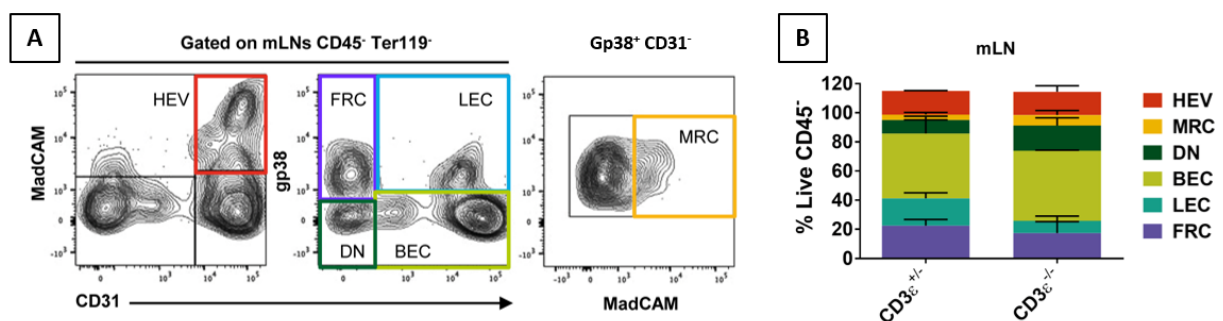


Figure 20 : Comparaison de la composition en cellules stromales des ganglions mésentériques issus de souris CD3 $\epsilon$ <sup>-/-</sup> et de souris contrôles hétérozygotes CD3 $\epsilon$ <sup>+/-</sup>

*(A) Stratégie d'analyse par cytométrie en flux des populations non-hématopoïétiques des ganglions mésentériques. Au sein des cellules CD45<sup>-</sup> Ter119<sup>-</sup> : high endothelial venules (HEV) MadCam<sup>+</sup> CD31<sup>+</sup>, follicular reticular cells (FRC) gp38<sup>+</sup> CD31<sup>-</sup> MadCam<sup>-</sup>, lymphatic endothelial cells (LEC) gp38<sup>+</sup> CD31<sup>+</sup>, blood endothelial cells (BEC) gp38<sup>-</sup> CD31<sup>+</sup>, Marginal reticular cells (MRC) Gp38<sup>+</sup> CD31<sup>-</sup> MadCAM<sup>+</sup>. (B) Histogrammes cumulés représentant les proportions des sous populations au sein des CD45<sup>-</sup> vivantes des ganglions mésentériques de souris CD3ε<sup>+/-</sup> (gauche) et CD3ε<sup>-/-</sup> (droite).*

Nous n'avons pas observé de différences significatives au sein des cellules non-hématopoïétiques des ganglions mésentériques en présence ou absence de lymphocytes T. Cependant, étant donné que nous avons détecté une augmentation de l'expression de l'IL-33 dans les ganglions mésentériques nous avons mesuré l'expression du gène codant cette alarmine au sein des cellules stromales en présence et en absence de cellules T. Dans cet optique, nous avons mis en place une collaboration avec le laboratoire du docteur Lucie Peduto à l'Institut Pasteur dont l'étude des cellules stromales est le domaine d'expertise.

b) Etude de l'expression de l'IL-33 par les cellules non-hématopoïétiques des ganglions mésentériques en présence et en absence de lymphocytes T

L'expression du gène codant l'IL-33 est significativement augmentée dans la fraction CD45<sup>-</sup> des ganglions mésentériques de souris déficientes en cellules T en comparaison aux souris immunocompétentes contrôles (Fig. 21). Cette observation indique que les lymphocytes T régulent de façon directe ou indirecte l'expression de cette alarmine par le compartiment stromal. La reconstitution du compartiment T a-t-elle pour conséquence de moduler l'expression de cette alarmine ?

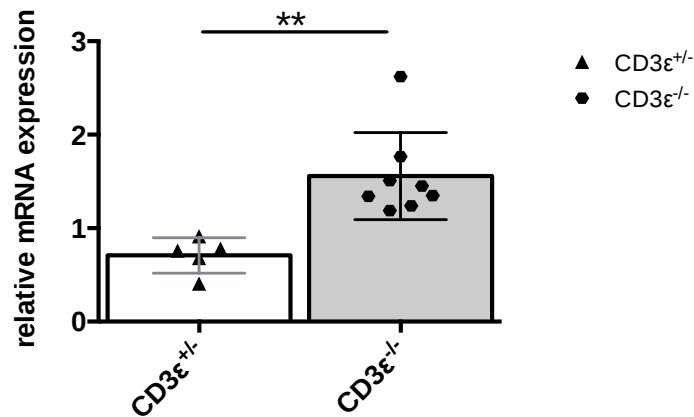


Figure 21 : Expression relative des transcrits codant l'IL-33 au sein des cellules CD45<sup>+</sup> issues des ganglions mésentériques.

Histogramme représentant l'expression relative du gène codant pour l'IL-33 dans les cellules stromales (CD45<sup>+</sup>) isolées et triées à partir des ganglions mésentériques de souris de 8 semaines déficientes en lymphocytes T (n=8) ou non (n=5). L'analyse statistique a été réalisée en utilisant un test de Mann-Whitney avec  $\alpha=0.05$  \*\*\*\* :  $p<0,0001$  ; \*\*\* :  $p<0,001$  ; \*\*  $p<0.01$  ; \* :  $p<0,05$ . Les barres d'erreurs représentent l'écart à la moyenne.

c) La reconstitution du compartiment T rétablit l'expression de l'IL-33 dans les cellules non-hématopoïétiques des ganglions mésentériques

L'effet de la reconstitution des lymphocytes T sur l'expression de l'IL-33 par les cellules CD45<sup>+</sup> des ganglions mésentériques a été mesuré suite à une greffe de lobes thymiques néonataux de souris sauvages sous la capsule rénale de souris CD3 $\epsilon$ <sup>-/-</sup>. Cette dernière permet une reconstitution progressive du compartiment T des receveuses. Nos expériences préliminaires ont montré que, dans ces conditions, la composition des ILC2 change progressivement dans les ganglions mésentériques avec des différences significatives observables 16 semaines après greffe. Ainsi, l'expression de l'IL-33 a été mesurée dans les cellules stromales à ce temps. La greffe de lobes thymiques a pour effet de réduire de manière significative la proportion des ILC2 parmi les cellules CD45<sup>+</sup> (Fig. 22A), en accord avec nos résultats obtenus dans le cadre des transferts adoptifs de lymphocytes T. De plus, elle a aussi pour effet de réduire de manière

significative l'expression de l'IL-33 par les cellules CD45<sup>+</sup> des ganglions mésentériques, la ramenant à un niveau comparable à l'expression mesurée chez les souris CD3 $\epsilon$ <sup>+/-</sup>.

