



HAL
open science

Étude de la régulation des cellules lymphoïdes innées par les lymphocytes T chez la souris

Priscillia Bresler

► **To cite this version:**

Priscillia Bresler. Étude de la régulation des cellules lymphoïdes innées par les lymphocytes T chez la souris. Immunologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2018. Français. NNT: 2018USPCB078 . tel-02511343

HAL Id: tel-02511343

<https://theses.hal.science/tel-02511343>

Submitted on 18 Mar 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.



UNIVERSITE PARIS V – RENE DESCARTES

FACULTE DE MEDECINE PARIS DESCARTES – SITE NECKER

Laboratoire INSERM U1151 Equipe 13

THESE

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Paris V

Spécialité : **IMMUNOLOGIE**

Présentée et soutenue publiquement par :

Priscillia BRESLER

Le 5 octobre 2018 à 14h

**Etude de la régulation des cellules lymphoïdes innées
par les lymphocytes T chez la souris**

Directeur de thèse : **Dr. Marie CHERRIER**

Membres du jury :

Docteur Marie

Rapporteur

Docteur Chamaillard

Rapporteur

Docteur Hue

Examineur

Docteur Golub

Examineur

Remerciements

Un grand merci aux membres de l'Equipe 13 :

J'exprime toute ma reconnaissance à ma directrice de thèse Marie Cherrier pour son encadrement technique et scientifique lors de ces trois années de thèse.

Merci Emmanuel pour ton expertise, ton support technique pendant ces trois années et ton humour ! Je te souhaite bonne continuation dans ton parcours professionnel.

Je tiens à remercier Sophie Ezine pour ses nombreuses qualités humaines et de m'avoir apporté des conseils très constructifs que ce soit dans mon travail de thèse ou dans ma vie personnelle.

Merci Chantal pour ta bienveillance, ton soutien, ton écoute et tes conseils, ils m'ont permis d'avancer et d'être positive. Merci d'avoir pris soin de moi pendant ces trois années.

Je te remercie Victoria pour ta joie de vivre ton calme et ta sérénité ! C'est un plaisir de discuter et de rigoler avec toi ! Tu as effectué un travail de qualité lors de ton doctorat et tu es un excellent exemple de réussite professionnelle. Ton expérience de « doyenne » des doctorantes et tes conseils m'ont beaucoup servi lors de ma thèse.

Un grand merci à toi Hélène, j'ai partagé et appris beaucoup de choses à tes côtés (surtout sur les cailloux !). J'apprécie beaucoup ton esprit d'équipe et tu es une doctorante brillante. Merci pour ces petits moments de complicité passés le soir au laboratoire, ce sont de très bons souvenirs que je n'oublierai pas.

Merci Agnès, tu m'as enseigné beaucoup de choses que ce soit sur la vie de laboratoire ou sur des aspects techniques (même les plus basiques). Tu as d'excellentes qualités professionnelles et tu es un vrai exemple pour moi. D'autre part, on peut te parler de tout et de rien et tu es toujours calme, bienveillante et à l'écoute. Ce sont des qualités très appréciables que je n'oublierai pas.

Merci Flora pour tes conseils scientifiques toujours constructifs lors des réunions de laboratoire et de m'avoir si bien coaché pour le concours des contrats doctoraux.

Merci Rima pour tes conseils et nos discussions toujours sympathiques.

Merci Véronique pour ton aide technique de qualité et ta bonne humeur.

Merci Evelyne d'avoir été me chercher si régulièrement de la glace pendant mes manips et toujours avec le sourire !

Merci Benoît pour l'énorme quantité de boîtes de cônes « 1 sur 2 » que tu m'a si gentiment préparé.

Merci aux membres des plateformes de tri et au LEAT de Broussais et d'Imagine

Un merci spécial à toi Virginie car en plus de tes nombreuses qualités professionnelles à l'animalerie tu es une personne formidable avec qui j'ai partagé des moments inoubliables à tes côtés en zone ! Merci !

Un grand merci également à toi Nadia pour ton professionnalisme ta joie de vivre et tes conseils sur mon avenir professionnel. Merci à l'ensemble des animaliers qui se sont occupés de nos animaux en zone.

Un mot particulier à ma famille :

Je remercie en premier lieu ma Mère et ma Sœur. Merci de votre présence, de votre réconfort, de m'avoir remis sur les rails de m'avoir soutenu jusqu'au bout, de m'avoir permis d'être plus positive, forte et d'avoir fait en sorte que je ne laisse pas les difficultés m'envahir mais plutôt d'utiliser les épreuves comme carburant pour m'affirmer et avancer tout en restant humble et garder les pieds sur terre. Merci d'être mon exemple et ma source de motivation.

Merci à toi Frère pour ta curiosité sur mon travail de thèse et ta bienveillance. Merci beau fwè pour ton soutien et ta bonne humeur que l'on ne peut égaler. Merci pour ces moments partagés en famille dont on a besoin pendant la thèse pour s'aérer la tête. Ces moments réchauffent le cœur !

Merci Mairaine de m'avoir soutenu pendant ces trois années de thèse, d'avoir fait en sorte que j'ai confiance en moi et que je reste toujours positive. Merci pour ton écoute et ta présence continue dans ma vie.

Merci Fwèw J de m'avoir aéré la tête quand j'en avais besoin et de m'avoir toujours encouragé dans mes choix et mon parcours.

Merci mon Mathieu pour ta présence depuis de nombreuses années. Tes encouragements et ton soutien m'ont beaucoup apporté.

« Sa ki taw la riviè pa ka chayé'y »

À Rosalie Sainte-Rose

Table des matières

REMERCIEMENTS	1
TABLE DES MATIERES	4
ABBRÉVIATIONS	9
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	11
RESUME	13
<i>SUMMARY</i>	14
INTRODUCTION	15
I. LES CELLULES LYMPHOÏDES INNEES	16
a. Définition et historique	16
b. La famille des cellules lymphoïdes innées	21
i. Les ILC de type I	21
1. Définition	21
2. Différenciation	21
3. Sous-populations d'ILC1	23
a. Les NK conventionnelles (cNK)	23
b. Les NK thymiques	24
c. Les ILC non-NK	24
ii. Les ILC de type II	26
1. Caractérisation des ILC2	26
2. Diversité des ILC2	29
iii. Les ILC de type III	31
1. Les cellules inductrices des tissus lymphoïdes (LTI)	32
a. Caractérisation	32
b. Fonction des LTI avant la naissance	34
c. Fonction des LTI après la naissance.....	35
i. Développement des ILFs.....	35
ii. Confinement des bactéries commensales.....	35
iii. Sélection du répertoire T en périphérie	36
2. Les ILC3 NKp46 ⁺ participent à l'homéostasie intestinale	38
a. Origine	38
b. Fonction.....	38
c. Inflammation	40
iv. Les ILC régulatrices	42
c. Les besoins développementaux des ILC.....	44
i. Etape 1 : La quête du Précurseurs Commun aux ILC (CILCP)	45
ii. Etape 2 : La diversification des précurseurs des ILC	48

1.	La différenciation des ILC1	48
a.	NFLI3 et TOX	48
b.	T-bet et Eomes	48
2.	La différenciation des ILC2	48
a.	GATA-3 et ROR α	49
3.	La différenciation des ILC3	50
d.	La plasticité des ILC	51
i.	La plasticité des ILC2	51
ii.	La plasticité des ILC3	54
e.	La famille des ILC humaines	55
i.	Phénotype	55
1.	Les ILC1	56
2.	Les ILC3	56
3.	Les ILC2	57
ii.	Localisation et fonction des ILC Humaines	58
II.	DE L'HOMÉOSTASIE A LA PATHOLOGIE	60
a.	Homéostasie des ILC	60
i.	Le rôle de l'IL-7 dans le contrôle de la prolifération des lymphocytes T	60
ii.	L'IL-15 compense l'absence d'IL-7 pour la survie des ILC en périphérie	61
b.	Sédentarité ou migration pour les ILC ?	61
i.	Le rôle des récepteurs de chimiokines CCR7 et CCR9 dans la migration des ILC entre les ganglions mésentériques et l'intestin	62
ii.	Le cas particulier des ILC2	63
iii.	La controverse concernant le statut migratoire	63
c.	L'homéostasie tissulaire et muqueuse médiée par les ILC	64
i.	L'épithélium intestinal	64
ii.	L'épithélium respiratoire	67
1.	ILC2 et épithélium respiratoire	67
2.	Les ILC3 sécrétrices d'IL-22 participent à la protection de l'épithélium respiratoire	67
iii.	Le thymus	68
iv.	Le tissu adipeux	69
d.	ILC et microbiote	70
i.	Le rôle du microbiote dans le développement de l'immunité muqueuse	70
1.	Définition du microbiote intestinal	70
2.	Le microbiote active le système immunitaire intestinal	71
3.	Le rôle du microbiote dans le développement du système immunitaire intestinal	72
ii.	Impacte du microbiote sur le développement et la fonction des ILC	73
1.	Développement	74
2.	Fonction	74
e.	Les ILC jouent un rôle dans la réponse aux pathogènes	75
i.	Réponse anti-virale	75
ii.	Réponse anti-bactérienne	76
1.	Le rôle des ILC1 dans la protection contre Clostridium difficile et Salmonella thyphimurium	76
2.	La réponse anti-bactérienne des ILC3, le rôle de l'IL-22 et de l'IL-17	77
iii.	Réponse anti-parasitaire	78
1.	Les ILC2 luttent contre le pathogène Nippostrongylus brasiliensis	78

2.	Les ILC1 dans l'infection par le parasite <i>Toxoplasma gondii</i>	79
iv.	Le rôle des ILC dans la réponse anti-fongique	79
f.	Le côté sombre des ILC	80
i.	Rôle des ILC dans les pathologies inflammatoires	80
1.	Modèles de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin chez la souris	80
2.	Les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin chez l'homme	80
3.	Les pathologies affectant la peau : psoriasis.....	81
4.	Asthme et allergies	82
a.	Maladies allergiques associées aux infections virales	82
b.	L'asthme induit par les champignons allergéniques	83
c.	Le rôle des ILC3 dans l'asthme associé à l'obésité	83
d.	Les ILC2 et l'asthme chez l'homme	84
ii.	Les ILC dans l'auto-immunité.....	84
1.	Le diabète.....	84
2.	La sclérose en plaques	85
g.	ILC et cancer	87
1.	L'activité anti-tumorale des ILC	87
2.	Les ILC favorisent le développement et la croissance tumorale.....	88
III.	COLLABORATION SYSTEME IMMUNITAIRE ADAPTATIF (SIA) / ILC	90
a.	Complémentarité et redondance des ILC	90
b.	Le développement des organes lymphoïdes secondaires et tertiaires	91
i.	Les tissus lymphoïdes secondaires associés à l'intestin (GALT)	91
1.	Fonction et développement des ganglions lymphatiques tels que les mLN	94
a.	Etape 1 : Recrutement et différenciation des LTI.....	95
b.	Etape 2 : Interactions LT ₀ – LTI	96
c.	Etape 3 : Colonisation de l'ébauche ganglionnaire par les lymphocytes T et B	96
2.	Définition et fonction des plaques de Peyer (PP)	97
a.	La commutation de classe isotypique des IgM vers les IgA	97
b.	Différenciation, sortie et migration des IgA ⁺ vers la muqueuse intestinale	98
3.	Développement des plaques de Peyer (PP)	99
4.	Définition et fonction des ILF	101
i.	Génération des IgA de manière indépendante des lymphocytes T.....	101
5.	Le développement des CP et des ILF nommés tissus lymphoïdes solitaires intestinaux (SILT)	104
a.	Le rôle des LTI.....	104
b.	Le rôle des Lymphocytes B	104
c.	Le rôle du microbiote intestinal	105
6.	Le développement des organes lymphoïdes tertiaires	106
a.	Rôle des ILC dans la mise en place de la réponse immunitaire adaptative	107
i.	Les ILC3 jouent un rôle dans la sélection du répertoire T via le CMHII	107
ii.	Les ILC3 sécrétrices de Csf2 jouent un rôle dans la différenciation des Tregs.....	108
iii.	Les ILC2 favorisent la différenciation et le recrutement des T _H 2.....	108
iv.	La collaboration ILC2/T _H 2 promeut l'immunité anti-parasitaire de type 2.....	108
b.	Régulation des ILC par le système immunitaire adaptatif	111
i.	La régulation des ILC3 par le système immunitaire adaptatif (SIA)	111
ii.	Les iTregs régulent négativement la fonction des ILC2 dans le cadre de l'asthme induite	112
IV.	PROBLEMATIQUE	113

V.	RESULTATS	116
a.	Article en préparation	117
b.	Introduction	117
c.	Hypothèses de travail	118
i.	1 ^{ère} hypothèse	118
ii.	2 ^{ème} hypothèse.....	119
d.	Stratégies expérimentales.....	120
i.	1 ^{ère} hypothèse.....	120
ii.	2 ^{ème} hypothèse.....	122
VI.	DISCUSSION.....	156
a.	La déficience en lymphocytes T induit une altération de la composition et de la fonction des ILC en fonction de leur localisation tissulaire.....	157
i.	Résultats et conclusions.....	157
ii.	Discussion	158
b.	Le microbiote intestinal régule l'homéostasie des ILC3 dans les mLN et dans la lamina propria de l'intestin en absence de lymphocytes T	159
i.	Résultats et conclusions.....	159
ii.	Discussion	159
c.	L'activation des lymphocytes T dépendante du microbiote intestinal n'est pas nécessaire à la régulation de l'homéostasie des ILC2 dans les ganglions mésentériques (mLN)	160
i.	Résultats et conclusions.....	160
ii.	Discussion	162
d.	La régulation de l'expression de l'IL-33 par les lymphocytes T conditionne l'homéostasie des ILC2 dans les mLN	163
i.	Résultats et conclusions.....	163
ii.	Discussion	164
VII.	RESULTATS COMPLEMENTAIRES ET PERSPECTIVES	165
a.	Etude de l'impact des lymphocytes T sur la migration des ILC.....	165
b.	Analyse du rôle du compartiment stromal dans la régulation indirecte de l'homéostasie des ILC par les lymphocytes T	166
c.	Evaluation du rôle du microbiote intestinal dans la régulation de l'homéostasie des ILC	167
i.	Perspective sur le rôle des lymphocytes T dans la diversification du microbiote intestinal et la régulation de l'homéostasie des ILC3.....	167
ii.	Perspectives sur le rôle des cellules dendritiques (DC) dans la régulation des ILC3 NKp46 ⁺	168
d.	Etude du rôle des lymphocytes B dans la régulation de l'homéostasie des ILC	170
e.	Etude du rôle des Tregs dans la régulation de l'homéostasie des ILC2	171
f.	La régulation de l'homéostasie des ILC2 des mLN par les lymphocytes T	172
i.	Perspectives sur le rôle des lymphocytes T dans la régulation de la sécrétion d'IL-2 par les ILC.....	172

ii. Perspective sur le rôle des Interactions lymphocytes T- cellules stromales dans la régulation de l'homéostasie des ILC2 localisées dans les mLN	174
VIII. CONCLUSION GENERALE	176
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	180

Abbréviations

ADCC Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity	GM-CSF Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
Ahr Aryl hydrocarbon receptor	GvHD Graft versus Host Disease
AID Activation-induced cytidine deaminase	HMS hypermutation somatique
Areg Amphirégulin	HSC Hematopoietic Stem Cells
BALT Bronchus Associated lymphoid Tissues	HSCT Hematopoietic Stem cell Transplantation
CHILP Common helper ILC progenitor	IBD Inflammatory bowel disease
CI Commutation isotypique	ICAM InterCellular Adhesion Molecule
CILCP Common ILC precursors	ICOS Inducible T-cell costimulator
CLP Common lymphoid progenitor	Id2 Inhibitor Of DNA Binding 2
CMHII Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II	IFN γ Interferon gamma
CMP Common Myeloid Progenitor	Ig Immunoglobuline, 31
CP Cryptoplaques	IL Interleukin
CRTH2 Prostaglandin D2 receptor	ILC2 ILC de type 2
CTEC Cortical Thymic epithelial cells	ILC3 ILC de type 3
DC Dendritic cells	ILC3 DN ILC3 Doubles négatives
DSS Dextran Sodium Sulfate	ILCP ILC Precursor
DTR Diphtheria Toxin Receptor	ILF Isolated Lymphoid Tissue
EAE Autoimmune Encephomyelitis	iNKT invariant Natural Killer T cells
FALC Fat associated lymphoid clusters	Lin Lineage
FDC Follicular dendritic cells	LIP lymphopenia induced proliferation
Fm Fate mapping	LTi Lymphoid tissue inducer cells
FOXP3 Forkhead box P3	LTin cellules initiatrices de tissus lymphoïdes
GALT Gut Associated Lymphoid Tissues	LTo Lymphoid Tissue Organizers
GATA3 GATA-Binding protein 3	LT β lymphotoxine beta

MAdCAM mucosal vascular addressin cell
adhesion molecule
MALT Mucosal Associated lymphoid
Tissues
MDSC Myeloid Derived Suppressor Cells
mLN mesenteric Lymph Nodes
MMP Matrix Metallo Proteases
mTEC Medular Thymic epithelial cells
NALT Nasal Associated lymphoid Tissues
NB Nippostrongillus Brasiliensis
NCR Natural cytotoxic receptor
Nfil3 Nuclear Factor, Interleukin 3
Regulated
NK Natural Killer
NKP NK precursor
NOD Nucleotide oligomerization domain
receptors
pLN peripheral Lymph Nodes
PLZF Promyelocytic Leukaemia Zinc Finger
PP Plaques de Peyer
RALDH2 Rétinaldehyde déshydrogenase-2
RET Neuroregulatory Receptor
ROR α RAR Related Orphan Receptor A

ROR γ t RAR-related orphan receptor
gamma t
SCID Severe Combined Immunodeficiency
SFB Segmented Filamentous Bacteria
SILT Solitary intestinal lymphoid tissues
T-bet T-box transcription factor
TCF-1 T Cell Specific Transcription Factor 1
Tfh T follicular Helper
TGF β Transforming growth factor beta
TLO Tertiary lymphoid organs
TLR Toll Like Receptors
TNF Tumor necrosis factor
Tox Thymocyte selection-associated HMG
bOX protein
TRAIL Tumor-necrosis-factor Related
Apoptosis Inducing Ligand
Treg Lymphocytes T régulateurs
TSLP Thymic stromal lymphopoietin
UCP1 UnCoupling Protein 1
VCAM Vascular cell adhesion protein
VEGF-C vascular endothelial growth factor
 α -LP a4b7-lymphoid precursor

Table des illustrations

Figure 1 : Les différents sous-types de cellules lymphoïdes innées (ILC).....	17
Figure 2: Origine des ILC.....	20
Figure 3 : Caractérisation des ILC1.....	22
Figure 4 adaptée à partir de (Geiger and Sun, 2016) : Développement et différenciation des cNK.....	23
Figure 5 adaptée à partir de (Jiao et al., 2016) : Les différents sous-types d'ILC1.....	26
Figure 6 adaptée à partir de (Jennifer A Walker and Andrew NJ McKenzie, 2013) : Fonction des ILC2.....	29
Figure 7 adaptée à partir de (Klose and Artis, 2016) : Vue globale de la fonction et des marqueurs de surface exprimés par les ILC2 matures.....	30
Figure 8 Priscillia Bresler, 2014 : Marquages de coupes de ganglions mésentériques (Haut) et périphériques (bas) de souris ROR γ t-GFP ⁺ (G.Eberl, 2004) par immuno-fluorescence.....	33
Figure 9 Marie Cherrier 2014 : Marquages de coupes d'intestin grêle de souris CD57BL/6J par immuno-fluorescence (gauche ILF, droite villosités de l'intestin).....	34
Figure 10 adaptée à partir de Eberl, 2005 et van de Pavert and Mebius, 2010).....	37
Figure 11 adaptée à partir de (Klose and Artis, 2016) : Les ILC3 participent au maintien de l'équilibre de la muqueuse intestinale.....	40
Figure 12: Les différents sous-types d'ILC3.....	42
Figure 13 adaptée à partir de Klose et Artis 2016.....	43
Figure 14 adaptée à partir de (Serafini et al., 2015) : Développement des cellules lymphoïdes innées chez la souris.....	46
Figure 15 adaptée à partir de (Ishizuka et al., 2016) : Expression des différents facteurs de transcription impliqués dans le développement des ILC.....	47
Figure 16 adaptée à partir de (Serafini et al., 2015) : Deuxième étape du développement des ILC.....	51
Figure 17 : La plasticité des ILC2.....	53
Figure 18 : La plasticité des ILC3.....	55
Figure 19 adaptée à partir de (Eken and Donmez-Altuntas, 2017) : Les ILC humaines.....	58
Figure 20 adaptée à partir de (Teshima et al., 2016) : Schéma explicatif de la maladie du greffon contre l'hôte.....	66
Figure 21 adaptée à partir de (Brestoff et al., 2015; Flach and Diefenbach, 2015).....	70
Figure 22 (Bermon et al., 2015): Interaction entre le microbiote intestinal et le système immunitaire.....	72
Figure 23 (Forkel and Mjösberg, 2016): ILC et inflammation intestinale.....	81
Figure 24 (Brown and Russi, 2017) : La sclérose en plaques, contribution et fonction des ILC.....	86
Figure 25 (Carrega et al., 2016) : Le Yin et le Yang des ILC dans le cancer.....	90
Figure 26 (Randall and Mebius, 2014): Les différents types d'organes lymphoïdes associés aux muqueuses. ...	93
Figure 27 (Eberl, 2005): Vue d'ensemble des organes lymphoïdes secondaires associés à la lamina propria de l'intestin, chez la souris.....	94

Figure 28 (Fagarasan et al., 2010) :	98
Figure 29 (van de Pavert and Vivier, 2016) : Les étapes de développement des organes lymphoïdes secondaires chez la souris.	100
Figure 30 adaptée à partir de (Fagarasan et al., 2010):	103
Figure 31 adaptée à partir de (Fagarasan et al., 2010) :	106
Figure 32 Dialogue ILC/lymphocytes T	110
Figure 33 : Stratégie d'analyse des sous-types d'ILC par cytométrie en flux (ganglions mésentériques):.....	121
Tableau 1: Récapitulatif des marqueurs utilisés pour l'identification des sous-types d'ILC murines par cytométrie en flux.	121
Figure 34 : Stratégie expérimentale du travail de recherche.....	124
Figure 35 : Description de l'altération de la composition des ILC dans un hôte déficient en lymphocytes T (CD3 ϵ ^{-/-}):.....	158
Figure 36 : La déficience en lymphocytes T n'impacte pas l'expression des récepteurs CCR7 et CCR9 par les ILC résidentes des ganglions mésentériques et de la <i>lamina propria</i> de l'intestin.	166
Figure 37 : Stratégie expérimentale des perspectives de recherches axées sur le rôle du microbiote intestinal dans la régulation de l'homéostasie des ILC :.....	169
Figure 38 : coopération B-T pourrait participer à la régulation de l'homéostasie des ILC2 résidentes des ganglions mésentériques.	171
Figure 39 : Etude de l'activité suppressive des iTregs sur les ILC2 <i>in vitro</i>	172
Figure 40 : La déficience en lymphocytes T conduit à une augmentation de la sécrétion d'IL-2 par les ILC résidentes des ganglions mésentériques.	174
Figure 41 : Conclusion générale et perspectives.....	179
Tableau 1: Récapitulatif des différents marqueurs utilisés pour l'identification des sous-types d'ILC murines par cytométrie en flux.....	124

RESUME

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 ma thèse a été dans un premier temps d'évaluer l'implication des lymphocytes T dans cette régulation au sein de tissus lymphoïdes tels que les ganglions périphériques et mésentériques et dans l'intestin grêle. Dans un deuxième temps, j'ai entrepris d'identifier les mécanismes de régulation impliqués dans le dialogue entre ILC et lymphocytes T et de déterminer leur spécificité tissulaire.