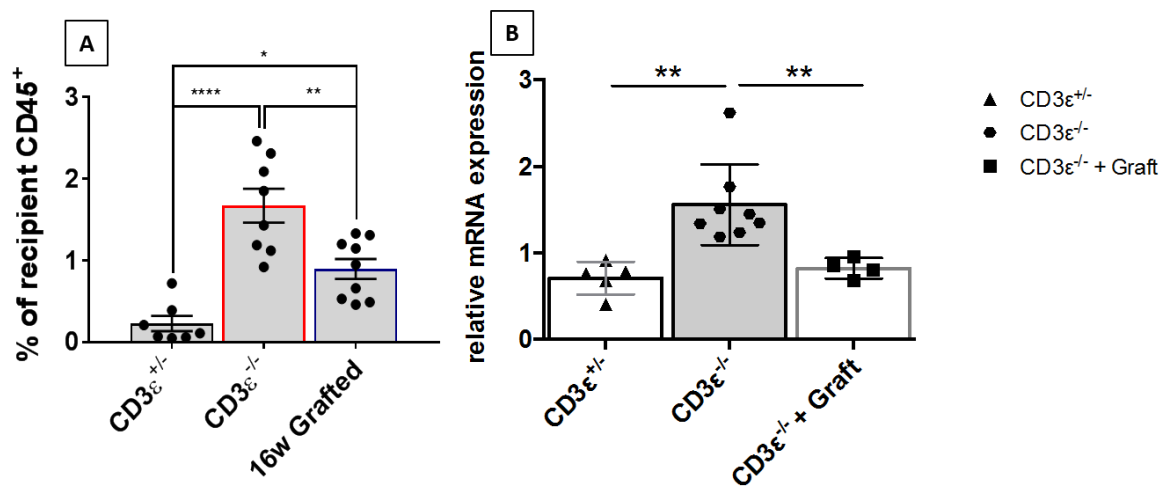


Figure 22 : Fréquence des ILC2 et expression relative des transcrits de l'IL-33 par les cellules CD45<sup>+</sup> dans les ganglions mésentériques de souris déficientes en cellules T comparées aux valeurs observées chez les contrôles hétérozygotes et chez des souris ayant subi une greffe de lobe thymique.

Les souris CD3 $\epsilon$ <sup>-/-</sup> ont été greffées avec des lobes thymiques néonataux sous la capsule rénale (n=4). Seize semaines plus tard la proportion des ILC2 dans les ganglions mésentériques (A) et l'expression de l'IL-33 relative à l'HPRT dans les cellules CD45<sup>+</sup> des ganglions mésentériques (B) ont été mesurés. Les proportions ont été comparés à des souris du même âge, CD3 $\epsilon$ <sup>-/-</sup> (n=8) et CD3 $\epsilon$ <sup>+/-</sup> (n=8). L'analyse statistique a été réalisée en utilisant un test ANOVA à deux voies (A) et un test de Mann-Whitney (B) avec alpha=0.05 \*\*\*\* : p<0,0001 ; \*\*\* : p<0,001 ; \*\* p<0.01\* : p<0,05. Les barres d'erreurs représentent l'écart à la moyenne.

L'absence de lymphocytes T module donc l'homéostasie des ILC2 au moins en partie via l'expression de l'IL-33 par les cellules CD45<sup>+</sup> dans les ganglions mésentériques et ce mécanisme est réversible en cas de reconstitution du compartiment T.

## V] CONCLUSION

Nos résultats ont montré que la composition et l'activité des ILC2 sont affectées par l'absence de lymphocytes T dans les ganglions mésentériques. En effet, on constate une augmentation significative de la fréquence des ILC2 (Fig. 6) et de la production de cytokines de type 2 (en l'occurrence l'IL-5 et l'IL-13) (Fig. 7) dans cet organe chez les souris  $CD3\epsilon^{-/-}$ . De plus, un transfert adoptif de lymphocytes T matures par voie intraveineuse chez ces souris réduit la fréquence des ILC2 (Fig. 11) et leur activité (Fig. 12) à des niveaux comparables à ceux observés chez les souris immunocompétentes, et ce quel que soit le sous-type de lymphocytes T transféré. Ces observations suggèrent que les lymphocytes T participent à la régulation de l'homéostasie des ILC2.

Nous avons également montré que cette régulation ne dépend pas de l'activation des lymphocytes T par le microbiote de l'hôte. En effet, la régulation de la production des cytokines de type 2 par les ILC est maintenue lorsque le transfert adoptif de lymphocytes T matures est effectué dans des souris traitées aux antibiotiques à large spectre (Fig. 14).

Nous avons démontré le rôle crucial de l'activation des LT en utilisant un modèle d'activation monoclonal. Des lymphocytes T issus de souris  $RAG^{-/-}$  OTII<sup>TG</sup> spécifiques d'un peptide issu de l'ovalbumine présenté dans le contexte des molécules du CMH de classe II ont été transférés dans des souris déficientes en cellules T (Fig. 15). Dans ce contexte, nous avons observé que la proportion des ILC2 (Fig. 16) et de la production d'IL-5 et d'IL-13 par les ILC (Fig. 17) sont significativement réduites lorsque les lymphocytes T sont activés par l'antigène (OVA) et ce, à des niveaux comparables que ceux observés suite au transfert de lymphocytes T CD4+ polyclonaux.

En outre de ce mécanisme de régulation dépendant de l'activation des lymphocytes T transférés, nous avons montré que l'IL-33 est impliquée dans la régulation de l'homéostasie des ILC2 par les LT.

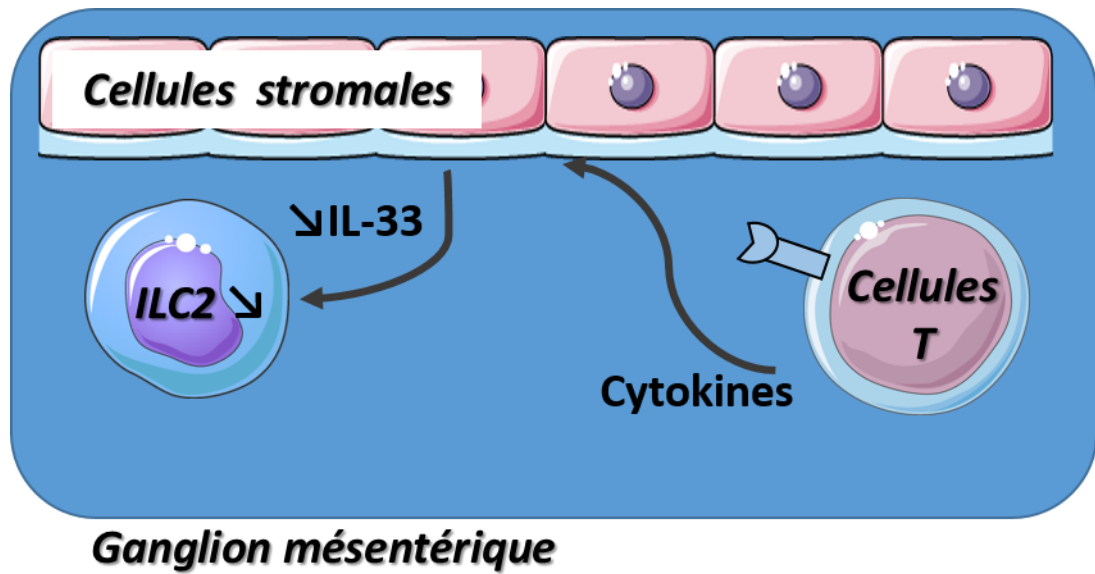
En effet, la prolifération et l'activation des ILC2 sont régulées par divers facteurs environnementaux dont les alarmines TSLP, IL-25 et IL-33. Nous avons mesuré l'expression des gènes codant ces alarmines dans les ganglions mésentériques et montré que l'expression de l'IL-33 est augmentée dans les ganglions mésentériques des souris déficientes en lymphocytes T (Fig. 18). Afin de confirmer l'implication de cette alarmine dans l'accumulation des ILC2 au sein des ganglions mésentériques des souris  $CD3\epsilon^{-/-}$ , nous avons neutralisé de

manière systémique la voie de l'IL-33 par un anticorps monoclonal bloquant de son récepteur ST2. La diminution significative de la proportion d'ILC2 et de la production des cytokines de type 2 (Fig. 19A et B) observées chez les souris traitées suggèrent que l'IL-33 participe à la régulation de l'homéostasie des ILC2 par les LT dans les ganglions mésentériques.

La principale source d'IL-33 réside au sein des cellules stromales dans les ganglions mésentériques. Nous avons observé que la composition de ces cellules n'est pas impactée en absence de lymphocytes T (Fig. 20). En revanche l'expression de l'IL-33 est augmentée dans les cellules non hématopoïétiques des ganglions mésentériques en absence de cellules T et la reconstitution du compartiment T réduit significativement cette dernière (Fig. 22).

En résumé, ce travail a permis de mettre en évidence certains mécanismes n'ayant jamais été décrits dans la littérature (Fig. 23):

- Le déficit en lymphocyte T affecte l'abondance et l'activité des ILC2 résidentes des ganglions mésentériques.
- L'activation des lymphocytes T est nécessaire à la régulation des ILC2 dans le contexte de la reconstitution du compartiment T chez l'adulte.
- Les lymphocytes T régulent l'homéostasie des ILC2 résidentes des ganglions mésentériques en limitant la production d'IL-33 par les cellules stromales.

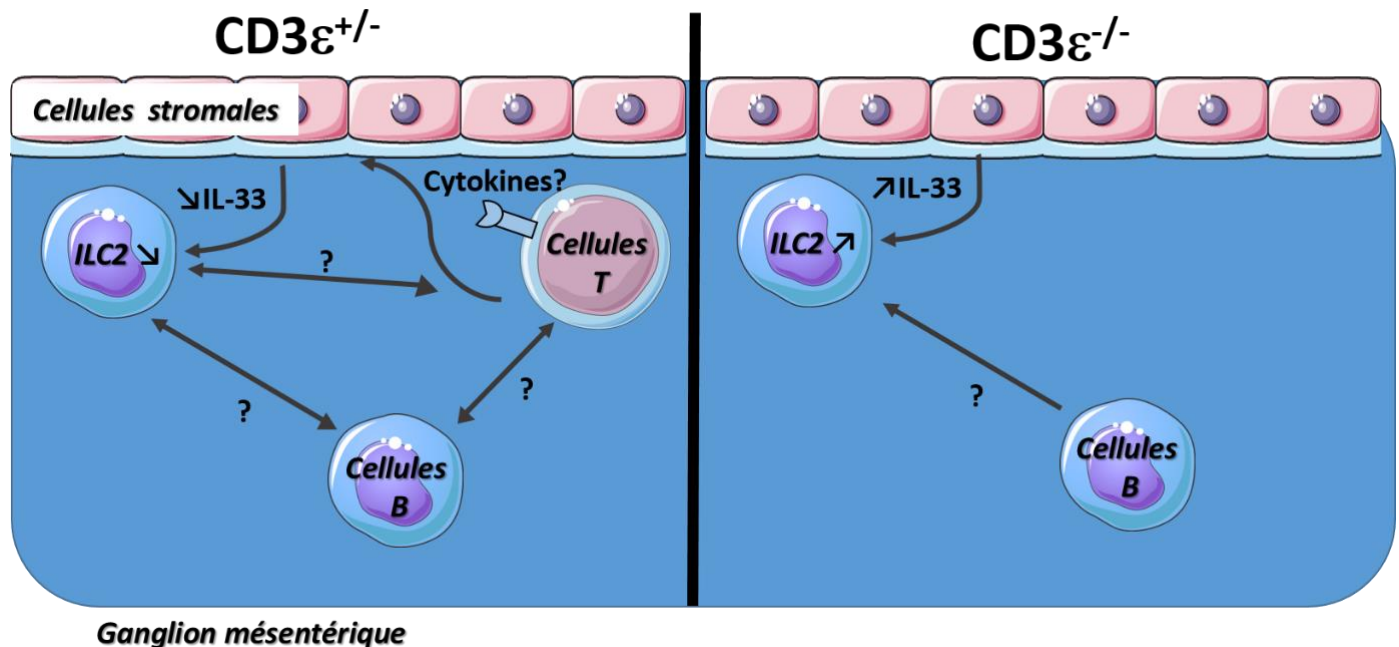


*Figure 23 : Les lymphocytes T régulent l'homéostasie des ILC2 du ganglion mésentérique via les cellules stromales.*

*Les lymphocytes T régulent l'homéostasie des ILC2 des ganglions mésentériques en régulant l'expression de l'alarmine IL-33 par les cellules stromales environnantes.*

## VI] DISCUSSION

Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives sur les interactions entre les ILC et le système immunitaire adaptatif. Cependant, le rôle de certaines interactions cellulaires et de certains médiateurs reste à explorer (Fig. 24).



*Figure 24 : Axes possibles de recherches dans le prolongement de ce mémoire*

Dans le futur, plusieurs points restent à éclaircir : le, ou les sous types des lymphocytes T responsables de la régulation des ILC2 des ganglions mésentériques ainsi que leurs modes d'action (directs et indirects). Le rôle des lymphocytes B reste également à évaluer.

### *Sous-type de lymphocytes T*

Nous avons démontré que le transfert adoptif et l'activation des lymphocytes CD4<sup>+</sup> permettent de réguler l'homéostasie des ILC2.

Par ailleurs, l'équipe de Omid Akbari a montré que l'expression du récepteur de co-stimulation ICOS (ICOS= *Inducible T-cell COStimulator*) par les lymphocytes T régulateurs induits (iTregs) en combinaison avec la production de TGF-β et d'IL-10 induit une réduction drastique de la concentration d'IL-5 et d'IL-13 dans le surnageant des co-cultures associant iTregs et ILC2. Ces observations ont été confirmées *in vivo* dans un modèle d'asthme induit au sein de souris NSG

où le co-transfert d'ILC2 et d'iTregs atténue les symptômes médiés par l'AHR (Aron and Akbari; Maazi et al., 2015).

Ainsi le rôle des LT CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> dans la régulation des ILC2 a été évalué dans le contexte des transferts adoptifs. Nous avons observé une régulation de même nature et de même ordre dans le cas du transfert adoptif de LT CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> ou de celui de LT CD4<sup>+</sup> totaux.