Au cours de ma thèse j'ai pu confirmer que la régulation des ILC3 NKp46⁺ sécrétrices d'IL-22 de la *lamina propria* de l'intestin par les lymphocytes T CD4⁺ repose sur la capacité de ces derniers à participer au confinement des bactéries commensales. Par ailleurs, j'ai également mis en évidence un rôle encore peu étudié des lymphocytes T CD4⁺ 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⁺ 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. Il reste cependant à déterminer les mécanismes par lesquels les lymphocytes T régulent l'expression de l'IL-33 dans les cellules stromales des tissus lymphoïdes. Enfin, l'intervention d'autres facteurs environnementaux dépendants des lymphocytes T reste également à évaluer. Des expériences préliminaires indiquent que les lymphocytes B pourraient jouer un rôle non-redondant dans la régulation des ILC2 par les lymphocytes T dans un contexte de reconstitution du système immunitaire adaptatif.

SUMMARY

Many articles in the literature report that the composition, the frequency and the activity of ILCs are strongly affected when the adaptive immune system is deficient in mice. However, the mechanisms by which adaptive immunity regulates the homeostasis of ILCs remain largely unknown. The objective of my thesis was to address the role played by T cells in this regulation within lymphoid tissues such as peripheral and mesenteric lymph nodes and in the small intestine. I also characterised some of the regulatory mechanisms involved in this dialogue between ILCs and T cells and determined their tissue specificity.

During my thesis, I confirmed that the regulation of gut resident ILC3 by CD4⁺ T cells is based on their ability to participate in the containment and diversification of bacterial communities colonizing the gut. In addition, I have also highlighted the role of CD4⁺ T cells in the regulation of the frequency and activity of type 2 ILCs in the mesenteric lymph nodes. The latter does not rely on the activation of CD4⁺ T cells by the gut microbiota. Indeed, I showed that the expression of the gene encoding IL-33 is increased in the mesenteric lymph nodes of T cell deficient mice and that the short-term neutralization of IL-33 signalling in vivo significantly reduces the frequency of type 2 ILCs in the mLNs of these mice. In collaboration with Lucie Peduto's team, we showed that T lymphocytes indirectly regulate the expression of IL-33 by mesenteric lymph nodes stromal cells. However, the mechanisms underlying these interactions remain to be elucidated. Finally, the role of other T-cell dependent environmental factors remains to be characterised. Indeed, our preliminary results indicate that T-B cooperation may be instrumental in the regulation of mesenteric lymph nodes resident ILC2 while it is redundant in the regulation of gut resident type 3 ILCs by CD4⁺ T cells.

INTRODUCTION

I. LES CELLULES LYMPHOÏDES INNEES

a. Définition et historique

Le terme cellule lymphoïde innée (ILC) est utilisé pour décrire un ensemble de cellules du système immunitaire inné, ayant les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles de la lignée lymphoïde (Eberl et al., 2015). Trois caractéristiques définissent les ILC :

- Malgré leur aspect morphologique lymphocytaire, les ILC n'expriment pas les marqueurs de lignage associés aux cellules B et T, aux cellules myéloïdes ou encore aux érythrocytes. Elles sont par conséquent définies par l'absence de ces marqueurs de lignage (Lin^-).
- Bien qu'une fraction significative des ILC matures aie exprimé les recombinaisons RAG au cours de leur différenciation, les ILC n'expriment pas de récepteurs spécifiques aux antigènes, ce qui les distinguent des lymphocytes B et T.
- La différenciation des ILC nécessite l'expression de l'inhibiteur de la liaison à l'ADN Id2 (*Inhibitor Of DNA Binding 2*) (Boos et al., 2007; Yokota et al., 1999). En effet, l'expression d'Id2 marque l'engagement dans le lignage des ILC en inhibant l'engagement vers les lignages B et T. Ainsi, des études récentes ont permis d'identifier un progéniteur restreint des ILC de type « effectrices » : nommé *Common Helper ILC Progenitor* (CHILP) (Klose et al., 2014) défini par l'expression d'Id2 et présent dans la moelle osseuse et dans le foie foetal chez la souris.

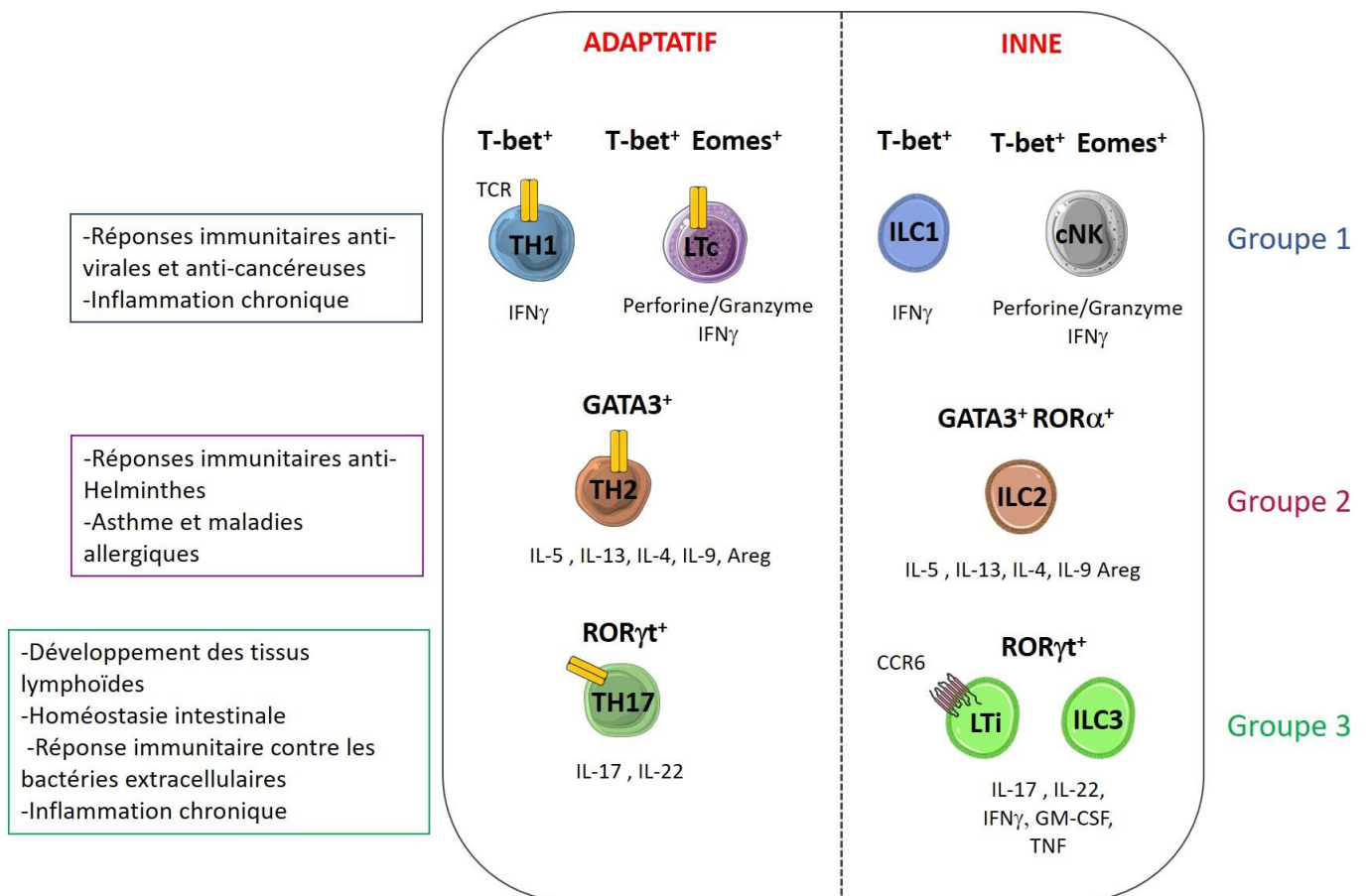


Figure 1 : Les différents sous-types de cellules lymphoïdes innées (ILC). Les ILC sont des lymphocytes appartenant au système immunitaire inné, se développant de manière indépendante de recombinaisons (RAG= Recombination Activating Gene) et n'exprimant aucun récepteur spécifique aux antigènes. Les ILC constituent 3 groupes ayant des caractéristiques fonctionnelles proches des lymphocytes T effecteurs. Les ILC de type 1 (bleu) comprenant les ILC1 non-NK EOMES⁻ et les NK conventionnelles (cNK) EOMES⁺. Par analogie aux lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ (LTc) les cNK EOMES⁺ T-bet⁺ possèdent une activité cytotoxique (sécrétion de perforine et granzyme) en plus de l'interféron gamma (IFN γ). Les ILC1 T-bet⁺ sécrètent de l'interféron gamma (IFN γ), sont indépendantes d'EOMES et participent à l'immunité anti-infectieuse et anticancéreuse comme leurs homologues T effecteurs (T_H1). Les ILC de type 2 (rose), sont dépendantes de GATA3 et ROR α , sécrètent des cytokines de type T_H2 (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 γ t, comme les lymphocytes T_H17 et sont constituées de deux groupes majeurs, les ILC3 CCR6⁺ sécrétrices d'IL-17 et d'IL-22 (composées des LTi) et CCR6⁻ (composées des ILC3 NKp46⁺ et NKp46⁻) sécrétrices d'IL-22, de GM-CSF, d'IFN γ et d'IL-17. Les ILC3 interviennent dans le développement des organes lymphoïdes secondaires et le maintien de l'homéostasie intestinale.

ILC: Innate Lymphoid cells; EOMES: Eomesodermin; GATA3: GATA-Binding protein 3; IFN: interferon; IL: Interleukin; Areg: Amphiregulin; NK: Natural Killer; ROR: Retinoic acid receptor –related orphan receptor; GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; TCR: T cell receptor; TH:T Helper. CCR: CC – chemokine receptor LTi: Lymphoid Tissue Inducer cells; NKp46: Natural cytotoxic receptor.

La nomenclature actuelle divise les ILC en trois groupes : Les ILC de type 1 (ILC1 et cNK), les ILC de type 2 (ILC2) et les ILC de type 3 (ILC3)(Spits et al., 2013). Sur la base d'analogies transcriptionnelles et fonctionnelles, les ILC1 sont apparentées aux lymphocytes T effecteurs T_H1 , les ILC2 aux T_H2 et les ILC3 aux T_H17 . De ce fait, on les considère comme des homologues innés de ces trois sous-populations de lymphocytes T effecteurs. En effet, les lymphocytes T_H1 et les ILC1 sont dépendants du facteur de transcription T-bet (*T-box transcription factor*) et sécrètent de l'IFN γ , du TNF- α (TNF= *Tumor necrosis factor*) ainsi que de l'IL-2 (Klose et al., 2014). Les lymphocytes T_H2 et les ILC2 sont sensibles à l'IL-4 et produisent de l'IL-4, de l'IL-5, de l'IL-13 et sont dépendent de GATA-3 pour leur développement (Hoyler et al., 2012; Neill et al., 2010). Enfin, les lymphocytes T_H17 et T_H22 ainsi que les ILC3 expriment le facteur de transcription ROR γ t⁺ (*RAR-related orphan receptor gamma t*) et sécrètent de l'IL-17 et de l'IL-22 (Melo-Gonzalez and Hepworth, 2017; Montaldo et al., 2015). En lien avec leur signature cytokinique et au même titre que les lymphocytes T effecteurs, les ILC vont pouvoir jouer un rôle dans l'immunité anticancéreuse et antivirale (ILC1/ T_H1), dans la réponse immunitaire antiparasitaire (ILC2/ T_H2) et dans l'immunité mucoale intestinale (ILC3/ T_H17). Les ILC résident en majorité dans les tissus non-lymphoïdes tels que les muqueuses intestinales, respiratoires et utérines ou encore dans le foie et dans la peau (Liu and Zhang, 2017; Sonnenberg et al., 2013). De part cette position stratégique, les ILC ont la capacité de répondre précocement aux changements de leur environnement, notamment au cours de la réponse immunitaire (Figure 1).

Les premières ILC ont été découvertes en 1975 par R. Kiessling et al (Kiessling et al., 1975). Nommées cellules tueuses naturelles (NK), ces cellules cytotoxiques sont impliquées dans la réponse immunitaire antivirale et anticancéreuse. Vers la fin des années 1990, R. Mebius et S. Nishikawa (Adachi et al., 1998; Mebius et al., 1997; Yoshida et al., 1999) ont ensuite rapporté une première description des cellules Inductrices de Tissus Lymphoïdes ou LTi, présentes dès le stade fœtal pour initier l'organogenèse des tissus lymphoïdes secondaires. Au cours des dix dernières années, des investigations menées en parallèle par plus d'une dizaine d'équipes disséminées de par le monde ont permis de mettre en évidence d'autres sous-populations d'ILC dites « effectrices » chez l'homme et chez la souris (Spits et al., 2013) (Figure 2). Ces travaux ont permis d'établir leur rôle dans l'homéostasie tissulaire, la

défense contre les pathogènes et leur implication dans les maladies inflammatoires de l'intestin (IBD), l'asthme ou encore l'obésité. En conséquence, les ILC font encore aujourd'hui l'objet de nombreuses investigations visant à établir si elles peuvent être envisagées comme de nouvelles cibles thérapeutiques (Klose and Artis, 2016).

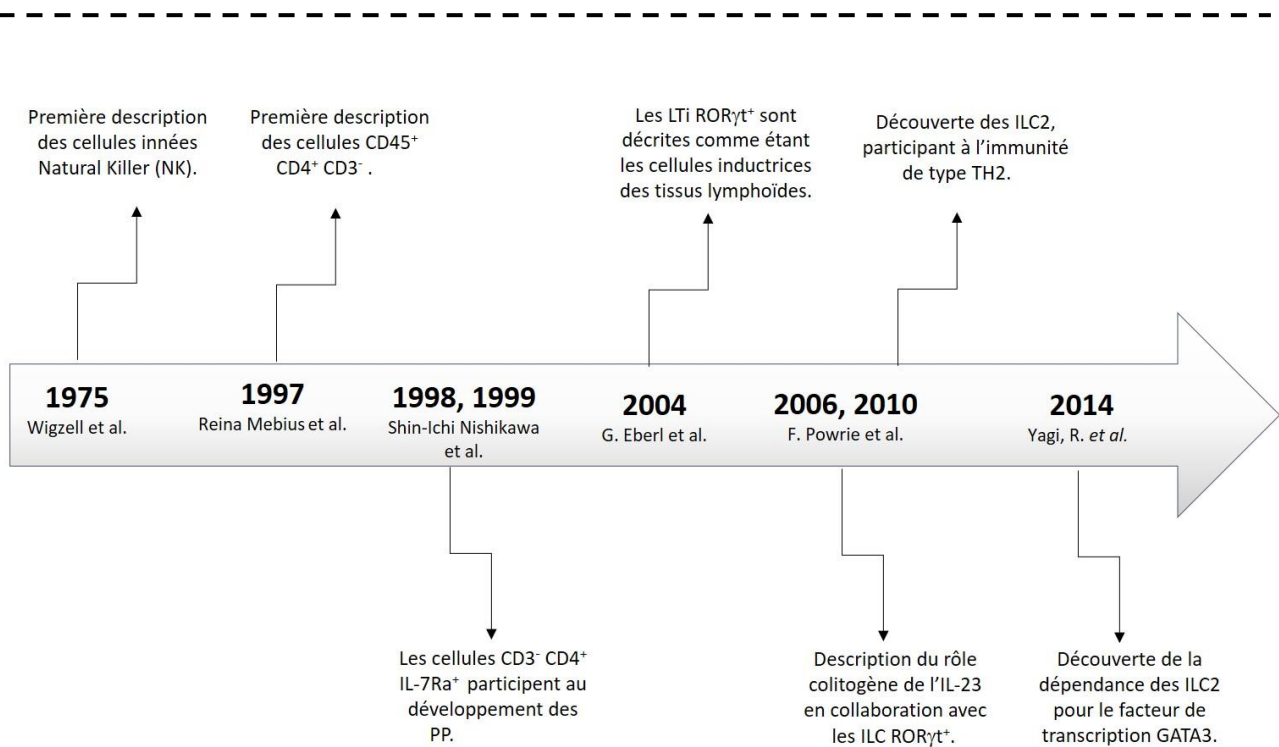
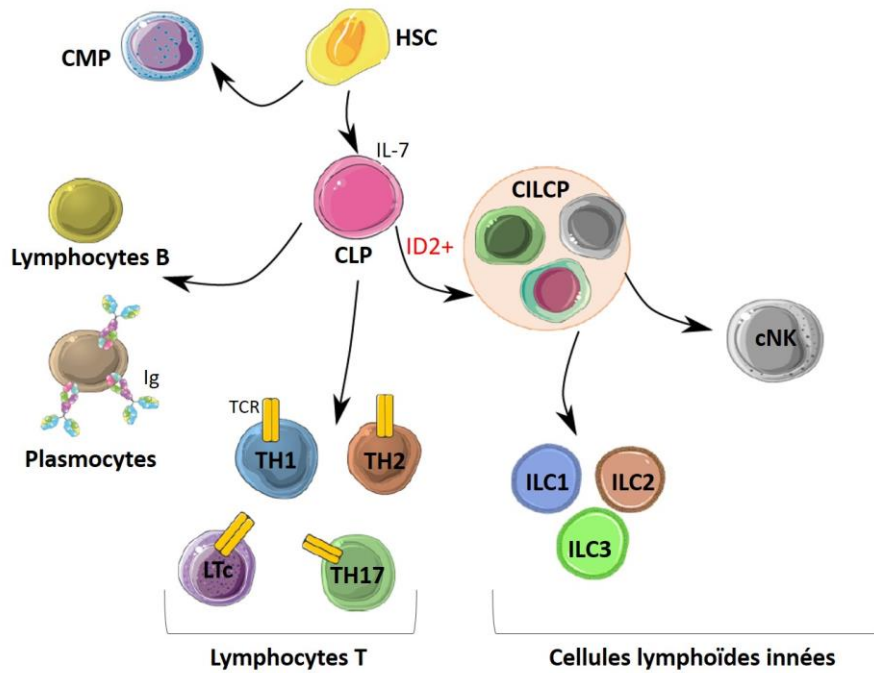


Figure 2: Origine des ILC. (Haut) Les ILC se développent à partir du progéniteur lymphoïde commun (CLP), au même titre que les lymphocytes T et B. Le développement des ILC à partir du CLP est dépendant du facteur de transcription Id2 et de l'IL-7. Les précurseurs communs des ILC (CILCP) ont été mis en évidence récemment. Ils donnent naissance d'une part aux ILC1, ILC2 et ILC3 et d'autre part aux cellules NK. (Bas) Historique de découverte des ILC. Les premières ILC (cNK) ont été décrites en 1975. Successivement, de nombreux travaux ont permis de mettre en évidence les différents groupes d'ILC ainsi que les sous-populations qui les constituent.