Cependant, lors de ce transfert, une partie des lymphocytes T régulateurs perd l'expression du facteur de transcription Foxp3, et se différencie en lymphocytes T folliculaires ou effecteurs (Kawamoto et al., 2014). Ceci rend difficile l'estimation de l'impact de ces différentes populations dans la régulation des ILC2 des ganglions mésentériques. Il est possible de stabiliser le phénotype des lymphocytes T Foxp3<sup>+</sup> en présence de complexes IL-2 + anti-IL-2 (Boyman et al., 2006). En procédant ainsi, nous pourrions distinguer le rôle joué par les Tregs de celui de leur(s) descendance(s) putatives.

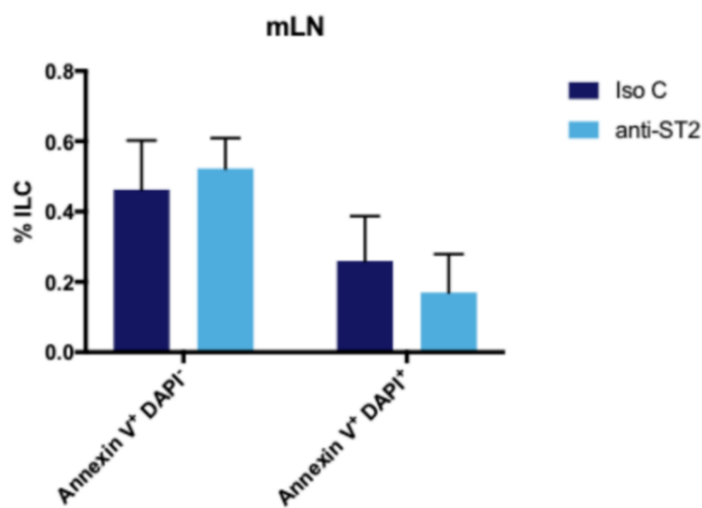
Afin de contourner ce problème et de déterminer si les lymphocytes T régulateurs peuvent directement interagir et réguler les ILC2, nous avons mis en culture des Tregs issus de souris Foxp3<sup>GFP</sup> et des ILC2 issues de souris CD3ε<sup>-/-</sup> en présence d'IL-2 et d'IL-7 pendant 48h. L'analyse par cytométrie en flux a révélé que la majorité des ILC2 meurt en présence de Tregs, rendant difficile l'analyse de la sécrétion des cytokines de type 2. Cette diminution de la survie des ILC2 pourrait être attribuée à la consommation de l'IL-2 et/ou des nutriments du milieu par les T régulateurs et pourrait constituer un mécanisme complémentaire de régulation de l'homéostasie des ILC2 par les lymphocytes T des ganglions mésentériques à celui présenté dans ce mémoire.

### *Survie des ILC2*

Lors du traitement avec l'anticorps bloquant la voie de l'IL-33, la proportion des ILC2 parmi les cellules CD45<sup>+</sup> a été significativement diminuée en seulement 24h (Fig. 17). Cette diminution rapide soulève la question de son mécanisme. Est-elle liée à une apoptose des ILC2 suite au blocage de la voie de l'IL-33? Pour répondre à cette question, nous avons mesuré l'apoptose des ILC2 par cytométrie en flux à l'aide d'un marquage par l'Annexine V et le DAPI.

L'annexine V est une protéine qui a la particularité de se lier à la phosphatidylsérine exposée à la surface membranaire des cellules apoptotiques. Le DAPI se fixe sur l'ADN et permet de déterminer si la membrane plasmique est endommagée (Koopman et al., 1994).

Cette expérience n'a pas révélé d'augmentation de la proportion des ILC apoptotiques suite au traitement avec l'anticorps bloquant l'interaction entre l'IL-33 et son récepteur (Fig. 25). Ainsi, la diminution de la proportion des ILC2 parmi les cellules CD45<sup>+</sup> des ganglions mésentériques après le blocage de la voie de l'IL-33 n'est pas accompagnée d'une augmentation de l'apoptose des ILC. Il serait intéressant de réaliser la même étude, tout au long de la reconstitution des lymphocytes T après transfert adoptif dans des animaux CD3 $\epsilon^{-/-}$ .



*Figure 25 : Fréquence des ILC positives pour l'Annexin V au sein des ganglions mésentériques issus de souris CD3 $\epsilon^{-/-}$  traitées avec un anti-ST2 ou un isotype contrôle. Pourcentage des ILC Annexin V<sup>+</sup> DAPI<sup>-</sup> et Annexin V<sup>+</sup> DAPI<sup>+</sup> dans les ganglions mésentériques de souris CD3 $\epsilon^{-/-}$  traitées avec un anticorps anti-ST2 (n=4) ou avec un isotype contrôle (n=4).*

### **Activation des lymphocytes T**

Nous avons montré que l'activation des LT est nécessaire à la régulation des ILC2 dans le contexte d'un transfert adoptif. L'activation spontanée des LT CD4<sup>+</sup> transférés est accompagnée d'une forte production d'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ) par ces cellules. Par ailleurs il a été rapporté que l'IFN $\gamma$  peut avoir des effets antagonistes sur l'activité des ILC2 (Duerr et

al., 2016; Moro et al., 2016). Afin d'évaluer le rôle de cette cytokine dans la régulation exercée par les LT, des lymphocytes T issus de souris  $\text{IFN-}\gamma^{-/-}$  ont été injectés à des souris  $\text{CD3}\epsilon^{-/-}$ . Ces expériences ont montré que la régulation de l'homéostasie des ILC2 des ganglions mésentériques est maintenue lorsque les lymphocytes T ne produisent pas d' $\text{IFN}\gamma$ . Cette observation indique que l' $\text{IFN}\gamma$  joue un rôle accessoire dans cette régulation mais n'exclut pas sa participation en synergie avec d'autres cytokines qui restent à identifier.

### *Rôle des lymphocytes B*

L'observation princeps de ce mémoire, la dérégulation de l'homéostasie des ILC chez les souris déficientes pour  $\text{CD3}\epsilon$ , a également été observée chez les souris  $\text{RAG2}^{-/-}$ , déficientes en lymphocytes T et B. Des transferts adoptifs de lymphocytes T ont également été réalisés chez ces souris. Cependant, nos résultats montrent que la régulation des ILC2 des ganglions mésentériques par les lymphocytes T n'a plus lieu en absence de lymphocytes B.

Des interactions entre lymphocytes B et ILC1 ont déjà été documentées (Nguyen and Baumgarth, 2016). Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées concernant les mécanismes par lesquels les lymphocytes B pourraient participer à la régulation de l'homéostasie des ILC des tissus lymphoïdes :

- Une diminution de la disponibilité des facteurs de survie (IL-7)
- Confinement du microbiote intestinal via les IgA (Fujihashi et al., 2001)

Ainsi, les investigations suivantes pourraient être effectuées afin de caractériser le rôle des cellules B dans la régulation de l'homéostasie des ILC.