Id2: Inhibitor Of DNA Binding 2; CILCP: Common ILC precursors; HSC: Hematopoietic stem cell; CLP: Common lymphoid progenitors; CMP: Common myeloid progenitors; Ig: Immunoglobulin; PP: Peyer Patches.

b. La famille des cellules lymphoïdes innées

i. Les ILC de type I

1. Définition

Les ILC1 et les NK conventionnelles (cNK) constituent le groupe 1 des ILC (Figure 3). Ces deux types cellulaires ont des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles similaires. Elles sont sensibles aux interleukines 12 et 18 pour leur activation et expriment le récepteur naturel cytotoxique (NCR) NKp46 à leur surface. De part leurs fonctions et leurs caractéristiques phénotypiques proches, on apparente les cNK aux lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques et les ILC1 aux lymphocytes T CD4⁺ effecteurs T_H1. De façon similaire, les ILC1 et les cNK jouent principalement un rôle dans l'immunité anti-virale et anti-cancéreuse (Spits et al., 2016).

2. Différenciation

Initialement, les ILC1 dites « non-NK » ont été définies comme étant des cellules NK conventionnelles immatures n'exprimant ni le facteur de transcription EOMES (Eomesodermin) ni les molécules effectrices cytotoxiques (Gordon et al., 2012; Takeda et al., 2005) (Figure 3). En effet, de nombreux travaux axés sur le développement et les besoins transcriptionnels de ces cellules (Geiger and Sun, 2016) ont permis de mettre en évidence que les ILC1 et les cNK se différencient à partir de l' α -LP ($\alpha 4\beta 7$ -lymphoid precursor). Cependant il a été démontré que les voies de différenciation des cNK et des ILC1 « non-NK » divergent précocément avec la formation du NKP (précurseur des NK) d'une part et celle du CHILP d'autre part (*Common Helper ILC Progenitor*) (Klose et al., 2014; Serafini et al., 2015; Spits et al., 2016; Yu et al., 2014).

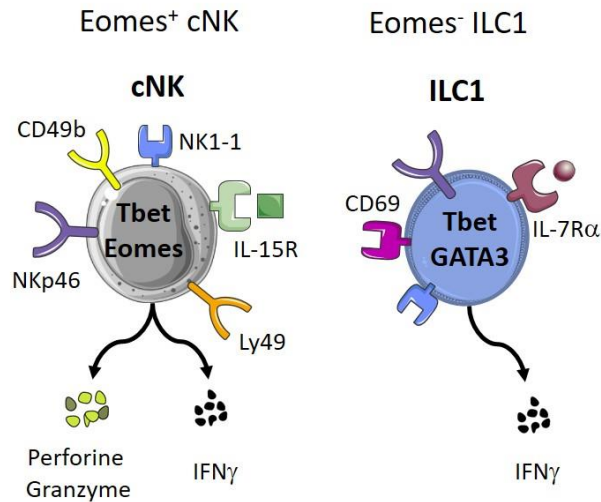


Figure 3 : Caractérisation des ILC1. Représentation des marqueurs de surface, des facteurs de transcription et des cytokines exprimées par les ILC1 EOMES⁺ (cNK) et EOMES⁻(ILC1 non-NK). Les NK conventionnelles (cNK) appartiennent aux ILC1. Elles sont sensibles à l'IL-15 et dépendent de T-bet et EOMES pour leur développement. Elles sont cytotoxiques (production de Perforine et de Granzymes), sécrètent de l'interféron gamma (IFN γ) et expriment l'intégrine CD49b (également nommée DX5). Les cNK expriment des récepteurs activateurs (NKp46) et inhibiteurs Ly49, l'intégration de l'ensemble de ces signaux activateurs et inhibiteurs aboutit soit à la cytolyse soit à la tolérance/ignorance. Les ILC1 « non-NK » se distinguent des cNK car elles sont non cytotoxiques, dépendent de l'IL-7, de T-bet et de GATA3 mais pas d'EOMES. En revanche, de manière similaire aux cNK, elles sécrètent de l'IFN γ et participent aux réponses immunitaires anti-infectieuses et anti-cancéreuses.

Ainsi, le NKP ($\text{Lin}^- \text{IL-15R}\alpha^+ \text{CD27}^-$) acquiert l'expression de différents marqueurs tels que Eomes, NKp46, NK1-1, DX5, Ly49, CD11b et perd celle de CD27 (Geiger and Sun, 2016) au court de sa maturation en cellules NK. En revanche, les ILC1 EOMES⁻ se développent à partir du CHILP : $\text{Lin}^- \text{IL-7R}\alpha^+ \alpha 4\beta 7^+ \text{Id}2^+$ et de l'« ILC Precursor » ILCP : $\text{Lin}^- \text{IL7R}\alpha^+ \text{PLZF}^+$ (Klose et al., 2014) et dépendent du facteur de transcription T-bet (Gordon et al., 2012). Le développement des cNK et des ILC1 est dépendant des facteurs de transcription Id2 (Ikawa et al., 2001; Yokota et al., 1999) et Nfil3 (Nfil3= *Nuclear Factor, Interleukin 3 Regulated*) (Klose et al., 2014; Yu et al., 2014). Ce dernier a été identifié initialement comme étant un facteur de transcription clef dans le développement des progéniteurs précoces des cNK (Gascoyne et al., 2009; Kamizono et al., 2009) et plus récemment dans celui des ILC (Klose et al., 2014; Yu et al., 2014) (Figure 4).

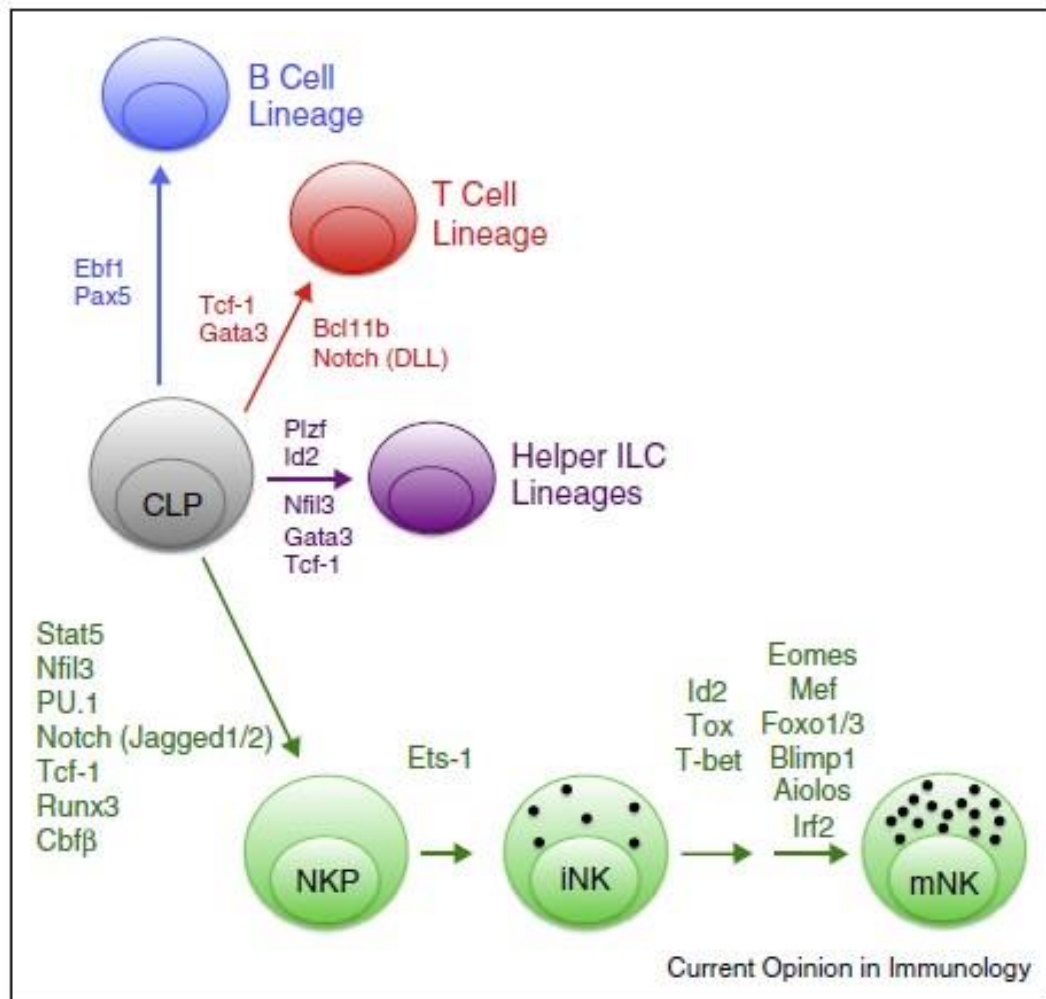


Figure 4 adaptée à partir de (Geiger and Sun, 2016) : Développement et différenciation des cNK. La différenciation des cellules cNK à partir du NKP dépend du facteur de transcription Nfil3 et fait intervenir la molécule de signalisation STAT5. L'acquisition des propriétés cytotoxiques repose sur l'expression de certains facteurs de transcription comme Eomes (Eomesodermin).

3. Sous-populations d'ILC1

a. Les NK conventionnelles (cNK)

Les NK ou cellules tueuses naturelles, ont été découvertes il y a 40 ans (Kiessling et al., 1975), elles sont dépendantes de l'IL-15, cytotoxiques (production de perforine, granzyme), produisent de l'IFN γ et dépendent des facteurs de transcription EOMES et T-bet (Gordon et al., 2012). Les NK sont identifiées chez l'homme comme étant CD3⁻ CD56⁺ NKp46⁺ et CD3⁻ NK1-1⁺ CD49b⁺ NKp46⁺ chez la souris (Lanier et al., 1986) .

Les cNK jouent un rôle dans l'immunité anti-infectieuse et anti-cancéreuse en induisant la mort des cellules cibles soit par cytolyse (perforine, granzyme), soit par induction de l'apoptose et ce de façon dépendante (ADCC : *Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*) ou non des Immunoglobulines (Vivier et al., 2008). Etant donné l'absence de récepteur spécifique aux antigènes à la surface des cellules NK, ces dernières distinguent les cellules du soi infectées ou transformées des cellules saines grâce à l'expression de récepteurs activateurs tels que NKp46 (activateur de la voie alternative du complément) et NKG2C/D (récepteurs de molécules de stress produites par les cellules infectées) ou inhibiteurs tels que Ly49 (reconnaissant le CMHI exprimé par les cellules saines) (Geiger and Sun, 2016).

Différentes sous-population de NK ont été identifiées chez la souris en fonction de leur localisation tissulaire, de l'expression des facteurs de transcription T-bet et EOMES ainsi que de leur dépendance à l'IL-7 (Figure 5).

b. Les NK thymiques

Les NK thymiques ont été identifiées par Vossenrich et al en 2006 (Vosshenrich et al., 2006). Ces cellules possèdent les caractéristiques du lignage NK car elles conservent l'expression de NKp46, Eomes et CD49b et sont dépendantes de Nfil3 (Gabrielli et al., 2017; Ribeiro et al., 2010). En revanche, contrairement aux cNK, elles expriment la chaîne alpha du récepteur à l'IL-7 (IL-7R α^+), sont dépendantes de GATA3 pour leur développement et produisent uniquement de l'IFN γ . De ce fait, ces cellules ont été apparentées aux ILC1 « non-NK » résidentes des tissus (Klose et al., 2014). Cependant, il a été récemment rapporté que les cellules NK thymiques se développent indépendamment de T-bet et de Id2 contrairement aux ILC1 non NK résidentes des tissus (Gabrielli et al., 2017; Ribeiro et al., 2010). Le débat reste donc ouvert quant aux liens de parenté entre NK thymiques, NK conventionnelles et ILC1 non-NK (Male and Brady, 2017).

c. Les ILC non-NK

Les ILC1 non-NK ont pu être détectées dans de nombreux tissus tels que le foie, les intestins, le thymus et les glandes salivaires (Jiao et al., 2016). Malgré l'expression de

marqueurs spécifiques des cNK EOMES⁺ (NKp46, NK1-1, T-bet) et leur capacité à sécréter de l'IFN γ , les ILC1 non-NK EOMES⁻ s'en distinguent par l'expression du récepteur à l'IL-7 et leur dépendance au facteur de transcription T-bet (Ribeiro et al., 2010; Vosshenrich et al., 2006). En 2005 Takeda et al identifient des cellules NK EOMES⁻ DX5⁻ Ly49⁻ CD49a⁺ exprimant TRAIL (*Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand*) dans le foie fœtal chez la souris. Cette population persistant chez l'adulte, il a été démontré qu'elle était capable d'acquérir l'expression d'EOMES, de la perforine et du granzyme suite à un transfert adoptif (Takeda et al., 2005). Il a donc été proposé que ces cellules sont des précurseurs des NK conventionnelles. Cependant, cette population n'est pas impactée chez des souris déficientes pour Eomes ou NFIL3 (Seillet et al., 2014) alors qu'elle l'est chez des souris déficientes pour T-bet (Gordon et al., 2012; Klose et al., 2014). Ces travaux suggèrent donc que ces cellules ne sont pas des NK immatures mais des ILC de type 1 résidentes du foie et constituant un lignage distinct de celui des NK conventionnelles.

Des ILC1 « non-NK » aux caractéristiques similaires ont également été caractérisées dans l'intestin chez l'homme et chez la souris (Bernink et al., 2015; Klose et al., 2014; Spits et al., 2016). On distingue également dans les deux espèces, une sous population d'ILC1 intra-épithéliales (ieILC1) localisées dans les intestins (Fuchs et al., 2013). Ces cellules se caractérisent chez la souris par l'expression de CD103 et CD160 et sécrètent de fortes quantités d'IFN γ . Les ILC1 non-NK ont également été caractérisées chez la souris au sein des glandes salivaires. Ces cellules se développent indépendamment de NFIL3 et ont la capacité d'induire la mort cellulaire via TRAIL mais ne produisent que très peu d'IFN γ contrairement à leurs homologues hépatiques (Cortez et al., 2014) .

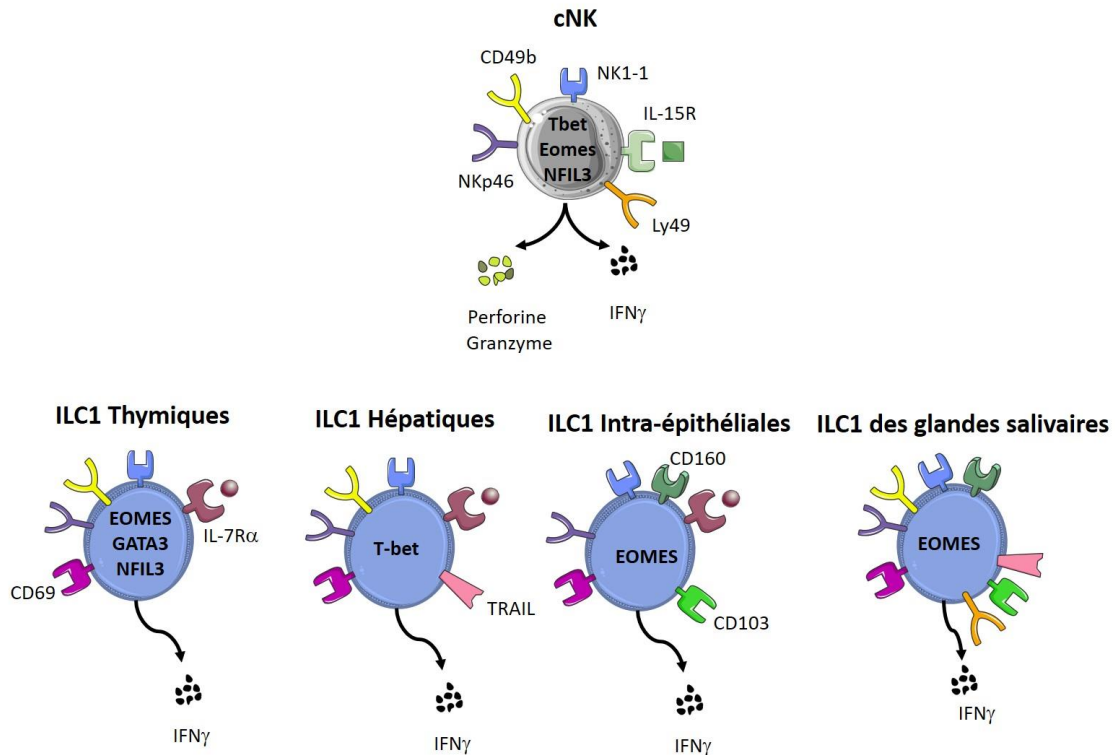


Figure 5 adaptée à partir de (Jiao et al., 2016) : Les différents sous-types d'ILC1. Description des marqueurs de surface et sécrétion de cytokine discriminant les différents sous type d'ILC1 non-NK en fonction de leur localisation tissulaire. Les ILC1 non-NK sont dans la majorité des cas sensibles à l'IL-7 contrairement aux cNK de la rate. Les ILC1 du foie et des glandes salivaires se distinguent des cNK par l'expression de TRAIL (Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand). Les ILC1 intra-épithéliales expriment CD103 et CD160, tandis que les ILC1 thymiques sont dépendantes de Nfil3, GATA3 et Eomes.

ii. Les ILC de type II

1. Caractérisation des ILC2

La découverte des ILC2 a débuté en 2001, suite aux investigations de Fort et al, mettant en évidence le rôle de l'alarmine IL-25 dans l'induction de la sécrétion de cytokines de type 2 telles que l'IL-13 et l'IL-5 (Fort et al., 2001). Les auteurs décrivent une population cellulaire minoritaire de la rate nommée nonT/nonB ou NBNT ($\text{Lin}^- \text{CMHII}^{\text{hi}}, \text{CD11c}^{\text{dull}} \text{CD4}^- \text{CD8}^- \text{F4/80}^{\text{lo}}$) responsables de l'induction de la sécrétion de mucus ainsi que d'une éosinophilie, dans différents tissus (poumons, colon, l'intestin grêle) chez des souris dépourvues de cellules B et T ($\text{RAG}^{-/-}$).

En lien avec ces découvertes, Fallon et al rapportent en 2006 que les NBNT dépendantes de l'IL-25 sont responsable de la réponse immunitaire de type T_H2 contre le parasite intestinal *Nippostrongylus Brasiliensis* (NB) de manière indépendante des lymphocytes T et B (Fallon et al., 2006). Enfin, en 2010, N.J. McKenzie et son équipe décrivent des cellules sécrétrices d'IL-13 nommées « Nuocytes » (nu correspondant à la 13^{ème} lettre de l'alphabet grec) (Neill et al., 2010). Ces nuocytes expriment les récepteurs aux alarmines IL-33 et IL-25 (ST2 et IL-17R β respectivement), participent à la réponse antiparasitaire de type 2 et jouent un rôle délétère dans un modèle d'inflammation des voies respiratoires chez la souris. La même année, Moro et al mettent également en évidence chez l'homme et la souris, une population innée lymphoïde Lin⁻ c-Kit⁺ Sca-1⁺ IL-7R α ⁺ CD25⁺ ST2⁺ sécrétrices de cytokines de type 2 (Moro et al., 2010). Ces cellules sont localisées dans les Clusters Lymphoïdes Associés aux tissus Adipeux (FALC) et participent à la réponse immunitaire de type T_H2 contre les parasites intestinaux. Elles sont alors nommées « *Natural helper* » par analogie aux lymphocytes T de la même catégorie.

Plusieurs équipes ayant caractérisé des cellules aux caractéristiques ontogéniques et fonctionnelles similaires, les appellations « Nuocytes » et « *Natural helper* (Moro et al., 2010) » ont été délaissées au profit de la nouvelle nomenclature qui les inclue dans le groupe des ILC de type 2. Les ILC2 expriment la chaîne α du récepteur à l'IL-7 (IL-7R α), la chaîne α du récepteur de haute affinité à l'IL-2 (CD25), ICOS, Sca-1, et les récepteurs aux alarmines IL-25 (IL-17R β), IL-33 (ST2) et TSLP (CRLF2). Ces cellules expriment également le complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMHII), ainsi que des molécules co-stimulatrices des lymphocytes T (OX40L) (Drake et al., 2014). Les ILC2 sont localisées au sein de tissus lymphoïdes (FALC, ganglions lymphatiques, rate) et non lymphoïdes (foie, intestin grêle, gros intestin, poumons) et en très faible proportion dans la circulation sanguine (Walker and McKenzie, 2013).

Les ILC2 répondent aux alarmines sécrétées par les tissus environnants en produisant des cytokines à signature T_H2 telles que l'IL-5, l'IL-13, l'IL-9 et l'IL-4 (McKenzie et al., 2014). L'IL-5 est une cytokine inflammatoire qui attire et active les éosinophiles sur le site inflammatoire. L'IL-13 induit la contraction des muscles lisses, la production de mucus par les cellules caliciformes, l'hyperplasie des « *Tuft cells* » (productrices d'IL-25 dans l'intestin)(von

Moltke et al., 2016) ainsi que l'activation de macrophages de type M2 (Dyken and Locksley, 2013). L'IL-4 (produite en faible quantité par les ILC2) favorise la différenciation des lymphocytes T naïfs en T_H2 (Pelly et al., 2016) et la commutation de classe des immunoglobulines vers l'isotype en IgE par les lymphocytes B (Drake et al., 2016). La sécrétion autocrine et paracrine de l'IL-9 est cruciale pour la survie des ILC2 activées et pour l'activation des mastocytes tandis que l'Amphiréguline (Areg) produite par les ILC2 joue un rôle important dans la réparation tissulaire (Klose and Artis, 2016) (Figure 6).

La découverte des nuocytes, que l'on nomme aujourd'hui ILC2, a marqué le début de nombreuses investigations concernant leurs implications dans l'asthme, les allergies ou encore la dermatite atopique. Aujourd'hui, ces cellules font également l'objet de nombreuses réflexions et investigations scientifiques dont l'objectif est de déterminer si elles constituent des cibles thérapeutiques pertinentes (Lambrecht and Galli, 2015).