- Le transfert adoptif de splénocytes totaux ou de lymphocytes B issus de souris sauvages ou  $\text{Aicda}^{-/-}$  au sein de souris  $\text{Rag2}^{-/-}$  (Wei et al., 2011).
- L'analyse du phénotype des ILC dans les ganglions mésentériques de souris  $\mu\text{MT}^{-/-}$ , déficientes en lymphocytes B.

Concernant ce dernier point, un collaborateur de l'institut Pasteur (Sascha Cording) nous a communiqué l'absence de modifications de l'homéostasie des ILC chez les souris dépourvues de cellules B ( $\mu\text{MT}^{-/-}$ ).

### *Rôle de l'IL-2 produite par les ILC*

L'IL-2 est facteur de survie et de croissance dont dépendent les lymphocytes T et les ILC exprimant son récepteur de haute affinité CD25 (T activées, Tregs, ILC2). En outre, lymphocytes T activés et ILC2 sont capables de produire de l'IL-2 et d'agir sur leur survie de façon autocrine. Par ailleurs, les Tregs sont plus consommateurs que producteurs et peuvent diminuer la concentration en IL-2 de façon locale (Gasteiger et al., 2015) (Ainsi, l'augmentation de la fréquence des ILC2 dans les ganglions mésentériques des souris  $CD3\epsilon^{-/-}$  pourrait s'expliquer par une augmentation de la disponibilité de l'IL-2 due à la déficience en lymphocytes Tregs. L'absence de LT pourrait également impacter la production d'IL-2 par les ILC.

Nous avons alors analysé la fraction d'ILC productrices d'IL-2 à l'état d'équilibre dans les ganglions mésentériques de souris  $CD3\epsilon^{-/-}$  et  $CD3\epsilon^{+/-}$  (Fig. 24A) ainsi que dans le contexte d'un transfert adoptif de lymphocytes T (Fig. 24B). Nos résultats montrent que la fréquence d'ILC productrices d'IL-2 augmente de manière significative dans les ganglions mésentériques de souris déficientes en lymphocytes T. La reconstitution en lymphocytes T tend à diminuer cette proportion. Ces observations suggèrent que les lymphocytes T peuvent jouer un rôle dans la régulation des ILC des ganglions mésentériques via la suppression de la production d'IL-2 par les ILC. Ainsi une neutralisation de l'IL-2 *in vivo* pourrait être réalisée afin de confirmer cette hypothèse.

### ILC productrices d'IL-2 dans les ganglions mésentériques

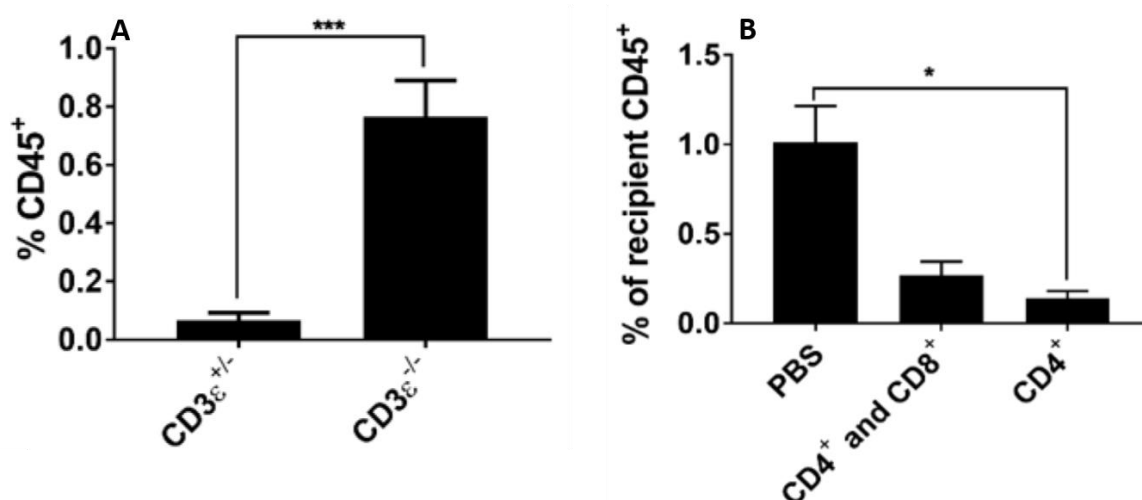


Figure 26 : Comparaison de la fréquence des ILC productrices d'IL-2 dans les ganglions mésentériques de souris déficientes en cellules T, de contrôles immuno-compétents et de souris déficientes reconstituées..

(A) Histogrammes montrant le pourcentage d'ILC produisant de l'IL-2 au sein des cellules CD45<sup>+</sup> dans les ganglions mésentériques chez des souris immunocompétentes (n=5) ou déficientes en lymphocytes T (n=5). (B) Histogrammes montrant le pourcentage d'ILC produisant de l'IL-2 parmi les cellules CD45<sup>+</sup> dans les ganglions mésentériques suite au transfert adoptif de lymphocytes T. Les souris CD3 $\epsilon^{-/-}$  ont été injectées avec  $3.10^6$  cellules d'un mélange de T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (n=4), de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> seuls (n=5) ou avec du PBS (n=5). L'analyse a été réalisée 12 semaines après injection. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant un test ANOVA à deux voies avec  $\alpha=0.05$  \*\*\*\* :  $p<0,0001$  ; \*\*\* :  $p<0,001$  ; \*\*  $p<0.01$  ; \* :  $p<0,05$ . Les barres d'erreurs représentent l'écart à la moyenne.

## VII] BIBLIOGRAPHIE

1. Aron, J.L., and Akbari, O. Regulatory T cells and type 2 innate lymphoid cell-dependent asthma. *Allergy* **72**, 1148–1155.
2. Bal, S.M., Bernink, J.H., Nagasawa, M., Groot, J., Shikhagaie, M.M., Golebski, K., van Drunen, C.M., Lutter, R., Jonkers, R.E., Hombrink, P., et al. (2016). IL-1 $\beta$ , IL-4 and IL-12 control the fate of group 2 innate lymphoid cells in human airway inflammation in the lungs. *Nat. Immunol.* **17**, 636–645.
3. Bando, J.K., Liang, H.-E., and Locksley, R.M. (2015). Identification and distribution of developing innate lymphoid cells in the fetal mouse intestine. *Nat. Immunol.* **16**, 153–160.
4. Boos, M.D., Yokota, Y., Eberl, G., and Kee, B.L. (2007). Mature natural killer cell and lymphoid tissue-inducing cell development requires Id2-mediated suppression of E protein activity. *J Exp Med* **204**, 1119–1130.
5. Boyman, O., Kovar, M., Rubinstein, M.P., Surh, C.D., and Sprent, J. (2006). Selective stimulation of T cell subsets with antibody-cytokine immune complexes. *Science* **311**, 1924–1927.
6. Camelo, A., Rosignoli, G., Ohne, Y., Stewart, R.A., Overed-Sayer, C., Sleeman, M.A., and May, R.D. (2017). IL-33, IL-25, and TSLP induce a distinct phenotypic and activation profile in human type 2 innate lymphoid cells. *Blood Adv.* **1**, 577–589.
7. Cayrol, C., and Girard, J.-P. (2018). Interleukin-33 (IL-33): A nuclear cytokine from the IL-1 family. *Immunol. Rev.* **281**, 154–168.
8. Cella, M., Fuchs, A., Vermi, W., Facchetti, F., Otero, K., Lennerz, J.K., Doherty, J.M., Mills, J.C., and Colonna, M. (2009). A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature* **457**, 722–725.
9. Cherrier, M., Sawa, S., and Eberl, G. (2012). Notch, Id2, and ROR $\gamma$ mat sequentially orchestrate the fetal development of lymphoid tissue inducer cells. *J Exp Med* **209**, 729–740.

10. Constantinides, M.G., Gudjonson, H., McDonald, B.D., Ishizuka, I.E., Verhoef, P.A., Dinner, A.R., and Bendelac, A. (2015). PLZF expression maps the early stages of ILC1 lineage development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 5123–5128.
11. Duerr, C.U., McCarthy, C.D.A., Mindt, B.C., Rubio, M., Meli, A.P., Pothlichet, J., Eva, M.M., Gauchat, J.-F., Qureshi, S.T., Mazer, B.D., et al. (2016). Type I interferon restricts type 2 immunopathology through the regulation of group 2 innate lymphoid cells. *Nat. Immunol.* *17*, 65–75.
12. Eberl, G., Marmon, S., Sunshine, M.J., Rennert, P.D., Choi, Y., and Littman, D.R. (2004). An essential function for the nuclear receptor ROR $\gamma$ (t) in the generation of fetal lymphoid tissue inducer cells. *Nat Immunol* *5*, 64–73.
13. Engelbertsen, D., Foks, A.C., Alberts-Grill, N., Kuperwaser, F., Chen, T., Lederer, J.A., Jarolim, P., Grabie, N., and Lichtman, A.H. (2015). Expansion of CD25<sup>+</sup> Innate Lymphoid Cells Reduces Atherosclerosis Significance. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *35*, 2526–2535.
14. Feng, T., Wang, L., Schoeb, T.R., Elson, C.O., and Cong, Y. (2010). Microbiota innate stimulation is a prerequisite for T cell spontaneous proliferation and induction of experimental colitis. *J. Exp. Med.* *207*, 1321–1332.
15. Fujihashi, K., Kato, H., van Ginkel, F.W., Koga, T., Boyaka, P.N., Jackson, R.J., Kato, R., Hagiwara, Y., Etani, Y., Goma, I., et al. (2001). A revisit of mucosal IgA immunity and oral tolerance. *Acta Odontol. Scand.* *59*, 301–308.
16. Gasteiger, G., Fan, X., Dikiy, S., Lee, S.Y., and Rudensky, A.Y. (2015). Tissue residency of innate lymphoid cells in lymphoid and nonlymphoid organs. *Science* *350*, 981–985.
17. Goh, W., and Huntington, N.D. (2017). Regulation of Murine Natural Killer Cell Development. *Front. Immunol.* *8*, 130.
18. Halim, T.Y.F., Steer, C.A., Mathä, L., Gold, M.J., Martinez-Gonzalez, I., McNagny, K.M., McKenzie, A.N.J., and Takei, F. (2014). Group 2 Innate Lymphoid Cells Are Critical for the Initiation of Adaptive T Helper 2 Cell-Mediated Allergic Lung Inflammation. *Immunity* *40*, 425–435.

19. Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2015). Barrier Epithelial Cells and the Control of Type 2 Immunity. *Immunity* 43.
20. Hepworth, M.R., Monticelli, L.A., Fung, T.C., Ziegler, C.G.K., Grunberg, S., Sinha, R., Mantegazza, A.R., Ma, H.-L., Crawford, A., Angelosanto, J.M., et al. (2013). Innate lymphoid cells regulate CD4<sup>+</sup> T-cell responses to intestinal commensal bacteria. *Nature* 498, 113–117.
21. Hepworth, M.R., Fung, T.C., Masur, S.H., Kelsen, J.R., McConnell, F.M., Dubrot, J., Withers, D.R., Hugues, S., Farrar, M.A., Reith, W., et al. (2015). Group 3 innate lymphoid cells mediate intestinal selection of commensal bacteria–specific CD4<sup>+</sup> T cells. *Science* 348, 1031–1035.
22. Hirose, K., Iwata, A., Tamachi, T., and Nakajima, H. (2017). Allergic airway inflammation: key players beyond the Th2 cell pathway. *Immunol. Rev.* 278, 145–161.
23. Honda, K., Nakano, H., Yoshida, H., Nishikawa, S., Rennert, P., Ikuta, K., Tamechika, M., Yamaguchi, K., Fukumoto, T., Chiba, T., et al. (2001). Molecular basis for hematopoietic/mesenchymal interaction during initiation of Peyer’s patch organogenesis. *J. Exp. Med.* 193, 621–630.
24. Hoyler, T., Klose, C.N., Souabni, A., Turqueti-Neves, A., Pfeifer, D., Rawlins, E., Voehringer, D., Busslinger, M., and Diefenbach, A. (2012). The Transcription Factor GATA-3 Controls Cell Fate and Maintenance of Type 2 Innate Lymphoid Cells. *Immunity* 37, 634–648.
25. Huang, Y., Guo, L., Qiu, J., Chen, X., Hu-Li, J., Siebenlist, U., Williamson, P.R., Urban, J.F., and Paul, W.E. (2015). IL-25-responsive, lineage-negative KLRG1(hi) cells are multipotential “inflammatory” type 2 innate lymphoid cells. *Nat. Immunol.* 16, 161–169.
26. Huang, Y., Mao, K., Chen, X., Sun, M.-A., Kawabe, T., Li, W., Usher, N., Zhu, J., Urban, J.F., Paul, W.E., et al. (2018). S1P-dependent interorgan trafficking of group 2 innate lymphoid cells supports host defense. *Science* 359, 114–119.

27. Ishizuka, I.E., Constantinides, M.G., Gudjonson, H., and Bendelac, A. (2016). The Innate Lymphoid Cell Precursor. *Annu. Rev. Immunol.* **34**, 299–316.
28. Kawamoto, S., Maruya, M., Kato, L.M., Suda, W., Atarashi, K., Doi, Y., Tsutsui, Y., Qin, H., Honda, K., Okada, T., et al. (2014). Foxp3<sup>+</sup> T Cells Regulate Immunoglobulin A Selection and Facilitate Diversification of Bacterial Species Responsible for Immune Homeostasis. *Immunity* **41**, 152–165.
29. Kellermayer, Z., Vojkovics, D., and Balogh, P. (2017). Innate lymphoid cells and their stromal microenvironments. *Immunol. Lett.* **189**, 3–9.
30. Kieper, W.C., Troy, A., Burghardt, J.T., Ramsey, C., Lee, J.Y., Jiang, H.-Q., Dummer, W., Shen, H., Cebra, J.J., and Surh, C.D. (2005). Recent immune status determines the source of antigens that drive homeostatic T cell expansion. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **174**, 3158–3163.
31. Kiessling, R., Klein, E., and Wigzell, H. (1975). “Natural” killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur. J. Immunol.* **5**, 112–117.
32. Kim, H.Y., Umetsu, D.T., and Dekruyff, R.H. (2016). Innate lymphoid cells in asthma: Will they take your breath away? *Eur. J. Immunol.* **46**, 795–806.
33. Kim, M.H., Taparowsky, E.J., and Kim, C.H. (2015). Retinoic Acid Differentially Regulates the Migration of Innate Lymphoid Cell Subsets to the Gut. *Immunity* **43**, 107–119.
34. Klose, C.S.N., and Artis, D. (2016). Innate lymphoid cells as regulators of immunity, inflammation and tissue homeostasis. *Nat Immunol* **17**, 765–774.
35. 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.