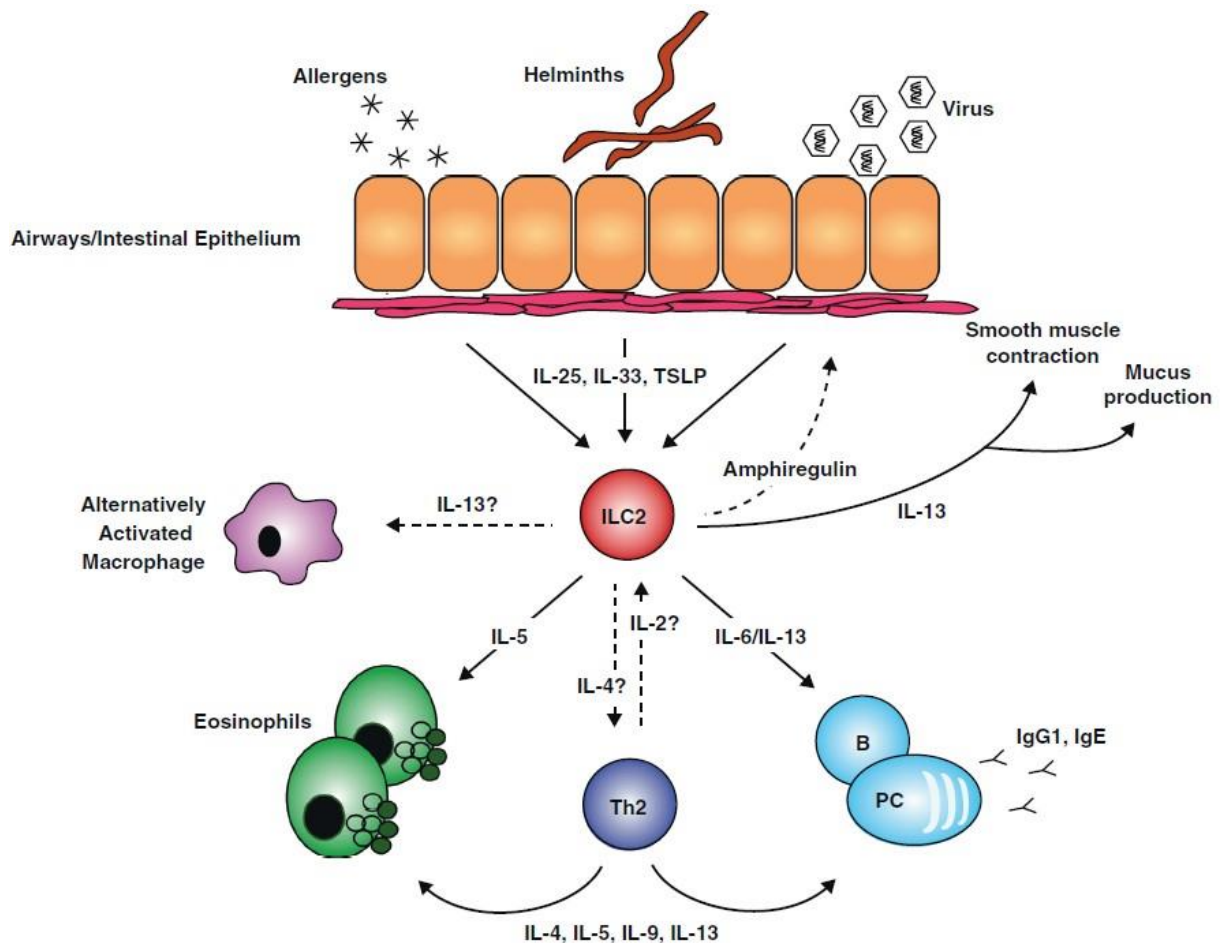


Figure 6 adaptée à partir de (Jennifer A Walker and Andrew NJ McKenzie, 2013) : Fonction des ILC2. Les ILC2 participent aux réponses immunes dirigées contre les parasites intestinaux, les allergènes ou les virus via la sécrétion de cytokines de type 2 suite à une stimulation par les alarmines (IL-25, IL-33, TSLP) produites par les tissus endommagés environnants.

2. Diversité des ILC2

La découverte des nuocytes a signé le début de nombreuses investigations qui ont mené à l'identification de plusieurs sous-types d'ILC2. Par différence aux ILC2 naturelles (nILC2) dépendantes de l'IL-33, les ILC2 inflammatoires (iILC2) répondent préférentiellement à l'IL-25 libérée en situation inflammatoire, suite à une infection parasitaire intestinale. Dans ces conditions, l'expression de ST2 est réprimée au profit de KLRG1 (marqueur de maturité des ILC2) (Huang et al., 2015). Une autre population d'ILC2, nommées ILC2 mémoires (mILC2), persiste plusieurs mois dans les ganglions lymphatiques après la résolution de l'inflammation par un allergène. Cette population d'ILC2 mémoire conserve la capacité à répondre plus rapidement et plus fortement à une seconde stimulation. L'absence de marqueur spécifique

rend toutefois la distinction entre mILC2 et nILC2 impossible à l'état d'équilibre (Martinez-Gonzalez et al., 2016). Enfin, une sous population d'ILC2 co-productrice d'IL-10 et d'IL-9 a récemment été identifiée dans les poumons de souris traitées avec de l'IL-33 (Kaye et al., 2017). Ces cellules nommées ILC2₁₀ persistent au sein des tissus suite à l'administration de l'IL-33 puis la population se « rétracte ». Les ILC2₁₀ se distinguent des lymphocytes T régulateurs par l'absence d'expression du facteur de transcription Foxp3 et la réduction de la production d'IL-10 en présence de TGFβ.

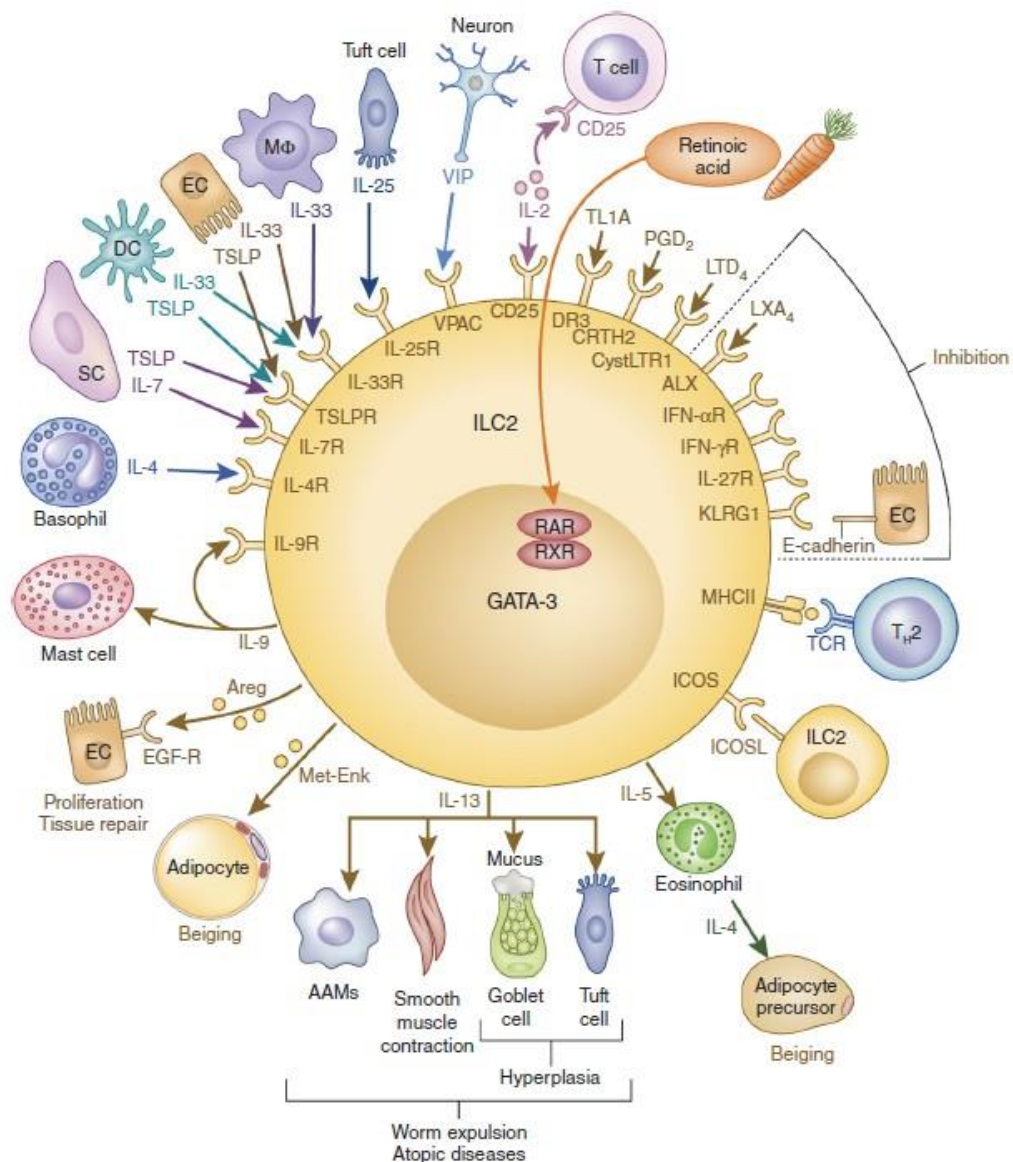


Figure 7 adaptée à partir de (Klose and Artis, 2016) : Vue globale de la fonction et des marqueurs de surface exprimés par les ILC2 matures. Les ILC2 sont sensibles à certains facteurs environnementaux comme les alarmines IL-33, IL-25 et TSLP qui participent à leur activation. L'IL-2 et

l'IL-9 sécrétées de manière autocrine favorisent la survie des ILC2. De plus, les ILC2 participent à la réponse immunitaire antiparasitaire, via la sécrétion de cytokines de type 2 (IL-5, IL-13) et jouent un rôle dans la réparation tissulaire par le biais de l'Amphiréguline, suite aux dommages tissulaires causés par l'infection par un pathogène (virus). Les ILC2 interagissent avec les lymphocytes T effecteurs via le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMHII) et induisent leur différenciation en lymphocytes T effecteurs T_H2.

SC: Stromal cells; TSLP: Thymic Stromal Lymphopoietin; EC: Epithelial cell; AAM: Alternatively Activated macrophages; DC: Dendritic cell; Mo: Macrophages.

iii. Les ILC de type III

L'expression du facteur de transcription ROR γ t (*Retinoic Acid Receptor-Related Orphan Receptor gamma t*) est spécifique des ILC3 et indispensable à leur développement et à leur survie (Eberl, 2016; Eberl et al., 2004; Sun et al., 2000). A l'état d'équilibre, les ILC ROR γ t⁺ siègent principalement dans l'intestin grêle et dans les organes lymphoïdes, ces cellules peuvent également être détectées dans les muqueuses respiratoires en cas d'inflammation (Chapitre II) (Gladiator et al., 2013a; Okada et al., 2015; Van Maele et al., 2014). Chez la souris, il existe plusieurs sous-types d'ILC3 classées selon l'expression différentielle du récepteur de chimiokine CCR6 et du récepteur naturel cytotoxique (NKp46) (Klose et al., 2013a) (Figure 12). Le récepteur CCR6 a pour ligand la chimiokine CCL20 produite par les cellules stromales lymphoïdes et les cellules épithéliales des muqueuses (Lee and Körner, 2017). Le récepteur NKp46 est exprimé par les cellules NK, les ILC1 et une partie des ILC3. Son rôle dans la fonction et le développement des ILC reste controversé bien qu'un ligand récemment identifié chez l'homme et la souris lui confère un rôle protecteur dans certaines infections bactériennes (Narni-Mancinelli et al., 2017). Les ILC3 répondent essentiellement à l'IL-1 β et à l'IL-23 sécrétées par des cellules myéloïdes résidentes de tissus, en produisant de l'IL-17, de l'IL-22 et du GM-CSF (Mortha et al., 2014; Pearson et al., 2016). Par ailleurs, les ILC3 peuvent également sécréter de l'IFN γ en réponse à l'IL-12 (Buonocore et al., 2010; Klose et al., 2013a; Vonarbourg et al., 2010).

1. Les cellules inductrices des tissus lymphoïdes (LTi)

a. Caractérisation

R. Mebius et al identifient en 1997, une population distincte des lymphocytes T ($CD45^+ CD4^+ CD3^-$) localisée dans la zone corticale des ganglions lymphatiques aux stades précoces du développement chez la souris (Mebius et al., 1997). Ces cellules expriment à leur surface la lymphotoxine beta ($LT\beta$), l'intégrine $\alpha_4\beta_7$ ainsi que les récepteurs $IL-7R\alpha$ et c-Kit (récepteur aux Facteurs de Cellules Souches (SCF)). Deux ans plus tard, l'équipe de Shin-ichi Nishikawa caractérisait une population lymphoïde $CD3^-$ exprimant elle aussi la chaîne α du récepteur à l'IL-7 ainsi que les lymphotoxines α et β . Localisées au niveau des ébauches des plaques de Peyer, il a été proposé que cette population était alors impliquée dans l'induction des premières étapes de la formation de ces structures lymphoïdes (Yoshida et al., 1999).

En l'an 2000 D. Littman et al ont observé que les souris déficientes pour $ROR\gamma t$ sont dépourvues de ganglions lymphatiques et de plaques de Peyer (PP) démontrant que ce facteur est essentiel à l'organogenèse de ces tissus lymphoïdes secondaires (Sun et al., 2000). Quatre ans plus tard, G. Eberl et al rapportent que $ROR\gamma t$ est exprimé spécifiquement au stade foetal par les cellules $CD45^+ CD4^+ CD3^- IL-7R\alpha^+$ décrites par R. Mebius (Mebius et al., 1997) et S. Nishikawa (Adachi et al., 1998) à la fin des années 1990 et que $ROR\gamma t$ est nécessaire au développement de ces cellules alors nommées cellules Inductrices de Tissus Lymphoïdes (LTi=*Lymphoid Tissue Inducer cells*) (Eberl and Littman, 2004; Eberl et al., 2004).

Les LTi constituent la population d'ILC3 la plus abondante au stade foetal ou elles se localisent dans les ébauches ganglionnaires. Elles expriment l'hétérotrimère de lymphotoxine $LT\alpha_1\beta_2$ (Eberl et al., 2004; Mebius, 2003; Yoshida et al., 1999), le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMHII) (Hepworth et al., 2013) et le corécepteur CD4 pour une partie d'entre elles. Les LTi foetales ont également la capacité de sécréter de l'IL-17 et de l'IL-22 (Takatori et al., 2009) bien que le rôle de ces cytokines avant la naissance reste peu caractérisé. L'expression de l'intégrine $\alpha_4\beta_7$ et de CXCR5 (récepteur de la chimiokine CXCL13) confèrent aux LTi un tropisme vers les organes lymphoïdes (Katakai et al., 2008; van de Pavert et al., 2009). En outre, l'expression de CCR6 est nécessaire au recrutement et à l'agrégation des LTi au sein des cryptoplaques dans l'intestin grêle (Lügering et al., 2010). Après la naissance on nomme ces cellules les « LTi-Like cells » ou ILC3 CCR6⁺. Elles se localisent au sein

des tissus lymphoïdes (ganglions lymphatiques et plaques de Peyer), des cryptoplaques et des follicules lymphoïdes isolés situés à la proximité des cryptes intestinales (Figures 8 et 9).

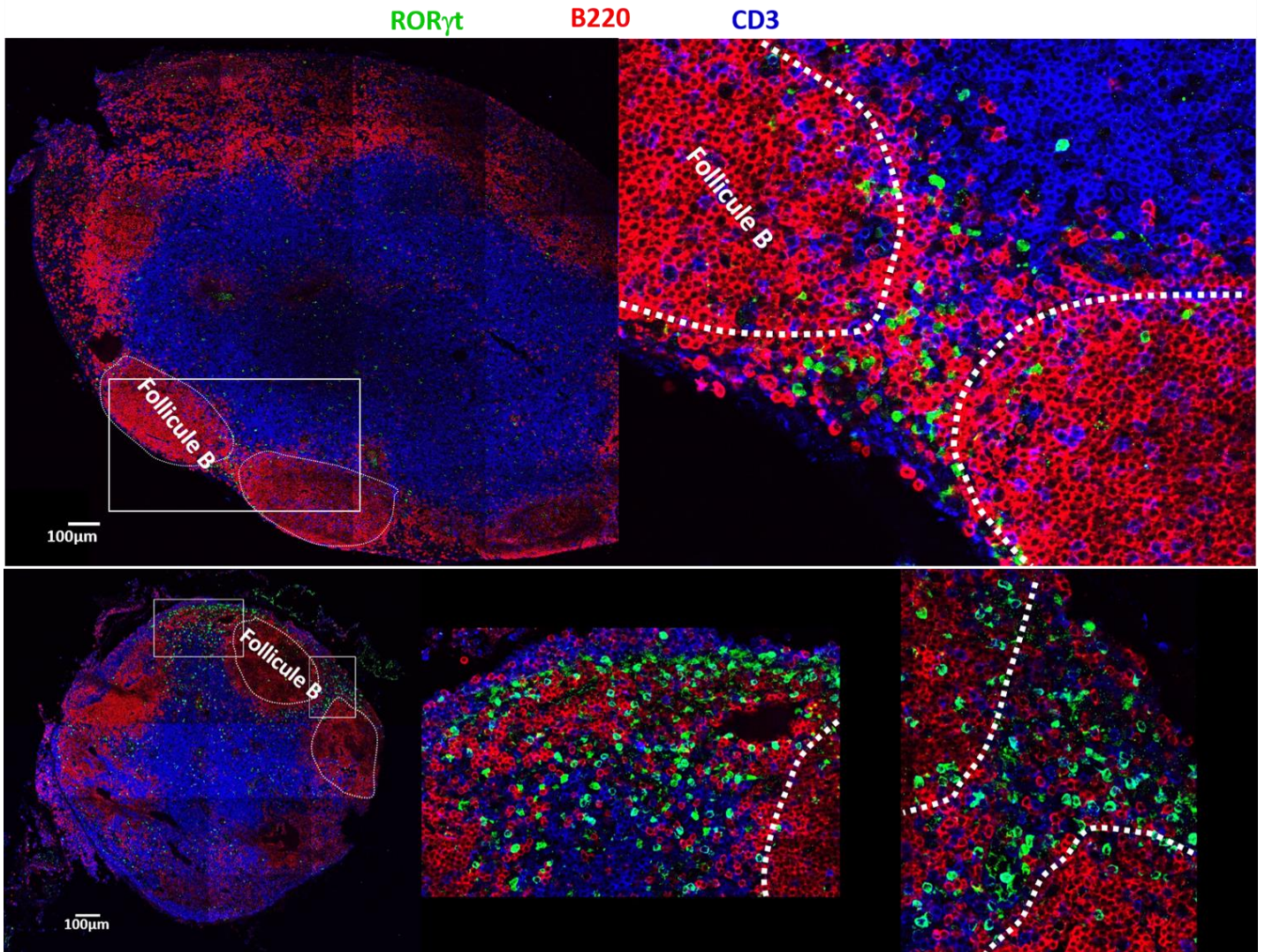


Figure 8 Priscillia Bresler, 2014 : Marquages de coupes de ganglions mésentériques (Haut) et périphériques (bas) de souris ROR γ t-GFP⁺ (G.Eberl, 2004) par immuno-fluorescence. Rouge: marquage des cellules B (anti-B220), bleu: marquage des lymphocytes T (anti-CD3 ϵ) et vert marquage des cellules ROR γ t⁺ (anti-GFP). Les ILC ROR γ t⁺ sont situées dans le cortex ganglionnaire au niveau de la zone inter-folliculaire B.