36. Koga, S., Hozumi, K., Hirano, K., Yazawa, M., Teruoatea, T., Minoda, A., Nagasawa, T., Koyasu, S., and Moro, K. (2018). Peripheral PDGFR $\alpha$ +gp38+ mesenchymal cells support the differentiation of fetal liver–derived ILC2. *J. Exp. Med.* **215**, 1609–1626.
37. Koopman, G., Reutelingsperger, C.P., Kuijten, G.A., Keehnen, R.M., Pals, S.T., and van Oers, M.H. (1994). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* **84**, 1415–1420.
38. Krabbendam, L., Bal, S.M., Spits, H., and Golebski, K. (2018). New insights into the function, development, and plasticity of type 2 innate lymphoid cells. *Immunol. Rev.* **286**, 74–85.
39. Luther, S.A., Ansel, K.M., and Cyster, J.G. (2003). Overlapping roles of CXCL13, interleukin 7 receptor alpha, and CCR7 ligands in lymph node development. *J. Exp. Med.* **197**, 1191–1198.
40. Maazi, H., Patel, N., Sankaranarayanan, I., Suzuki, Y., Rigas, D., Soroosh, P., Freeman, G.J., Sharpe, A.H., and Akbari, O. (2015). ICOS:ICOS-ligand interaction is required for type 2 innate lymphoid cell function, homeostasis, and induction of airway hyperreactivity. *Immunity* **42**, 538–551.
41. Mackley, E.C., Houston, S., Marriott, C.L., Halford, E.E., Lucas, B., Cerovic, V., Filbey, K.J., Maizels, R.M., Hepworth, M.R., Sonnenberg, G.F., et al. (2015). CCR7-dependent trafficking of RORgamma(+) ILCs creates a unique microenvironment within mucosal draining lymph nodes. *Nat. Commun.* **6**.
42. Malhotra, D., Fletcher, A.L., and Turley, S.J. (2013). Stromal and hematopoietic cells in secondary lymphoid organs: partners in immunity. *Immunol Rev* **251**, 160–176.
43. Martin, C.E., Spasova, D.S., Frimpong-Boateng, K., Kim, H.-O., Lee, M., Kim, K.S., and Surh, C.D. Interleukin-7 Availability Is Maintained by a Hematopoietic Cytokine Sink Comprising Innate Lymphoid Cells and T Cells. *Immunity* **47**, 171-182.e4.
44. Martinez-Gonzalez, I., Mathä, L., Steer, C.A., Ghaedi, M., Poon, G.F.T., and Takei, F. (2016). Allergen-Experienced Group 2 Innate Lymphoid Cells Acquire Memory-like Properties and Enhance Allergic Lung Inflammation. *Immunity* **45**, 198–208.

45. McKenzie, A.N.J., Spits, H., and Eberl, G. (2014). Innate Lymphoid Cells in Inflammation and Immunity. *Immunity* 41, 366–374.
46. Mebius, R.E., Rennert, P., and Weissman, I.L. (1997). Developing lymph nodes collect CD4+CD3- LTbeta+ cells that can differentiate to APC, NK cells, and follicular cells but not T or B cells. *Immunity* 7, 493–504.
47. Melo-Gonzalez, F., and Hepworth, M.R. (2017). Functional and phenotypic heterogeneity of group 3 innate lymphoid cells. *Immunology* 150, 265–275.
48. Min, B., Yamane, H., Hu-Li, J., and Paul, W.E. (2005). Spontaneous and homeostatic proliferation of CD4 T cells are regulated by different mechanisms. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 174, 6039–6044.
49. von Moltke, J., Ji, M., Liang, H.-E., and Locksley, R.M. (2016). Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2-epithelial response circuit. *Nature* 529, 221–225.
50. Monticelli, L.A., Osborne, L.C., Noti, M., Tran, S.V., Zaiss, D.M.W., and Artis, D. (2015). IL-33 promotes an innate immune pathway of intestinal tissue protection dependent on amphiregulin-EGFR interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 10762–10767.
51. Moro, K., Yamada, T., Tanabe, M., Takeuchi, T., Ikawa, T., Kawamoto, H., Furusawa, J., Ohtani, M., Fujii, H., and Koyasu, S. (2009). Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)/Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature* 463, 540–544.
52. Moro, K., Kabata, H., Tanabe, M., Koga, S., Takeno, N., Mochizuki, M., Fukunaga, K., Asano, K., Betsuyaku, T., and Koyasu, S. (2016). Interferon and IL-27 antagonize the function of group 2 innate lymphoid cells and type 2 innate immune responses. *Nat. Immunol.* 17, 76–86.
53. Mueller, S.N., and Germain, R.N. (2009). Stromal cell contributions to the homeostasis and functionality of the immune system. *Nat Rev Immunol* 9, 618–629.
54. Neill, D.R., and McKenzie, A.N.J. (2011). Nuocytes and beyond: new insights into helminth expulsion. *Trends Parasitol.* 27, 214–221.

55. Neill, D.R., Wong, S.H., Bellosi, A., Flynn, R.J., Daly, M., Langford, T.K.A., Bucks, C., Kane, C.M., Fallon, P.G., Pannell, R., et al. (2010). Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature* 464, 1367–1370.
56. Newland, S.A., Mohanta, S., Clément, M., Taleb, S., Walker, J.A., Nus, M., Sage, A.P., Yin, C., Hu, D., Kitt, L.L., et al. (2017). Type-2 innate lymphoid cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nat. Commun.* 8, 15781.
57. Nguyen, T.T.T., and Baumgarth, N. (2016). Innate B Cells Tell ILC How It's Done. *Immunity* 45, 8–10.
58. Noval Rivas, M., Burton, O.T., Oettgen, H.C., and Chatila, T. (2016). IL-4 production by group 2 innate lymphoid cells promotes food allergy by blocking regulatory T-cell function. *J. Allergy Clin. Immunol.* 138, 801-811.e9.
59. Ohne, Y., Silver, J.S., Thompson-Snipes, L., Collet, M.A., Blanck, J.P., Cantarel, B.L., Copenhaver, A.M., Humbles, A.A., and Liu, Y.-J. (2016). IL-1 is a critical regulator of group 2 innate lymphoid cell function and plasticity. *Nat. Immunol.* 17, 646–655.
60. Oliphant, C.J., Hwang, Y.Y., Walker, J.A., Salimi, M., Wong, S.H., Brewer, J.M., Englezakis, A., Barlow, J.L., Hams, E., Scanlon, S.T., et al. (2014). MHCII-Mediated Dialog between Group 2 Innate Lymphoid Cells and CD4+ T Cells Potentiates Type 2 Immunity and Promotes Parasitic Helminth Expulsion. *Immunity* 41, 283–295.
61. Pichery, M., Mirey, E., Mercier, P., Lefrancais, E., Dujardin, A., Ortega, N., and Girard, J.-P. (2012). Endogenous IL-33 Is Highly Expressed in Mouse Epithelial Barrier Tissues, Lymphoid Organs, Brain, Embryos, and Inflamed Tissues: In Situ Analysis Using a Novel Il-33–LacZ Gene Trap Reporter Strain. *J. Immunol.* 188, 3488.
62. Possot, C., Schmutz, S., Chea, S., Boucontet, L., Louise, A., Cumano, A., and Golub, R. (2011). Notch signaling is necessary for adult, but not fetal, development of RORgammat(+) innate lymphoid cells. *Nat Immunol* 12, 949–958.
63. Pulendran, B., and Artis, D. (2012). New Paradigms in Type 2 Immunity. *Science* 337, 431–435.

64. Sanos, S.L., Vonarbourg, C., Mortha, A., and Diefenbach, A. (2011). Control of epithelial cell function by interleukin-22-producing ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> innate lymphoid cells. *Immunology* 132, 453–465.
65. 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 $\gamma$ mat<sup>+</sup> innate lymphoid cells. *Science* 330, 665–669.
66. Scholzen, T., and Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J. Cell. Physiol.* 182, 311–322.
67. Seehus, C.R., Kadavallore, A., Torre, B. de la, Yeckes, A.R., Wang, Y., Tang, J., and Kaye, J. (2017). Alternative activation generates IL-10 producing type 2 innate lymphoid cells. *Nat. Commun.* 8, 1900.
68. Sonnenberg, G., and Artis, D. (2012). Innate Lymphoid Cell Interactions with Microbiota: Implications for Intestinal Health and Disease. *Immunity* 37, 601–610.
69. 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 [mdash] a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol* 13, 145–149.
70. Spits, H., Bernink, J.H., and Lanier, L. (2016). NK cells and type 1 innate lymphoid cells: partners in host defense. *Nat. Immunol.* 17, 758–764.
71. Stier, M.T., Zhang, J., Goleniewska, K., Cephus, J.Y., Rusznak, M., Wu, L., Kaer, L.V., Zhou, B., Newcomb, D.C., and Peebles, R.S. (2018). IL-33 promotes the egress of group 2 innate lymphoid cells from the bone marrow. *J. Exp. Med.* 215, 263–281.
72. Sugita, K., Steer, C.A., Martinez-Gonzalez, I., Altunbulakli, C., Morita, H., Castro-Giner, F., Kubo, T., Wawrzyniak, P., Rückert, B., Sudo, K., et al. (2018). Type 2 innate lymphoid cells disrupt bronchial epithelial barrier integrity by targeting tight junctions through IL-13 in asthmatic patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* 141, 300–310.e11.
73. Tindemans, I., Serafini, N., Di Santo, J.P., and Hendriks, R.W. (2014). GATA-3 function in innate and adaptive immunity. *Immunity* 41, 191–206.

74. Vivier, E., Raulet, D.H., Moretta, A., Caligiuri, M.A., Zitvogel, L., Lanier, L.L., Yokoyama, W.M., and Ugolini, S. (2011). Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 331, 44–49.
75. Vonarbourg, C., and Diefenbach, A. (2012). Multifaceted roles of interleukin-7 signaling for the development and function of innate lymphoid cells. *Semin. Immunol.* 24, 165–174.
76. Walker, J.A., and McKenzie, A.N. (2013). Development and function of group 2 innate lymphoid cells. *Curr. Opin. Immunol.* 25, 148–155.
77. Wang, S., Xia, P., Chen, Y., Qu, Y., Xiong, Z., Ye, B., Du, Y., Tian, Y., Yin, Z., Xu, Z., et al. (2017). Regulatory Innate Lymphoid Cells Control Innate Intestinal Inflammation. *Cell* 171, 201-216.e18.
78. Wei, M., Shinkura, R., Doi, Y., Maruya, M., Fagarasan, S., and Honjo, T. (2011). Mice carrying a knock-in mutation of *Aicda* resulting in a defect in somatic hypermutation have impaired gut homeostasis and compromised mucosal defense. *Nat. Immunol.* 12, 264–270.
79. Weizman, O.-E., Adams, N.M., Schuster, I.S., Krishna, C., Pritykin, Y., Lau, C., Degli-Esposti, M.A., Leslie, C.S., Sun, J.C., and O’Sullivan, T.E. (2017). ILC1 Confer Early Host Protection at Initial Sites of Viral Infection. *Cell* 171, 795-808.e12.
80. Yoshida, H., Honda, K., Shinkura, R., Adachi, S., Nishikawa, S., Maki, K., Ikuta, K., and Nishikawa, S.I. (1999). IL-7 receptor  $\alpha^+$  CD3 $^-$  cells in the embryonic intestine induces the organizing center of Peyer’s patches. *Int Immunol* 11, 643–655.
81. Yu, X., Wang, Y., Deng, M., Li, Y., Ruhn, K.A., Zhang, C.C., and Hooper, L.V. (2014). The basic leucine zipper transcription factor NFIL3 directs the development of a common innate lymphoid cell precursor. *ELife* 3.

**Étude du rôle des lymphocytes T dans l'homéostasie des cellules lymphoïdes innées de  
type 2 des ganglions mésentériques chez la souris**

**TEJERINA Emmanuel**

**RÉSUMÉ**

Plusieurs rapports de la littérature ont relaté que la composition, la fréquence et l'activité des ILC sont fortement impactées dans le contexte d'un déficit du système immunitaire adaptatif chez la souris. Cependant les mécanismes par lesquels l'immunité adaptative régule l'homéostasie des ILC restent en grande partie inconnus. L'objectif de ce mémoire a été d'évaluer l'implication des lymphocytes T dans la régulation des ILC2 dans les ganglions mésentériques.

Au cours de ce projet, j'ai pu mettre en évidence un rôle encore peu étudié des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dans la régulation de la fréquence et de l'activité des ILC de type 2 dans les ganglions mésentériques. Ce dernier est indépendant de l'activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> par les antigènes du microbiote et repose en partie sur la régulation indirecte de l'expression de l'alarmine IL-33. En effet, j'ai montré que l'expression du gène codant l'IL-33 est augmentée dans les ganglions mésentériques en absence de lymphocytes T et que la neutralisation de l'IL-33 à court terme a pour effet de réduire significativement la fréquence des ILC2 et leur production de cytokines dans les ganglions mésentériques de souris dépourvues de lymphocytes T. Une collaboration avec le laboratoire de Lucie Peduto à l'Institut Pasteur a permis de montrer que les lymphocytes T pourraient indirectement réguler l'expression de l'IL-33 au sein du compartiment stromal des ganglions mésentériques.

**MOTS-CLÉS :** Innate Lymphoid Cells, Lymphocytes T, Ganglions mésentériques, Dialogue immunité innée-immunité adaptative