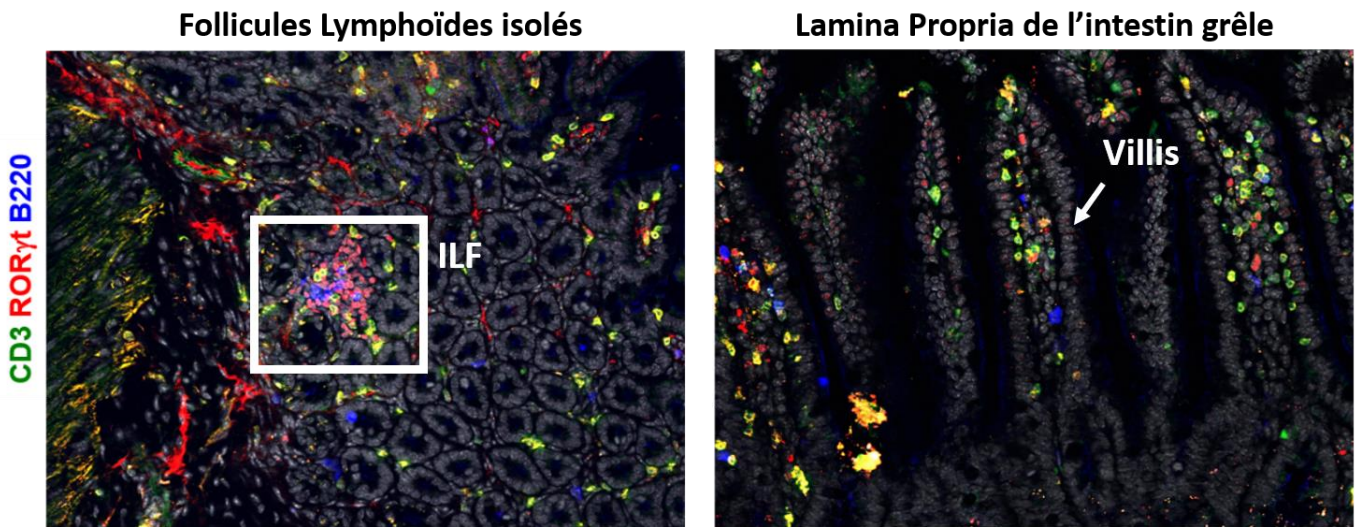


Figure 9 Marie Cherrier 2014 : Marquages de coupes d'intestin grêle de souris CD57BL/6J par immunofluorescence (gauche ILF, droite villosités de l'intestin). Bleu: marquage des cellules B (anti-B220), Vert: marquage des lymphocytes T (anti- CD3 ϵ) et Rouge marquage des cellules ROR γ t⁺ (anti-ROR γ t).

b. Fonction des LTi avant la naissance

Les LTi sont nécessaires au développement des ganglions lymphatiques (Mebius et al., 1997; Sun et al., 2000) et des plaques de Peyer (Adachi et al., 1997, 1998; Yoshida et al., 1999) au stade foetal (Chapitre III-a). Ce processus est programmé : il intervient au cours d'une fenêtre développementale précise chez la souris (E=12.5) dans des sites anatomiques définis. Au cours du développement des ganglions lymphatiques, l'acide rétinoïque qui pourrait être produit par des terminaisons nerveuses induit la sécrétion de la chimiokine CXCL13 ainsi que l'expression de molécules d'adhérence telles que ICAM et VCAM par des cellules stromales spécialisées nommées « Lymphoid Tissue Organizers » (LTo) (Katakai et al., 2008; van de Pavert and Vivier, 2015). Les LTi sont recrutées à proximité des LTo au sein des ébauches ganglionnaires et l'interaction entre la lymphotoxine exprimée par les LTi matures et son récepteur LT β R exprimé par les LTo induit l'activation de ces dernières et une augmentation de la sécrétion des chimiokines CXCL13, CCL19 et CCL21 et de l'expression des molécules d'adhérence ICAM, VCAM et MAdCAM par les cellules stromales (Katakai et al., 2008). L'activation du stroma permet de recruter d'avantage de LTi mettant ainsi en place une boucle

d'activation positive aboutissant à la colonisation de l'ébauche ganglionnaire par les lymphocytes B et T et les cellules dendritiques. Un processus similaire a lieu au niveau des ébauches des plaques de Peyers (PP) (Adachi et al., 1997, 1998). Dans ce cas, l'expression du *Neuroregulatory Receptor* (RET) par les LTi CD4⁺ LTβ^{hi} jouerait un rôle important dans le guidage des LTi (E=12.5) vers les intestins (Veiga-Fernandes et al., 2007) (Figure 10). Le processus détaillé du développement des tissus lymphoïdes associés aux intestins sera développé en détail dans le chapitre III-a.

c. Fonction des LTi après la naissance

i. Développement des ILFs

Après la naissance et au moment du sevrage les ILC3 CCR6⁺ nommées LTi-Like (Eberl and Littman, 2004) participent à la maturation des follicules lymphoïdes isolés (ILF= *Isolated Lymphoid Tissue*) (Tsuji et al., 2008), en partie dépendante du microbiote intestinal (Bouskra et al., 2008). Les ILF sont des follicules dispersés à proximité des cryptes dans la *lamina propria* de l'intestin. Ils sont constitués de lymphocytes B, de LTi, de cellules stromales, de cellules dendritiques (DC) et de rares lymphocytes T. Les ILF sont les sites d'induction de plasmocytes IgA⁺ de façon indépendante des lymphocytes T (Chapitre III-a-5) (Tsuji et al., 2008). Les souris déficientes pour RORγt (RORγt^{gfp/gfp}) sont non seulement dépourvues de ganglions lymphatiques et de plaques de Peyers mais elle ne développent pas non plus d'ILF après la naissance (Eberl and Littman, 2004; Klose et al., 2013a; Tsuji et al., 2008). Ces observations suggèrent que les LTi pourraient également participer au développement des ILF de façon similaire au développement des PP et des ganglions lymphatiques. Le rôle des LTi dans le développement de ILF sera développé en détail dans le chapitre III-a.

ii. Confinement des bactéries commensales

La flore microbienne intestinale est composée d'une multitude de bactéries commensales jouant un rôle important dans le développement du système immunitaire et la protection contre le développement des espèces bactériennes pathogènes. Cependant, un déséquilibre du microbiote intestinal (dysbiose) consécutif à un traitement antibiotique peut occasionner la prolifération d'espèces bactériennes potentiellement pathogènes et induire

une inflammation locale (Becattini et al., 2016). Sonnenberg et al. ont rapporté que les ILC résidentes de l'intestin et des tissus lymphoïdes associés (GALT= *Gut Associated Lymphoid Tissues*) jouent un rôle crucial dans le confinement des bactéries commensales via la sécrétion d'IL-22 induisant à son tour la production des peptides antimicrobiens Reg3 γ / β et β -Défensines (Sonnenberg and Artis, 2012; Sonnenberg et al., 2012). Ils ont notamment observé la dissémination de bactéries à gram négatif telles que *Alcaligenes spp* suite à la déplétion des ILC avec un anticorps anti-Thy1 (CD90) chez des souris dépourvues de système immunitaire adaptatif (RAG^{-/-}). Cette dissémination étant accompagnée d'une inflammation systémique touchant les organes périphériques tels que le foie et la rate il a été conclu que les ILC productrices d'IL-22 jouent un rôle essentiel dans le confinement du microbiote intestinal. L'absence de système immunitaire adaptatif et l'expression de CD90 par de nombreux types cellulaires autres que les ILC ROR γ t⁺ suscitent cependant des réserves quant à ces interprétations. Le développement d'outils permettant de cibler plus spécifiquement les ILC ROR γ t⁺ devrait permettre d'étayer ou non ces observations.

iii. Sélection du répertoire T en périphérie

A ces fonctionnalités développementales et antimicrobiennes après la naissance, s'ajoute un rôle très important des LTI-*Like* dans la sélection du répertoire T (Chapitre III-b). Ce mécanisme impliquerait une interaction entre des complexes CMHII-peptides situés à la surface des LTI-*Like* et le TCR des cellules T CD4 matures, mimant ainsi la sélection négative des clones auto-réactifs ayant lieu dans le thymus (Hepworth et al., 2013). En effet, M. Hepworth et al ont récemment rapporté que les LTI-*Like* peuvent induire la mort des lymphocytes T CD4⁺ spécifiques de bactéries commensales de l'intestin *in vitro* et ce de façon dépendante des molécules du CMH de classe II (Hepworth et al., 2015a). Le rôle des ILC3 dans la sélection du répertoire T sera expliqué en détail dans le chapitre III-b.

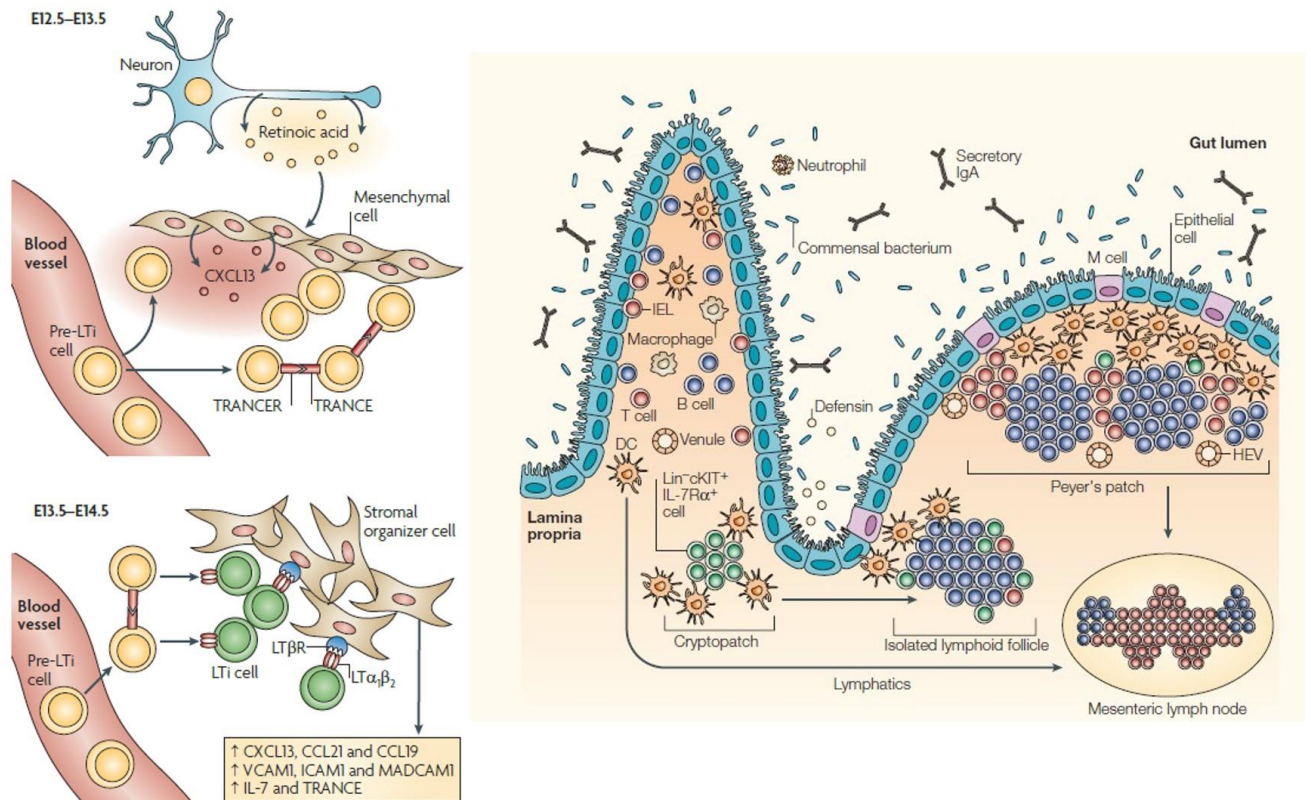


Figure 10 adaptée à partir de Eberl, 2005 et van de Pavert and Mebius, 2010) : Fonction des LTI avant et après la naissance. (Gauche) La formation des ganglions lymphatiques est initiée avec l'arrivée des précurseurs des cellules inductrices de tissus lymphoïdes (Pre-LTI) à partir du sang, dans l'ébauche ganglionnaire grâce au gradient de chimiokine CXCL13 sécrété par les cellules mésenchymateuses (cellules stromales) activées par l'acide rétinoïque. Les LTI se rassemblent et expriment la $LT\alpha_1\beta_2$ à leur membrane. Elles peuvent alors interagir avec les cellules stromales exprimant les récepteurs à la lymphotoxine ($LT\beta R$). En retour, les cellules stromales sécrètent un cocktail de chimiokines (CCL19, CCL21, CXCL13) et expriment des molécules d'adhérence spécifiques (VCAM1, ICAM1), ce qui favorise le recrutement, l'ancrage local de lymphocytes et la poursuite du développement de l'édifice ganglionnaire. (Droite) Avant la naissance, les LTI ($Lin^- cKit^+ IL-7R\alpha^+$) participent au développement des tissus lymphoïdes associés à l'intestin (ganglions mésentériques et plaques de Peyer) et des ganglions périphériques. Après la naissance, suite à la colonisation bactérienne, les LTI induisent la maturation des cryptoplaques en Follicules Lymphoïdes Isolés (ILF). Chacun de ces organes lymphoïdes contribue à l'immunité intestinale innée (peptides anti-microbiens) et adaptative (Immunoglobuline A (IgA) de haute affinité).

IEL: Intraepithelial Lymphocytes; DC: Dendritic cells; TRANCE: TNF-related activation-induced cytokine; LT: Lymphotoxin. CCL: C-C Motif Chemokine Ligand.

2. Les ILC3 NKp46⁺ participent à l'homéostasie intestinale

a. Origine

Plusieurs travaux ont été menés dans les années 2010 afin d'élucider l'origine des ILC3 NKp46⁺ sécrétrices d'IL-22. Vonabourg et al. rapportent que les ILC3 NKp46⁺ sécrétrices d'IL-22 proviennent d'ILC3 NKp46⁻ (Vonabourg et al., 2010) incluant les ILC3 Doubles Négatives (DN) NKp46⁻ CCR6⁻ T-bet⁺ (Klose et al., 2013a; Rankin et al., 2013) et les L*Ti-Like* NKp46⁻ CCR6⁺ T-bet⁻. Cependant, l'utilisation de souris permettant de tracer génétiquement les cellules ayant exprimé le facteur de transcription ROR γ t a permis d'établir que les ILC3 NKp46⁺ ne se différencient pas à partir des L*Ti-Like* (ILC3 NKp46⁻ CCR6⁺ T-bet⁻) (Sawa et al., 2010). En revanche, les travaux de Rankin (Rankin et al., 2013) et Klose (Klose et al., 2013a) ont établi que les ILC3 DN peuvent générer des ILC3 NKp46⁺ *in vivo* et *in vitro* de façon dépendante du facteur de transcription T-bet et de la voie de signalisation Notch (Rankin et al., 2013).

b. Fonction

La muqueuse intestinale est constamment exposée aux antigènes alimentaires et à une multitude de micro-organismes commensaux et pathogènes. La collaboration entre de nombreux types cellulaires du système immunitaire (cellules dendritiques, macrophages, lymphocytes B, T et ILC) et la monocouche de cellules épithéliales qui constituent la barrière intestinale joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie mucoale via la sécrétion de peptides antimicrobiens, de mucus et d'immunoglobulines A (IgA) hautement spécifiques des antigènes bactériens (Chapitre III) (Kayama and Takeda, 2016) (Figure 11).

Deux études indépendantes ont permis de mettre en évidence une population d'ILC situées dans la *lamina propria* de l'intestin qui expriment fortement le facteur de transcription ROR γ t et le récepteur naturel cytotoxique NKp46 (Sanos et al., 2009; Satoh-Takayama et al., 2008a). Contrairement aux cellules NK conventionnelles elles ne possèdent pas d'activité cytotoxique et ne sont pas dépendantes de l'IL-15. Une étude transcriptomique approfondie a révélé que les L*Ti* (ILC3 CCR6⁺) sont plus proches des ILC3 NKp46⁺ que des cellules NK conventionnelles (Reynders et al., 2011). En outre du facteur de transcription ROR γ t, les ILC3 NKp46⁺ expriment le récepteur à l'Aryl hydrocarbon (Ahr), les récepteurs à l'IL-23 et à l'IL-1 β qui jouent un rôle essentiel dans la production d'IL-22 par ces cellules (Cochez et al., 2016; Lee et al., 2011).

Contrairement aux LTI, les ILC3 NKp46⁺ sont peu abondantes avant la naissance et deviennent majoritaires après le sevrage et l'expansion des bactéries commensales (Cella et al., 2009; Klose et al., 2013a; Reynders et al., 2011; Sawa et al., 2010). Le rôle du microbiote intestinal dans le développement et la fonction de ces cellules est encore à ce jour sujet à controverse. L'utilisation de souris exemptes de micro-organismes (*Germ Free*) a fourni des conclusions contradictoires : alors que certains observent une diminution drastique du nombre d'ILC3 NKp46⁺ en absence de microbiote (Sanos et al., 2009; Satoh-Takayama et al., 2008a), d'autres observent que leur développement et leur nombre ne sont pas impactés (Lee et al., 2011; Sawa et al., 2010, 2011).

L'IL-1 β et l'IL-23 d'origine myéloïde jouent un rôle essentiel dans l'induction de la production d'IL-22 par les ILC3 NKp46⁺ (Reynders et al., 2011). Cette cytokine intervient dans la défense contre les bactéries pathogènes telles que *Citrobacter rodentium* (Satoh-Takayama et al., 2008a; Zheng et al., 2008) et *Listeria monocytogenes* (Reynders et al., 2011) en stimulant la production de peptides antimicrobiens tels que les β -Défensines ou RegIII γ/β . L'utilisation de modèles murins permettant la déplétion spécifique de ces cellules a cependant révélé une redondance fonctionnelle entre les ILC3 NKp46⁺ et les cellules T productrices d'IL-22 dans la réponse aux entéro-pathogènes (Rankin et al., 2015). Le chapitre II relate de manière détaillée le rôle des ILC dans l'homéostasie cellulaire et mucoale.

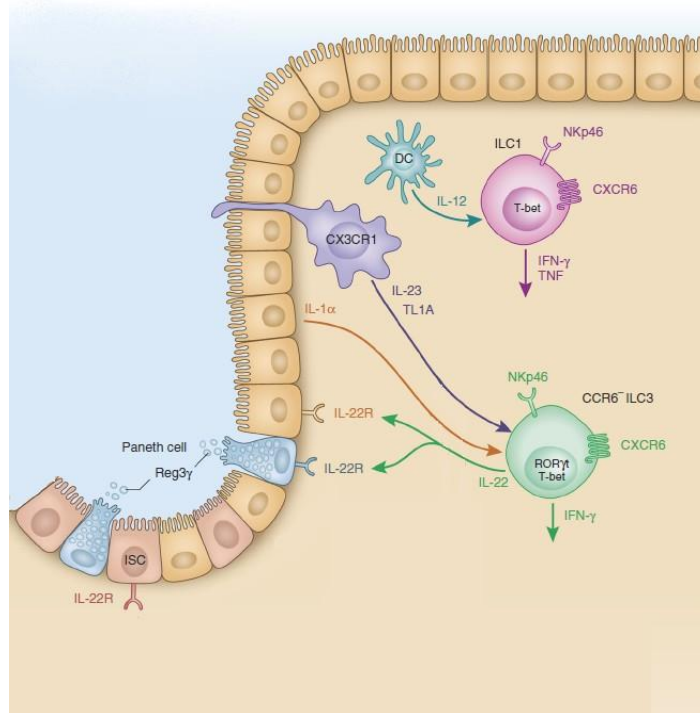


Figure 11 adaptée à partir de (Klose and Artis, 2016) : Les ILC3 participent au maintien de l'équilibre de la muqueuse intestinale. A l'état d'équilibre, les phagocytes mononucléés CX3CR1⁺ scannent les bactéries de la lumière intestinale, induisant l'activation des Récepteur à Reconnaissance de Pathogènes (PRR) à leur surface et la sécrétion d'IL-23. Les ILC3 CCR6⁻ NKp46⁺ de la *lamina propria* de l'intestin qui expriment le récepteur à l'IL-23 vont alors s'activer, suite à la liaison de l'IL-23 sur le récepteur. En conséquence, les ILC3 sécrètent de l'IL-22, cytokine activatrice des cellules épithéliales intestinales, sécrétant alors des peptides antimicrobiens (Reg3γ et β-Défensines) nécessaires à la protection de la barrière épithéliale intestinale.

c. Inflammation

Il a été démontré que des facteurs micro-environnementaux tels que les interleukines IL-23, IL-1β, IL-12, le TGFβ, le microbiote ou encore les ligands de Notch régulent la plasticité des ILC3 (Melo-Gonzalez and Hepworth, 2017). Le suivi des cellules RORγt⁺ de l'embryon à l'âge adulte a permis l'identification d'une population d'ILC3 NKp46⁺ ayant supprimé l'expression de RORγt⁺ et nommée « ex-ILC3 ». Ces dernières expriment fortement T-bet, le récepteur à l'IL-12 et participent à l'aggravation des signes cliniques de la colite expérimentale induite par l'anti-CD40 via la sécrétion d'IFNγ (Vonarbourg et al., 2010). Les bases moléculaires de cette plasticité ont été élucidées par Klose et al, qui ont rapporté qu'un gradient d'expression de T-bet par les ILC3 est à l'origine de modifications phénotypiques et

fonctionnelles induisant la sécrétion d'IFN γ et d'IL-17 au dépend de la production d'IL-22 (Klose et al., 2013a).

Une sous-population d'ILC répondant à l'IL-23 et contribuant à la colite chez des souris *Rag*^{-/-} infectées par *Helicobacter hepaticus* via la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-17 et l'IFN γ pourrait également appartenir à cette catégorie d'« ex ILC3 » inflammatoires (Buonocore et al., 2010). Cependant, le lien de parenté avec les ILC3 NKp46⁺ n'a pas été formellement établi dans ce travail.

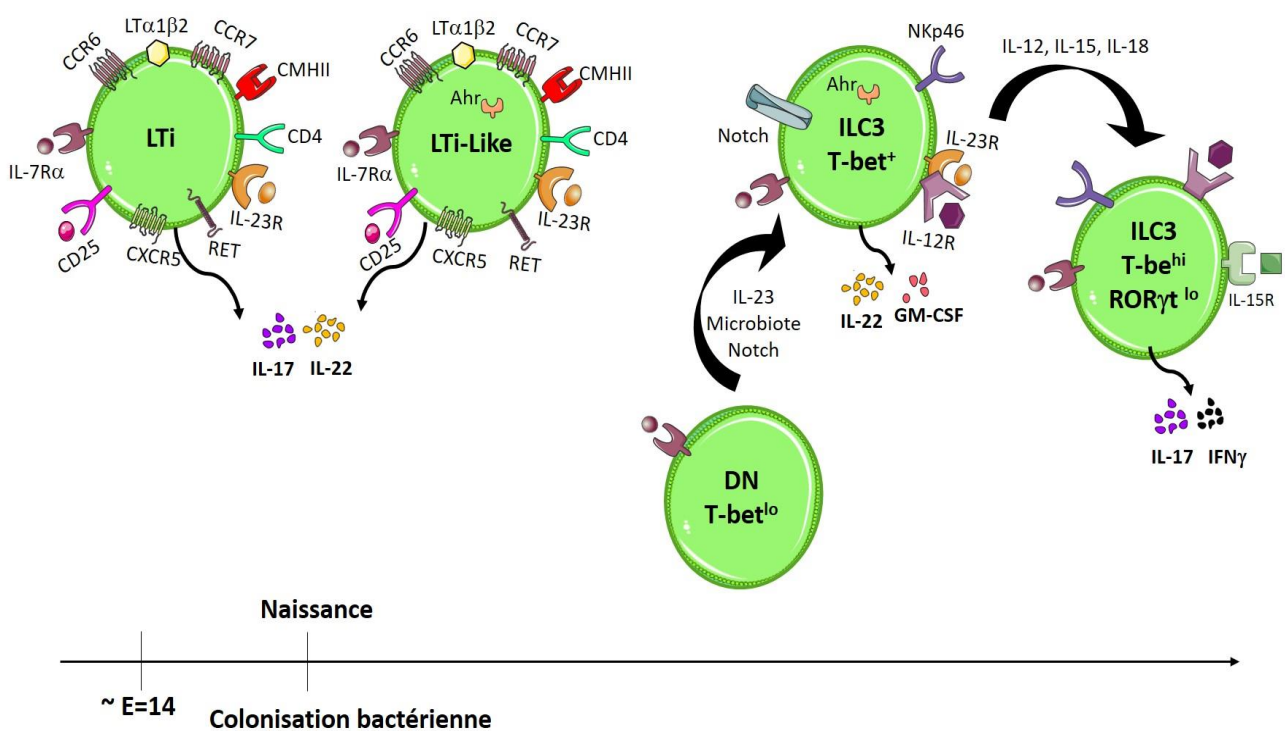


Figure 12: Les différents sous-types d'ILC3. Les ILC3 sont dépendantes du facteur de transcription ROR γ t et de l'IL-7 pour leur développement et leur survie. Avant la naissance, les LTi migrent vers les ébauches ganglionnaires et participent au développement des organes lymphoïdes de façon dépendante de la lymphotoxine α 1 β 2. Les LTi sécrètent de l'IL-17 et de l'IL-22. Après la naissance, les LTi sont en plus faible quantité et sont nommées LTi-Like. Les LTi et LTi-Like expriment le récepteur aux chimiokines CCR6 (CCR6). Les ILC3 NKp46⁺ CCR6⁻ sont dépendantes du facteur de transcription T-bet et du récepteur à l'Aryl Hydrocarbure (AhR). Elles sécrètent de l'IL-22, du GM-CSF et émergent à partir des ILC3 Doubles Négatives (DN, CCR6⁻ NKp46⁻). La présence d'IL-12, d'IL-15 et d'IL-18 dans l'environnement réprime l'expression du facteur de transcription ROR γ t au profit de T-bet. Ces cellules nommées « ex-ILC3 » acquièrent un phénotype proche des ILC1 et sécrètent des cytokines inflammatoires telles que l'IFN γ et l'IL-17. Au niveau de la muqueuse intestinale, les ILC3 NKp46⁺ jouent un rôle dans le maintien de l'homéostasie en induisant la sécrétion de peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales tandis que les ex-ILC3 double productrices d'IL-17 et d'IFN γ peuvent participer à l'inflammation.

LTi: Lymphoid Tissue Inducer cells; LT: Lymphotoxin; CMHII: Major Histocompatibility Complex 2; IL: Interleukin; Ahr: Aryl hydrocarbon receptor; GM-CSF: Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor; DN: Double Negative cell; IFN: Interferon; CCR: CCR: CC Chemokine Receptor; RET : Neuroregulatory Receptor.

iv. Les ILC régulatrices

Shuo Wang et al ont récemment mis en évidence une population lymphoïde innée régulatrice (ILCreg) distincte des trois autres sous populations déjà décrites et 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 possèdent les caractéristiques phénotypiques des ILC (Lin⁻ IL-7R α ⁺ CD45⁺). La sécrétion d'IL-10 leur confère un rôle protecteur contre l'inflammation intestinale. Une étude transcriptomique révèle également que ces cellules expriment le facteur de transcription Id3 ainsi que les récepteurs aux cytokines TGF β et IL-2 (TGF β R1 et 2, IL-2R β et γ respectivement) mais pas le facteur de transcription Foxp3 contrairement aux lymphocytes T régulateurs (Treg). Par ailleurs, la production de TGF β autocrine par les ILCreg joue un rôle essentiel dans la survie et l'expansion de ces cellules.

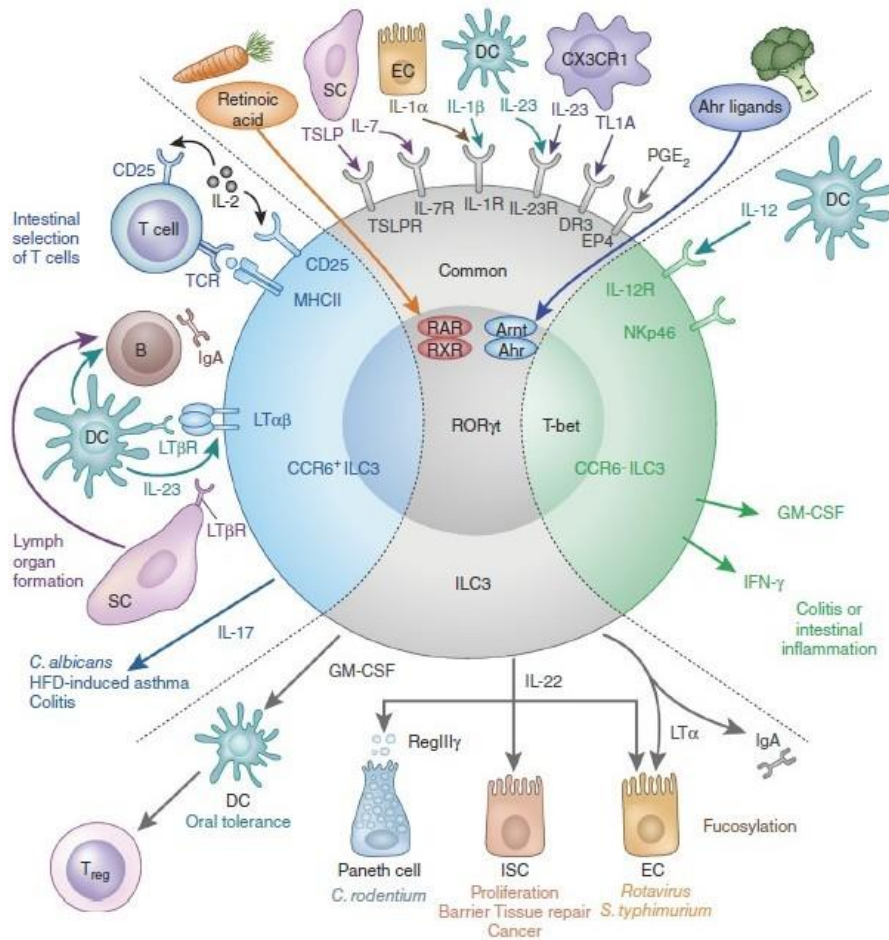


Figure 13 adaptée à partir de Klose et Artis 2016 : Vue globale des marqueurs exprimés par les ILC3 et des fonctions qui leur sont associées. Les ILC3 participent à la mise en place des défenses immunitaires de la muqueuse intestinale au travers d'interactions cellulaires extrêmement diversifiées. (Gauche) Avant la naissance, les ILC3 CCR6⁺ (LTi) sont responsables du développement des organes lymphoïdes secondaires. Après la naissance les LTi-like participent à la sélection du répertoire T via la présentation d'antigènes dans le contexte du complexe majeur d'histocompatibilité de type 2 (CMHII). Les LTi-like post-natales participent également à la formation des ILF de façon dépendante de la Lymphotoxine LT α 1 β 2. (Milieu) Les ILC3 NKp46⁺ sécrètent de l'IL-22 qui à son tour stimule la sécrétion de peptides anti-microbiens par les cellules de Paneth et favorise le renouvellement des cellules épithéliales intestinales en agissant sur les cellules souches intestinales (ISC). Les ILC3 NKp46⁺ reçoivent des signaux activateurs (IL-23, IL-1 α et β) provenant de sources multiples telles que les cellules dendritiques (DC) et les macrophages CX3CR1⁺. (Droite) Enfin, les ILC3 CCR6⁻ T-bet⁺ sont hautement plastiques et peuvent acquérir un phénotype similaire à celui des ILC1 sécrétrices d'IFN.

Ahr : Aryl Hydrocarbon Receptor ; HFD : High fat diet ; IgA : Immunoglobulin A ; Arnt: Nuclear translocator of Ahr.

c. Les besoins développementaux des ILC

L'ensemble des cellules sanguines de l'organisme vertébré dérive des Cellules Souches Hématopoïétiques (HSC= *Hematopoietic Stem Cells*). La différenciation des HSC induit la génération de deux progéniteurs majeurs : le Progéniteur Commun Myéloïde (CMP= *Common Myeloid Progenitor*) donnant lieu au lignage myéloïde et le Progéniteur Commun Lymphoïde (CLP= *Common lymphoid progenitor*) donnant lieu au lignage lymphoïde (Seita and Weissman, 2010). La première description du lien entre le CLP fœtal 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 fœtal au sein de souris permet de générer des LTi (Mebius et al., 2001). Dix années plus tard, Possot et al. rapportent que la totalité des ILC CXCR6⁺ 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).

L'engagement du lignage ILC à partir du CLP dépend de l'induction de plusieurs facteurs de transcription favorisant la perte de potentiel B et T. Parmi ces facteurs de transcription clés on distingue Id2, PLZF (PLZF= *Promyelocytic Leukaemia Zinc Finger*) ou encore Nfil3 (Serafini et al., 2015; Spits and Cupedo, 2012). Id2 inhibe la liaison des protéines à E-box de la famille E2A à leur séquence cible. La diminution de l'activité des protéines E2A est essentielle pour réprimer l'engagement vers les lignages B et T (Boos et al., 2007; Ikawa et al., 2001) et permettre l'émergence des ILC. PLZF est un facteur de transcription dont l'activité est essentielle au développement des lymphocytes iNKT (iNKT= *invariant Natural Killer T cells*) (Savage et al., 2008). Nfil3 est un facteur de transcription essentiel au développement des cNK et à l'émergence de l' α LP (α LP= $\alpha 4\beta 7^+$ -*Lymphoid Precursors*) qui sera décrit dans les paragraphes suivants (Yu et al., 2014).

Le développement des ILC à partir du CLP passe par l'émergence de Précurseurs Communs aux ILC (CILCP) (Figure 14). Ces derniers se diversifieraient ensuite en précurseurs à potentiel restreint (ILCP1, 2 et 3), cependant l'existence d'ILC1P et d'ILC3P reste à ce jour hypothétique. Enfin la maturation des ILC a lieu en périphérie sous l'influence de nombreux facteurs environnementaux (Figure 15).

i. Etape 1 : La quête du Précurseurs Commun aux ILC (CILCP)

L'équipe de Shin-Ichi Nishikawa fut la première à rapporter que l'expression de l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ permet d'identifier un précurseur du foie fœtal ayant perdu la capacité de générer des lymphocytes B tout en gardant ses potentialités vers les LTi (nommées à l'époque « Fetal Intestinal Lymphotoxin Producer ») chez la souris (Yoshida et al., 2001). En 2011, Possot et al associent l'expression du récepteur de chimiokine CXCR6 par une sous-population de progéniteurs fœtaux et adultes à leur potentiel de différenciation restreint aux ILC ROR γ t⁺ et aux cellules NK (Possot et al., 2011). La différenciation des ILC ROR γ t⁺ à partir de progéniteurs du foie fœtal (Cherrier et al., 2012) et de la moelle osseuse de souris adulte (CLP) serait donc associée dans un premier temps à l'expression de l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ puis à celle du récepteur de chimiokine CXCR6 (Possot et al., 2011; Yu et al., 2014). Ainsi, deux sous-types de progéniteurs provenant du CLP peuvent être identifiés en fonction de l'expression de l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ et de CXCR6: les CXCR6⁻ $\alpha 4\beta 7$ ⁺ et les CXCR6⁺ $\alpha 4\beta 7$ ⁺. L'expression de l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ et de CXCR6 signant l'arrêt du potentiel B et T respectivement. L'expression de CXCR6 et de l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ sont également associées à celles de facteurs de transcription favorisant l'engagement dans la voie de différenciation des ILC tels qu'Id2, GATA-3 et Tox au détriment d'Ebf1 ou Pax5 (nécessaires à l'engagement B) confirmant ainsi l'accès à une voie de développement « pro-ILC » (Cherrier et al., 2012; Possot et al., 2011).

En lien avec ces observations, X Yu et al ont identifié et isolé une sous-population de progéniteurs de la moelle osseuse nommés α LP sur la base du phénotype suivant : Lin⁻ IL-7R α ⁺ cKit^{lo} $\alpha 4\beta 7$ ⁺ Id2^{lo}. Les α LP sont nécessaires et suffisants à la différenciation de l'ensemble des ILC *in vivo* (cNK et LTi compris) (Yu et al., 2014) et leur émergence à partir du CLP est dépendante des facteurs de transcription Nfil3 et Tox (Tox= *Thymocyte selection-associated HMG bOX protein*) (Klose et al., 2014; Yu et al., 2014).

De par le rôle essentiel du facteur de transcription Id2 dans le développement de l'ensemble des ILC (Boos et al., 2007; Hoyler et al., 2012), il a été proposé comme un marqueur associé au progéniteur commun de l'ensemble de ce lignage. Ainsi, l'utilisation de souris reportrices pour Id2 a permis d'identifier le CHILP dans la moelle osseuse et le foie fœtal chez la souris.

En effet, il a été montré que le CHILP est capable de générer l'ensemble des ILC *in vivo* et *in vitro* à l'exception des cellules NK conventionnelles (Klose et al., 2014).

PLZF est un facteur de transcription dont l'activité est essentielle au développement des lymphocytes iNKT (invariant Natural Killer T cells) (Savage et al., 2008). Le traçage génétique des cellules ayant exprimé PLZF a permis d'établir que la plupart des ILC matures ont exprimé mais n'expriment plus PLZF. Ces observations menèrent à l'identification d'un précurseur commun aux ILC (ILCP) exprimant PLZF et présent dans la moelle osseuse et le foie fœtal chez la souris. L'ILCP PLZF⁺ s'est révélé capable de générer les 3 sous-groupes d'ILC à l'exception des LTi et des cNK à la fois *in vivo* et *in vitro* (Constantinides et al., 2015). Il a été proposé que le potentiel à générer des LTi est perdu de façon concomitante à l'induction de PLZF et d'autres marqueurs d'ILC matures tels que GATA-3 et ROR α .

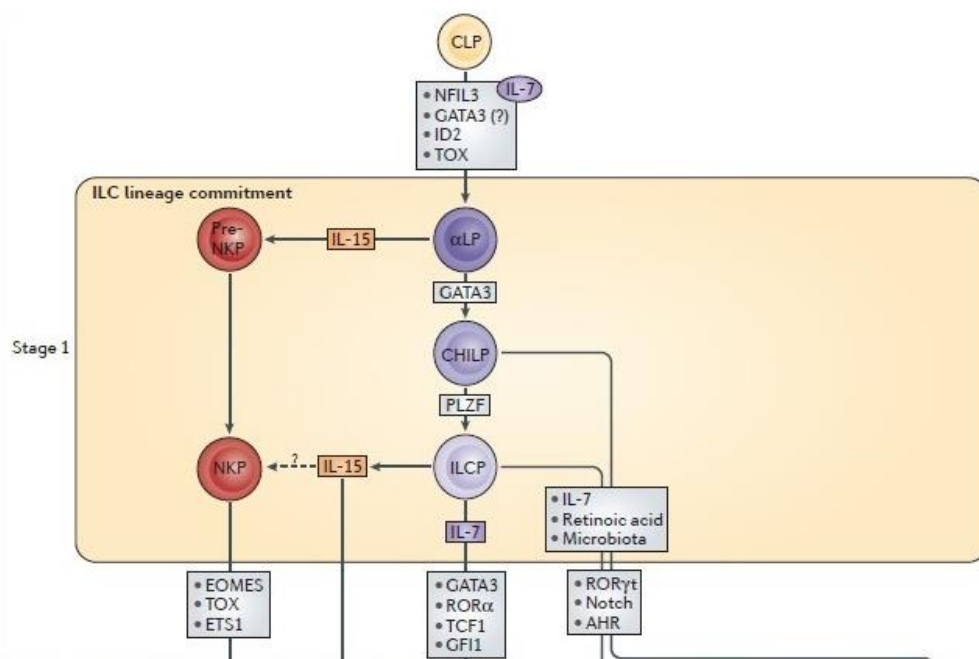


Figure 14 adaptée à partir de (Serafini et al., 2015) : Développement des cellules lymphoïdes innées chez la souris. Les ILC se différencient à partir du CLP (Common Lymphoid Progenitor) de manière dépendante de l'IL-7 et du facteur de transcription Id2. L'expression des facteurs de transcription NFIL3 et TOX sont nécessaires à l'émergence du progéniteur α -LP (α 4 β 7-Lymphoid precursor) des ILC1, ILC2, ILC3 (y compris les LTi) et des cNK. En parallèle, le développement des NK s'effectue à partir d'un progéniteur strictement dépendant de l'IL-15. A partir de l' α -LP, le CHILP (Common Helper ILC progéniteur) a la capacité de générer des ILC1, des ILC2 et des ILC3 (incluant les LTi) mais pas de cNK.

Une fraction du CHILP exprime les facteurs de transcription PLZF et GATA-3 et correspond à l'ILCP (ILC precursor) PLZF⁺. Ce précurseur peut générer des ILC1, des ILC2 et des ILC3 mais pas de cNK ni de LTi.

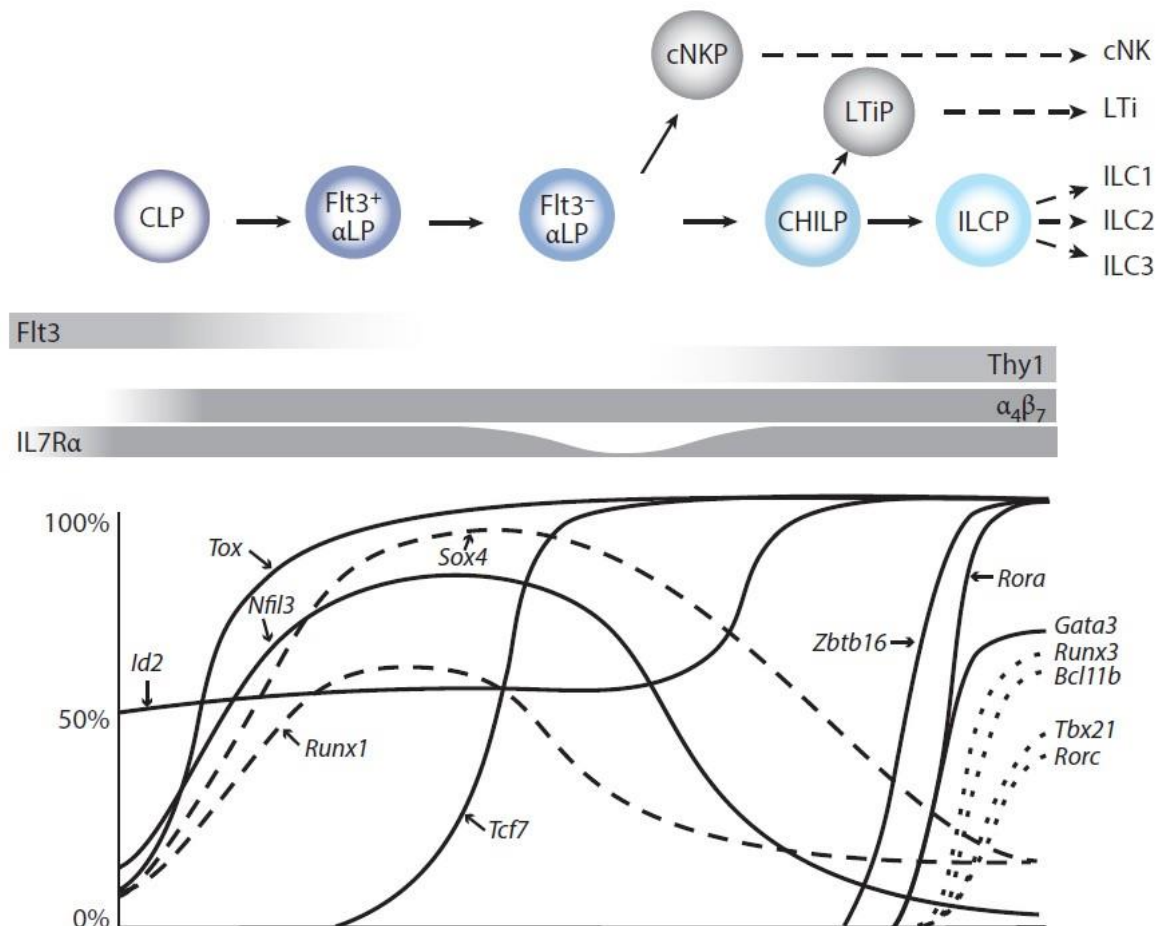


Figure 15 adaptée à partir de (Ishizuka et al., 2016) : Expression des différents facteurs de transcription impliqués dans le développement des ILC. *Id2*: Inhibitor of DNA Binding 2; *Tox*: Thymocyte selection associated high mobility group box; *Nfil3*: Nuclear Factor Interleukin 3 Regulated; *Runx*: 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: $\alpha_4\beta_7$ -lymphoid precursor; cNKP: conventional Natural Killer Progenitor; CHILP: Comme Helper ILC Progenitor. ILCP: Innate Lymphoid Cell Precursor; LTiP: Lymphoid Tissue inducer cell Precursor.

ii. Etape 2 : La diversification des précurseurs des ILC

Les mécanismes responsables de la spécification des ILC sont encore peu connus et pourraient impliquer des facteurs micro-environnementaux tels que les ligands de Notch, certains métabolites (Acide Rétinoïque et ligands de AhR) ou encore la sécrétion de cytokines. Par ailleurs, la succession de signaux de stimulation (signaux 1, 2 et 3) décrite pour la différenciation des lymphocytes T n'est probablement pas entièrement transposable aux ILC. En revanche, l'ILCP pourrait être considéré comme la contrepartie innée des LT naïfs.

1. La différenciation des ILC1

Les facteurs de transcription NFIL3, TOX, T-bet et EOMES jouent un rôle essentiel dans la diversification des ILC du groupe 1.

a. NFIL3 et TOX

L'expression du facteur de transcription NFIL3 est fortement induite lors de la différenciation du CLP en précurseurs ILCP PLZF⁺ (Ishizuka et al., 2016). L'inactivation de NFIL3 impacte fortement le développement des précurseurs des ILC (CICLP) ainsi que la différenciation des NK (EOMES⁺) et des ILC1 non NK (EOMES⁻) (Yu et al., 2014). D'autre part, NFIL3 pourrait induire l'expression des gènes codant EOMES et TOX également impliqués dans la génération de ces cellules (Yu et al., 2014). Il a été démontré que NFIL3 a la capacité de se lier directement au promoteur de Tox et d'induire l'expression de ce dernier (Yu et al., 2014). De ce fait, l'inactivation de NFIL3 et/ou de TOX ont des effets similaires sur la différenciation des ILC1 (Klose et al., 2014; Yu et al., 2014).

b. T-bet et Eomes

Le développement des ILC1 non NK est dépendant de T-bet qui promeut également la production d'IFN γ . Les précurseurs des cNK nommés NKP expriment T-bet et EOMES (Geiger and Sun, 2016) tandis que le précurseur spécifique des ILC1 « non-NK » n'a pas encore été identifié. Cependant une analyse de l'expression de T-bet et Eomes au niveau unicellulaire au sein des populations rares de précurseurs de la moelle faciliterait probablement l'identification des précurseurs des ILC1 non-NK (Serafini et al., 2015).

2. La différenciation des ILC2

Les ILC de type 2 se différencient à partir du CLP via un précurseur restreint situé dans

la moelle osseuse: l'ILC2P. L'ILC2P Lin⁻ Sca-1^{hi} IL-7R α ⁺ Id2⁺ CD25⁺ est caractérisé par sa forte capacité de prolifération en présence des cytokines telles que l'IL-7, l'IL-2 et de l'IL-33 ainsi que par l'expression du facteur de transcription GATA-3 (Tindemans et al., 2014). L'expression du récepteur de haute affinité à l'IL-2 (CD25) permet de le distinguer du CHILP (Klose et al 2014). D'autre part, l'ILC2P de la moelle n'exprime pas le marqueur de maturité KLRG1 ni les gènes codant pour les cytokines de type 2 (Hoyler et al., 2012).

a. GATA-3 et ROR α .

L'expression du facteur de transcription GATA-3 est essentielle au développement de l'ensemble des ILC dites « helper ». Dans le cas des ILC2, le niveau d'expression de GATA-3 conditionne le processus de différenciation des ILC2 ainsi que leur maintien en périphérie (Hoyler et al., 2012; Tindemans et al., 2014). Par ailleurs, l'inactivation de GATA-3 induit une absence totale d'ILC2 et de cellules innées sécrétrices d'IL-5 et d'IL-13 en périphérie (Diefenbach et al., 2014; Wong et al., 2012). GATA-3 joue également un rôle important en collaboration avec ROR α (*RAR Related Orphan Receptor A*) dans la sécrétion des cytokines de type 2 par les ILC2 matures (Wong et al., 2012). Chez les souris déficientes pour ROR α , la proportion et le nombre d'ILC2 sont réduits et l'induction des cytokines de types 2 est diminuée mais pas abrogée en réponse à l'IL-33. Par conséquent et contrairement à GATA-3, ROR α n'est pas essentiel à la sécrétion de cytokines de type 2 médiée par l'IL-33.

GATA-3 n'est pas le seul facteur de transcription nécessaire à la spécification des ILC2. La voie de signalisation passant par Notch induit l'expression de gènes cibles tels que celui codant pour TCF-1 (TCF-1= *T Cell Specific Transcription Factor 1*) induisant la voie de l'IL-7R α , ainsi que l'expression de récepteurs aux alarmines IL-33 et IL-25 (ST2 et IL-17RB respectivement). TCF-1 induit également *Bcl-11b* qui réprime l'expression des gènes « pro-ILC3 » (*Ahr, Rorc, Il-23r*) au profit de gènes pro-ILC2 tels que *Gfi1, Gata3* et *ROR α* (Califano et al., 2015; Serafini et al., 2015; Walker and McKenzie, 2013; Yang et al., 2013; Zhang et al., 2017; Zook and Kee, 2016).

La colonisation de la périphérie par les ILC2P de la moelle osseuse repose sur le maintien de l'expression de CCR9 (récepteur de la chimiokine CCL25) (Hoyler et al., 2012) combiné à la diminution de l'expression CXCR4 (récepteur de la chimiokine CXCL12) (Stier et al., 2017). Il est probable que, de façon similaire aux lymphocytes T, l'expression de CCR9 par les ILC2P

confère un fort tropisme vers la muqueuse intestinale et les tissus lymphoïdes associés (Uehara et al., 2002).

3. La différenciation des ILC3

ROR γ t est le facteur de transcription spécifique aux ILC3. Avant la naissance, l'induction de ROR γ t par les précurseurs α LP a lieu dans le foie fœtal et dans la périphérie chez la souris (Cherrier et al., 2012; Possot et al., 2011). L'extrême rareté des cellules Lin $^-$ ROR γ t $^+$ dans la moelle osseuse suggère que l'induction de l'expression de ROR γ t a lieu essentiellement dans la périphérie chez l'adulte (Possot et al., 2011). Cependant, l'existence d'un progéniteur commun à l'ensemble des ILC3 reste hypothétique chez la souris adulte. La différenciation des ILC3 dans le foie fœtal de la souris se fait en plusieurs étapes marquées par l'expression de l'intégrine α 4 β 7 et du récepteur aux chimiokines CXCR6 et peut être modulée par la voie de signalisation Notch *in vitro* (Cherrier et al., 2012; Possot et al., 2011). En effet à partir d'un précurseur commun Lin $^-$ IL-7R α^+ α 4 β 7 $^-$ ROR γ t $^-$, l'expression du facteur de transcription Id2 ainsi que l'activation de la voie Notch favorise l'émergence d'une population hétérogène de précurseurs Lin $^-$ IL-7R α^+ α 4 β 7 $^+$ ROR γ t $^-$. A partir de cette population hétérogène, l'interruption des signaux provenant de la voie Notch est nécessaire pour garantir l'expression de CXCR6 et de ROR γ t ainsi que l'émergence des ILC3. La voie de signalisation Notch et l'induction subséquente de TCF1 joue également un rôle dans la maturation et la différenciation des ILC3 NKp46 $^+$ en périphérie chez l'adulte (Mielke et al., 2013). Enfin, l'expression d'Ahr (*Aryl Hydrocarbon Receptor*) par les ILC3 est cruciale après la naissance pour leur survie et la sécrétion d'IL-22 (LTi-like, ILC3 NKp46 $^+$). Ainsi, en absence de Ahr, la formation et la maturation des ILF sont compromises et la susceptibilité à *Citrobacter rodentium* est augmentée (Cochez et al., 2016; Lee et al., 2011; Qiu et al., 2012).

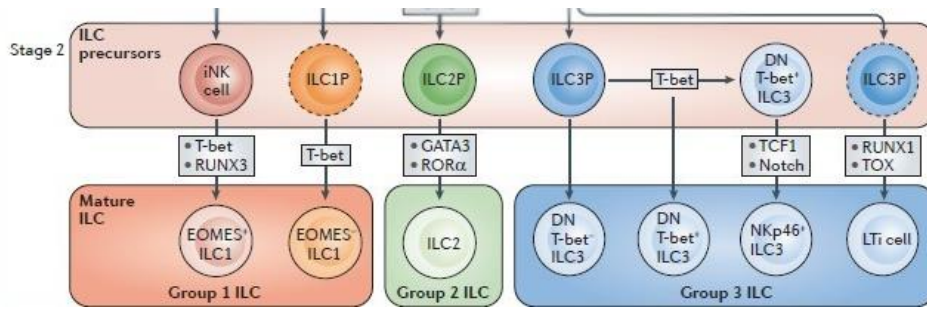


Figure 16 adaptée à partir de (Serafini et al., 2015) : Deuxième étape du développement des ILC : La spécification. Les précurseurs restreints des ILC1 ne sont actuellement pas connus, mais ces derniers pourraient dériver du CHILP de façon dépendante du facteur de transcription T-bet et de l'IL-15. Les ILC2 et les ILC3 dérivent du CHILP de manière dépendante d'Id2 et de l'IL-7. Les ILC2 se différencient à partir de l'ILC2P (ILC2 progenitor) situé dans la moelle osseuse chez la souris adulte. L'émergence de l'ILC2P à partir du CHILP dépend des facteurs de transcription GATA-3 et ROR α . Alors qu'aucun précurseur de type ILC3P n'a été identifié en périphérie, il apparaît que les ILC3 CCR6⁻ (incluant les ILC3 DN et NKp46⁺) se différencient à partir d'un précurseur distinct de celui des LTi (ILC3 CCR6⁺).

d. La plasticité des ILC

Les ILC répondent préférentiellement aux cytokines appartenant à la famille de l'IL-1 (IL-1 α et β , IL-18, IL-33). En effet, l'IL-33 est connue pour activer les ILC2 alors que l'IL-1 β et l'IL-18 activent les ILC1 et les ILC3. L'IL-1 β et l'IL-12 jouent un rôle critique dans l'induction de la plasticité des ILC2 et des ILC3 (Lim et al., 2017).

i. La plasticité des ILC2

Il a été mis en évidence chez l'homme et chez la souris que l'IL-1 β et l'IL-12 pouvaient agir sur les ILC2 au niveau transcriptionnel, et favoriser l'émergence d'un phénotype « ILC1-Like ». Chez l'homme, la stimulation des ILC2 circulantes avec de l'IL-1 β , réprime l'expression des gènes codant ROR α (*rora*) et Bcl11b (*bcl11b*) au profit de gènes à signature ILC1, tels que de *tbx21* (le gène codant le facteur de transcription T-bet) et *il12rb2* (le récepteur à l'IL-12 (Ohne et al., 2016)(Bal et al., 2016).

Ces caractéristiques ont également été observées dans les poumons et l'intestin grêle de patients atteints de Bronchopathie Obstructive Pulmonaire Chronique (COPD) et de la maladie de Crohn respectivement (Lim et al., 2016; Silver et al., 2016).

Chez la souris, l'administration d'IL-1 β et/ou d'IL-12 par voie aérienne induit de façon

concomitante l'expression de T-bet et de l'IL-18R et la diminution de l'expression de GATA-3 et ST2 par les ILC2 du poumon. Ces cellules produisent de l'IFN γ une fois re-stimulées *ex vivo* en présence d'IL-12 ce qui confirme leurs caractéristiques « ILC1-Like » (Bal et al., 2016)

De nombreux articles rapportent que les ILC2 acquièrent un phénotype ILC1 en fonction des stimuli environnementaux. Mais qu'en est-il de la plasticité des ILC2 vers les ILC3 ?

Deux études majeures rapportent que les gènes impliqués dans la différenciation de ces cellules (*bcl11b*, *gata3*, *gfi1*) sont impliqués dans la plasticité des ILC2 vers un phénotype ILC3. Califano et al. étudient en 2015 le rôle du facteur de transcription BCL11b dans la plasticité des ILC2, en utilisant un modèle de souris déficientes en BCL11b traitées à la papaine (protéase allergène activant directement les basophiles et mastocytes) (Califano et al., 2015). Ce traitement réprime l'expression de gènes impliqués dans le maintien et la fonction des ILC2 tels que *gata3*, *st2*, *gfi1* et *rora* et induit l'augmentation de l'expression de *Rorc* et de la sécrétion d'IL-17 et d'IL-22. D'autre part, une étude récente menée par Zhang et al. (Zhang et al., 2017) rapporte que les ILC2 inflammatoires, induites suite à une stimulation par des acariens, expriment fortement le gène *Deltex 1* (un gène cible de la voie Notch) par comparaison aux ILC2 naturelles. Des expériences de cultures *in vitro* rapportent que les ligands de la voie Notch répriment l'expression des gènes codants les récepteurs ST2 (récepteur à l'IL-33 pro-nILC2) et induisent l'expression des gènes codant l'IL-17RB (récepteur à l'IL-25 pro-iILC2) et ROR γ t. La signalisation Notch joue donc un rôle dans la plasticité des iILC2 acquérant un phénotype « ILC3-Like » via l'augmentation de l'expression de gènes pro-ILC3 (*rorc*) tout en permettant le maintien de l'expression de GATA-3. De ce fait, les ILC2 inflammatoires co-produisent de l'IL-13 et de l'IL-17.

En somme, la plasticité des ILC2 est contrôlée par l'environnement tissulaire qui module l'expression de certains gènes responsables de « l'identité » du lignage. Que ce soit chez l'homme ou chez la souris les cytokines IL-12, IL-18, IL-1 β participent à la modulation de la signature ILC2 pour l'acquisition de gènes « pro-ILC1 » ainsi que la sécrétion des cytokines inflammatoires associées. D'autre part, la voie Notch module les gènes « pro-ILC3 » permettant aux ILC2 de co-exprimer les signatures ILC3 et ILC2. La compréhension et la manipulation de la plasticité des ILC2 pourraient avoir un impact bénéfique dans le traitement des maladies chroniques inflammatoires ou l'environnement tissulaire de ces cellules est

profondément bouleversé (Figure 17).

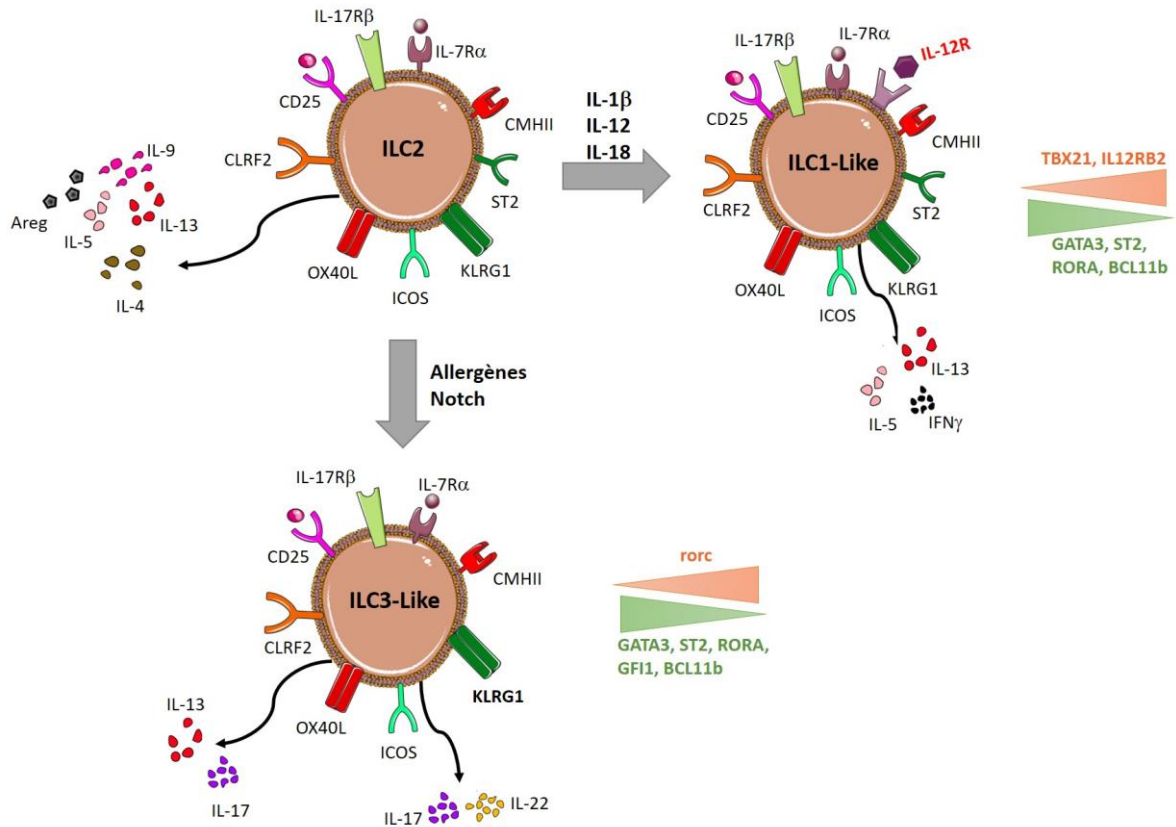


Figure 17 : La plasticité des ILC2. L'IL-1 β , l'IL-12 et l'IL-18 peuvent induire la sécrétion d'IFN γ par les ILC2 qui adoptent alors un phénotype « ILC1-Like ». Cette transition phénotypique est associée à une réduction du niveau d'expression du facteur de transcription GATA-3 au profit de T-bet (codé par *Tbx21*). Certains allergènes peuvent induire la perte totale ou partielle de la signature ILC2 (notamment la sécrétion des cytokines de type 2). Cette plasticité est alors associée à l'augmentation de l'expression du gène *rorc* au détriment des gènes codant pour GATA-3, ST2, BCL11b et GF1 connus pour garantir la stabilité du phénotype ILC2.

Areg: Ampiregulin; CLRF2: Cytokine Receptor Like Factor 2 / receptor of TSLP (Thymic stromal lymphopietin); ST2 (IL-33R): growth STimulation expressed gene; KLRG1: Killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1; iCOS: Inducible T-cell COStimulator; OX40L (TNFRSF4) Tumor necrosis factor receptor superfamily member 4; BCL11b: B-cell lymphoma/ leukemia 11B; B-cell CLL/lymphoma 11B; GF1: Growth Factor Independent 1; *ror*: RAR-related orphan receptor.

ii. La plasticité des ILC3

Les premières investigations ayant mis en évidence la plasticité des ILC3 ont été menées en 2010 par Vonarbourg et al (Vonarbourg et al., 2010). L'utilisation de la technique du traçage génétique des cellules ayant exprimé ROR γ t *in vivo* (*Fate Mapping (Fm)*) a permis de constater que la majorité des ILC NKp46⁺ ROR γ t⁺ du colon, de la rate et des ganglions périphériques ont perdu l'expression de ce facteur de transcription. Les auteurs rapportent que l'acquisition du phénotype « ex-ILC3 » est associée à la capacité de produire de l'IFN γ en fonction des stimuli environnementaux (Klose et al., 2013b; Rankin et al., 2013). Il a été démontré chez l'homme et chez la souris que parmi ces facteurs environnementaux l'IL-12 et l'IL-18 produites par les cellules dendritiques et les macrophages des tissus endommagés favorisent la transition ILC3 \rightarrow ILC1 (Bernink et al., 2015; Buonocore et al., 2010). Dans ce cas de figure les « ex-ILC3 » participent à l'aggravation de la colite expérimentale, induite via la sécrétion d'IFN γ . A ce niveau de plasticité « inter-spécifique » s'ajoute une instabilité de l'expression du récepteur NKp46 par les ILC ROR γ t⁺. En effet, l'utilisation de souris permettant de tracer génétiquement les cellules ayant exprimé NKp46 a permis de montrer que le TGF β supprime l'expression de ce récepteur par les ILC3 alors que les ligands de Notch en stabilisent l'expression (Chea et al., 2016; Verrier et al., 2016; Viant et al., 2016) (Figure 18).

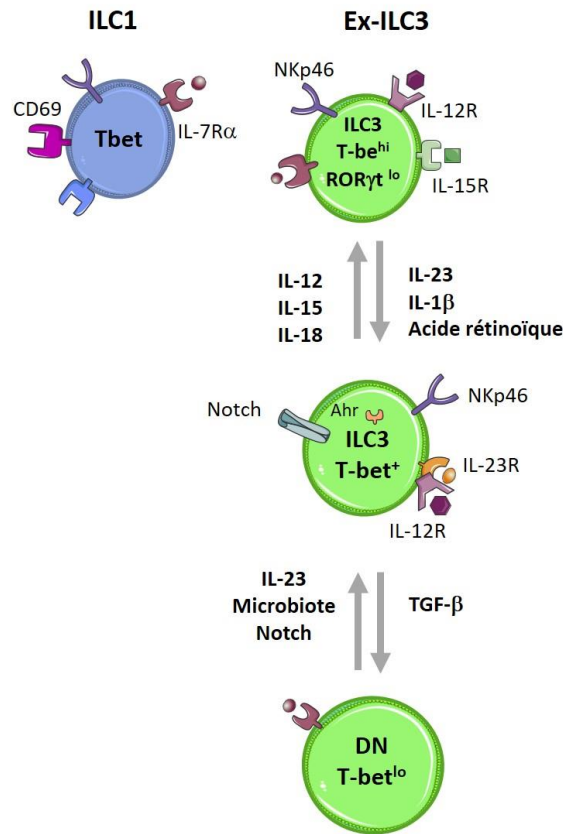


Figure 18 : La plasticité des ILC3. En présence d'un environnement riche en IL-12, IL-15 et IL-1 β , les ILC3 NKp46⁺ acquièrent un phénotype « ILC1-Like » associé à la répression de ROR γ t et à l'induction de l'expression de Tbet. A l'inverse, l'IL-23, l'IL-1 β et l'acide rétinoïque renforcent la stabilité du phénotype ILC3. Enfin, l'IL-23, le microbiote et les ligands de Notch favorisent la différenciation des ILC3 NKp46⁺ à partir des ILC3 DN (CCR6⁻ NKp46⁺) alors que le TGF β joue un rôle antagoniste dans ce processus.

e. La famille des ILC humaines

i. Phénotype

Trois sous types d'ILC ont pu être identifiés chez l'homme sur la base de l'expression de facteurs de transcription et de la production de cytokines (Hazenberg and Spits, 2014). Les ILC humaines sont généralement définies comme exprimant la chaîne α du récepteur à l'IL-7 (CD127) et la lectine de type C CD161 en absence des marqueurs de lignage T (CD3, TCR $\alpha\beta$, TCR $\gamma\delta$), B (CD19), NK (CD16 et CD94), myéloïdes (CD1 α , CD14 et CD123), granulocytaires (Fc ϵ R1 α et CD123), de précurseurs hématopoïétiques (CD34) et des cellules dendritiques plasmacytoïdes (BDCA2 et CD123). Au sein de cet ensemble hétérogène de cellules Lin⁻ CD127⁺ CD161⁺, les ILC2 et les ILC3 sont définies par l'expression de CRTH2 et c-Kit respectivement.

Cependant, la définition et l'identification des ILC1 « non-NK » humaines reste problématique du fait de l'absence de marqueurs spécifiques. A tel point que l'existence même de ces cellules a été remise en cause par une étude publiée récemment (Simoni et al., 2017).

L'utilisation d'un panel de 29 marqueurs sur des cellules pré-enrichies (Lin⁻) à partir d'échantillons de sujets sains et de patients n'a en effet pas permis d'isoler un cluster de cellules cohérent après analyse par cytométrie de masse. Les auteurs ont par conséquent conclu qu'à l'exception notable des ILC1 intra-épithéliales, la plupart des travaux publiés sur les ILC1 humaines concernent en réalité d'autres types cellulaires tels que des cellules NK, des ILC3, des cellules T, des DC ou encore des cellules souches hématopoïétiques. Il est cependant probable que la réalité soit plus nuancée (Bernink et al., 2017).

1. Les ILC1

Les ILC1 humaines sont T-bet dépendantes et en fonction de leur localisation sont caractérisées par le niveau d'expression de la chaîne alpha du récepteur à l'IL-7 (IL-7R α ou CD127), le récepteur naturel cytotoxique (NCR) NKp44 (équivalent de NKp46 chez la souris), le récepteur activateur et inhibiteur CD94 ainsi que la molécule d'adhérence CD56 (Hazenbergh and Spits, 2014). Dans l'intestin, il siège deux populations d'ILC1 non-NK qui se distinguent en fonction du niveau d'expression de CD127. Les ILC intraépithéliales de l'intestin sont CD127^{lo} CD103⁺ CD56⁺ NKp44⁺ et sécrètent de l'IFN γ et de la Perforine, en réponse à l'IL-12 et l'IL-15 (Fuchs et al., 2013). Ces cellules sont également présentes chez la souris au sein des ILC1 CD160⁺ (Figure 5). En revanche, les ILC1 CD127^{hi} sont situées dans la *lamina propria* de l'intestin et n'expriment pas CD56 et NKp44 (Bernink et al., 2013). Ces cellules sécrètent également de l'IFN γ en réponse à l'IL-12 et l'IL-18. En vue des nombreuses similarités existantes entre les ILC1 et les NK, ces dernières ont été classées parmi les ILC de type I. L'expression de marqueurs tels que CD34, c-Kit, CD94 et CD56 permet de définir les stades de différenciation des NK humaines. L'acquisition du potentiel cytotoxique accompagne le passage du stade immature c-Kit⁺ CD56⁺ au stade mature CD56⁺ CD94⁺ CD16^{+/-} (Blom and Spits, 2006).

2. Les ILC3

Les ILC3 humaines sont classées en deux sous-types : Les ILC3 NKp44⁻ (LTi et LTi-Like) et les

ILC3 NKp44⁺. Les LTI ont été mises en évidence chez l'homme au stade fœtal (1^{er} et 2nd trimestre de grossesse) dans le mésentère et les ganglions lymphatiques (Cupedo et al., 2009). Ces cellules ROR γ t⁺ Lin⁻ IL-7R α ⁺ CD4⁻ et sécrétrices d'IL-17 et d'IL-22 induisent l'expression de molécules d'adhérence (VCAM-1, ICAM-1) par les cellules stromales via la signalisation LT β /LT β R de façon similaire à ce qui a été décrit chez la souris au cours du développement des organes lymphoïdes (van de Pavert and Mebius, 2010). Chez l'homme et chez la souris, les ILC3 NCR⁺ se localisent préférentiellement dans les intestins et sécrètent de l'IL-22 suite à leur stimulation avec de l'IL-23, de l'IL-1 β , de l'IL-2 et de l'IL-7 (Hughes et al., 2010; van de Pavert and Vivier, 2016). Les ILC3 humaines expriment le TLR2 (TLR=*Toll Like Receptors*) et sont donc directement sensibles aux déterminants antigéniques de la flore bactérienne (Crellin et al., 2010). De plus, les ILC3 de l'intestin expriment la cytokine LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) régulant la prolifération des cellules épithéliales intestinales (Cella et al., 2009). Les ILC3 NKp44⁻ se différencient *in vitro* en ILC3 NKp44⁺ qui à leur tour peuvent adopter un phénotype « ILC1-Like » sous l'influence d'IL-12 et de façon concomitante à l'induction de T-bet (Bernink et al., 2013).

3. Les ILC2

La majorité des ILC circulantes dans le sang d'un individu sain sont les ILC2 (Mjösberg et al., 2011). Cependant, ces cellules ont également été détectées dans les poumons d'individus sains et se définissent par l'expression du récepteur à la prostaglandine D2 (CRTH2) et du récepteur à l'IL-33 (ST2) (Mjösberg et al., 2011; Monticelli et al., 2011). Les ILC2 humaines expriment GATA-3 et ROR α (Halim et al., 2012; Mjösberg et al., 2012) et sont en partie dépendantes de la voie de signalisation Notch et de TCF-1 pour leur développement. Les ILC2 répondent aux alarmines IL-25, IL-33 et TSLP (Halim et al., 2012; Salimi et al., 2013) par la production de cytokines de type 2 (IL-5, IL-4 et IL-13), d'Amphiréguline et d'IL-9 (Monticelli et al., 2011). Les ILC2 sont retrouvées en grande quantité dans le parenchyme pulmonaire et les lavages broncho-alvéolaires de patients asthmatiques ou ayant subi une greffe de cet organe (Hams et al., 2014). Dans ce contexte inflammatoire riche en TSLP, les ILC2 sont fortement activées et participent à l'aggravation de la maladie (Mjösberg et al., 2011).



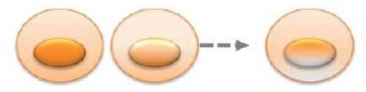
	ILC1			ILC2		ILC3		
	cNK	ieILC1	ILC1	nILC2	iILC2	CCR6+ ILC3	CCR6- ILC3	NCR+ ILC3
Subsets								
Master Regulator	Tbet/ Eomes	Tbet/ Eomes	Tbet	Gata3		Roryt		Roryt Tbet
Surface Markers		Lin- CD127+ C-kit- CRTH2-		Lin- CD127+ C-kit+ CRTH2+		Lin- CD127+ C-kit+ CRTH2- NCR-		Lin- CD127+ C-kit+ CRTH2- Nkp46+/Nkp44+
Activators		IL-12 IL-15 IL-18		IL-25 IL-33 TSLP		IL-23 IL-1β		
Effector cytokines		IFN-γ		IL-4, IL-5 IL-13, IL-9 GMCSF		IL-17A/F IL-22 GMCSF IFN-γ		
Protective Immunity		<i>Toxoplasma gondii</i> <i>Clostridium difficile</i>		Parasites/ Helminths Rhinovirus		<i>Rotavirus</i> <i>Citrobacter rodentium</i> <i>Candida albicans</i>		
Disease		IBD Rheumatoid Arthritis		Asthma Atopic Dermatitis Allergy Obesity		IBD Spondylarthritis Psoriasis Asthma MS		

Figure 19 adaptée à partir de (Eken and Donmez-Altuntas, 2017) : Les ILC humaines. Différents sous-types, fonctions et signatures (transcriptionnelles et cytokiniques) caractérisant les ILC humaines.

ii. Localisation et fonction des ILC Humaines

Les ILC sont des cellules majoritairement tissulaires. Dans les intestins, la majorité des ILC résidentes sont les ILC3 Nkp44⁺ sécrétrices d'IL-22 induisant la production de peptides antimicrobiens, de mucus et d'IL-10 (Cella et al., 2009). L'expression de TLR2 confère aux ILC3 humaines la capacité d'interagir directement avec la flore microbienne en plus de leur sensibilité aux cytokines d'origine myéloïdes. Les ILC1 intestinales CD127^{lo} répondent aux signaux de danger envoyés par les cellules épithéliales en sécrétant de l'IFNγ.

Il a été observé que les ILC1 CD127^{hi} productrices d'IFNγ s'accumulent chez les patients atteints de la maladie de Crohn suggérant que ces cellules pourraient participer à l'aggravation

de la pathologie (Fuchs et al., 2013; Geremia et al., 2011). De plus, le blocage de la voie IL-12/IL-23 (partageant la même sous-unité p40) a permis d'améliorer considérablement l'état de santé des patients résistants au traitement anti-TNF (Sandborn et al., 2012). Chez l'homme, les ILC2 sont présentes en proportion minoritaire dans les intestins, et leur rôle dans la réponse anti-parasitaire n'est pas encore clairement établi contrairement à leur homologues murines (McKenzie et al., 2014).

En revanche, les ILC2 ont été retrouvées en abondance dans les voies respiratoires de patients asthmatiques ou elles ont été caractérisées pour la première fois (Mjösberg et al., 2011; Monticelli et al., 2011; Shikotra et al., 2012). Dans ce cas de figure, TSLP induit la sécrétion de cytokines de type 2 par les ILC2, ces dernières interagissant également avec les mastocytes sécrétant de la prostaglandine D2 qui à son tour renforce l'activation des ILC. Cette boucle de régulation positive de la sécrétion d'IL-13 qui favorise la mise en place d'un terrain fortement inflammatoire (Barnig et al., 2013). Le rôle aggravant des ILC2 a pu être mis en évidence chez la souris grâce à différents modèles d'asthme ou elles favorisent le recrutement des éosinophiles via l'IL-5, la sécrétion d'IgE par les lymphocytes B et le développement de dommages tissulaires via la sécrétion d'IL-13 (McKenzie, 2014).

Les ILC2 et les ILC3 ont également été détectées dans la peau de patients atteints de dermatite atopique ou de psoriasis (Kim et al., 2013; Pantelyushin et al., 2012). Les données publiées chez la souris suggèrent que les ILC2 y joueraient un rôle aggravant (Imai et al., 2013; Roediger et al., 2014) alors que les ILC3 participeraient à la réparation des tissus endommagés en sécrétant de l'IL-22 (McGee et al., 2013). Les ILC3 ont également été détectées dans la peau de patients atteints de psoriasis. Elles pourraient participer à la mise en place de l'inflammation en produisant de l'IL-17 dont le rôle pathogène a été démontré chez la souris (Kim, 2015; Teunissen et al., 2014).

II. DE L'HOMÉOSTASIE A LA PATHOLOGIE

a. Homéostasie des ILC

L'interleukine 7 et l'interleukine 15 sont deux cytokines produites majoritairement par les cellules mésenchymateuse (Martin et al., 2017; Sakata et al., 1990). Du fait que les progéniteurs communs des ILC ainsi que les ILC matures ILC1 EOMES-, ILC2 et ILC3 de la périphérie soient dépendants de l'IL-7 (Artis and Spits, 2015) (cf chapitre I-c), cela en fait une cytokine nécessaire pour leur développement et leur survie. En revanche, parmi les sous-populations d'ILC, les ILC1 EOMES⁺ expriment fortement le récepteur à l'IL-15. L'IL-15 étant cruciale pour la survie et la différenciation des progéniteurs des cNK (NKP) à partir de l' α -LP.

i. Le rôle de l'IL-7 dans le contrôle de la prolifération des lymphocytes T

L'équipe de Charlie Surh a récemment publié une étude sur la régulation de la disponibilité de l'IL-7 des tissus lymphoïdes (Martin et al., 2017). Les auteurs y confirment que les cellules stromales constituent la source majeure d'IL-7 et identifient l'origine hématopoïétique et le rôle essentiel des cellules IL-7R α^+ dans la régulation de la disponibilité de l'IL-7 *in vivo*. Ils observent également que la déplétion des ILC favorise la prolifération induite par la lymphopénie des lymphocytes T et suggèrent que les ILC pourraient réduire la disponibilité de l'IL-7 pour les lymphocytes T via l'expression du récepteur de cette cytokine (IL-7R α ou CD127). En effet, des résultats similaires ont été obtenus pendant la période néonatale (considérée comme lymphopénique) et chez des souris déficientes pour IL-7R α ou JAK3 (Bank et al. 2016) confirmant le rôle essentiel de la voie IL-7R dans ce processus. Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggère que les ILC et les lymphocytes T partagent la même source d'IL-7 dans les tissus lymphoïdes et qu'ils régulent sa disponibilité via l'expression du récepteur à l'IL-7. Notre problématique de recherche étant centrée sur la régulation de l'homéostasie des ILC par le système immunitaire adaptatif, nous utilisons des modèles de souris lymphopéniques (RAG^{-/-} et CD3 ϵ ^{-/-}) pour aborder cette question. Ces observations suggèrent que les ILC pourraient bénéficier d'une augmentation de la disponibilité en IL-7 dans les tissus lymphoïdes dans ces modèles animaux dépourvus de lymphocytes T (CD3 ϵ ^{-/-}) et B (RAG^{-/-}).

ii. L'IL-15 compense l'absence d'IL-7 pour la survie des ILC en périphérie.

Malgré le fait que les progéniteurs des ILC ainsi que les ILC1 non-NK, les ILC2 et les ILC3 se développent de manière dépendante de l'IL-7, l'équipe de Colonna rapporte que l'IL-7 ne serait pas un facteur essentiel à la survie de ces cellules (Robinette et al., 2017). Les auteurs ont rapporté que toutes les sous-populations d'ILC sont présentes au sein de la *lamina propria* de l'intestin des souris *IL-7ra*^{-/-} (Robinette et al., 2017). Ils observent néanmoins que l'inactivation du récepteur à l'IL-7 impacte la composition des ILC sans affecter leur capacité à sécréter des cytokines à l'état d'équilibre et dans le contexte d'une réponse immunitaire à l'encontre *C. rodentium*. Ces observations suggèrent qu'il existe une redondance fonctionnelle partielle entre l'IL-7 et l'IL-15 pour la survie des ILC en périphérie. En effet, l'expression de la chaîne commune aux récepteurs à l'IL-2 et l'IL-15 (CD122) est augmentée dans les ILC intestinales des souris *IL-7ra*^{-/-}. Par ailleurs, l'effet de l'IL-15 sur la survie des ILC déficientes en IL-7R α a été confirmé *in vitro*. Enfin, *in vivo* l'inactivation conjointe des deux cytokines (IL-7 et IL-15) compromet la survie des 3 sous types d'ILC en périphérie. En somme, ces résultats suggèrent que l'IL-15 compense partiellement l'inactivation de la voie de l'IL-7 pour la survie des ILC en périphérie.

b. Sédentarité ou migration pour les ILC ?

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. Deux d'entre elles abordent le rôle des récepteurs de chimiokines CCR7 et CCR9 dans la migration des ILC entre les mLN et la *lamina propria* de l'intestin. Des travaux plus récents ont également démontré l'importance de l'IL-33 et de l'IL-25 dans l'export des ILC2P de la moelle et dans le recrutement des ILC2 inflammatoires vers la *lamina propria* de l'intestin et le poumon respectivement. Enfin, 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.

i. Le rôle des récepteurs de chimiokines CCR7 et CCR9 dans la migration des ILC entre les ganglions mésentériques et l'intestin

L'équipe de David Withers a montré que les ILC2 et les ILC3 de l'intestin grêle sont capables de circuler des intestins vers les mLN grâce à l'utilisation de souris transgéniques pour la protéine ubiquitaire photo-convertible « Kaede ». L'expression de CCR7, le récepteur aux chimiokines CCL19 et CCL21, par les ILC3 « LTi-like », suggère que ce dernier pourrait jouer un rôle dans leur migration de l'intestin vers les mLN. Ce rôle a pu être confirmé grâce à des chimères de moelle osseuse démontrant un déficit du recrutement des « LTi-like » mutées pour CCR7 par rapport à leur contreparties sauvages, à l'état d'équilibre et dans le contexte d'une infection par l'helminthe *Heligmosomoides* (Mackley et al., 2015).

Une analyse détaillée de l'expression des récepteurs de chimiokines CCR7 et CCR9 au sein des ILC murines a révélé des différences de profil d'expression entre sous-types (Kim et al., 2015). Ainsi, CCR7 est détecté à la surface des ILC1 et des ILC3 issues des mLN, de la rate et du colon tandis que CCR9 est exprimé par les ILC2 et les ILC3 T-bet⁻ dans les intestins. Par ailleurs, la diminution significative de la fréquence et du nombre d'ILC1 et d'ILC3 dans les mLN des souris CCR7^{-/-} d'une part et d'ILC2 dans la *lamina propria* de l'intestin des souris CCR9^{-/-} d'autre part suggère un rôle essentiel de ces récepteurs dans la migration vers ces deux compartiments. Enfin, de façon similaire à ce qui a été décrit pour les lymphocytes T (Iwata et al., 2004; Wang et al., 2010), l'expression de CCR9 et de l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ par les ILC1 et les ILC3 peuvent être induites 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 mLN n'est pas impactée en absence de vitamine A.

Nota bene : La question de la migration des ILC entre les mLN et les intestins à également fait l'objet de réflexions au sein de notre équipe de recherche. Cependant, nous n'avons pas été en mesure de détecter l'expression du récepteur CCR7 à la surface des ILC dans ces deux organes, soulevant des doutes concernant les capacités de migration de ces cellules.

ii. Le cas particulier des ILC2

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 antagonise 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 (Kucia et al., 2004; McGrath et al., 1999). Ainsi, l'injection d'IL-33 recombinante favorise la sortie des ILC2P vers la périphérie, suggérant que la migration des ILC2 dépendante de l'IL-33 pourrait constituer un mécanisme complémentaire d'export 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 de migrer vers les poumons suivant un gradient de sphingosine 1 phosphate (S1P) (Huang et al., 2018).

iii. La controverse concernant le statut migratoire

Certains de ces résultats sont en contradiction apparente avec les travaux de l'équipe de Sacha Rudensky (Gasteiger et al., 2015). Après trois mois de parabiose entre souris congéniques, les auteurs observent qu'à l'état d'équilibre, moins de 5% des ILC localisées dans les tissus lymphoïdes (ganglions lymphatiques, rate) ou non (intestins, poumons, foie) de l'hôte provenaient du donneur. Cette proportion minoritaire de cellules était essentiellement constituée d'ILC2 dans les intestins et d'ILC1 dans les glandes salivaires. Les auteurs ont également étudié la circulation des ILC dans un environnement inflammatoire soit en déplaçant les T régulatrices de l'hôte (Foxp3^{DTR}) soit en l'infectant par le parasite *Nippostrongylus brasiliensis*. Alors que la déplétion des Treg n'a pas d'effet sur la recirculation des ILC, une proportion faible mais significative d'ILC2 (10%) provenait de la souris donneuse au sein des poumons de la souris receveuse au cours de la phase chronique de l'infection. En somme, ces travaux rapportent qu'à l'état d'équilibre les ILC seraient majoritairement résidentes des tissus lymphoïdes et non lymphoïdes, cependant une proportion minoritaire mais significative de ces cellules circule en conditions inflammatoires.

c. L'homéostasie tissulaire et mucoale médiée par les ILC

De par leur situation stratégique au sein des tissus, les ILC jouent un rôle particulièrement important dans le maintien de l'homéostasie tissulaire et mucoale. Ces cellules répondent rapidement à leur environnement par la sécrétion de cytokines et de facteurs solubles favorisant la réparation de tissus endommagés.

i. L'épithélium intestinal

L'épithélium intestinal fait partie de la barrière qui constitue l'interface entre la flore microbienne et le « milieu intérieur ». La mise en place et le maintien de l'homéostasie de cette interface repose sur l'activité d'une multitude de types cellulaires aux origines ontogéniques très diverses. Ainsi, le confinement des microorganismes qui colonisent le tractus digestif est assuré au niveau de l'épithélium par le mucus et les peptides anti-microbiens (RegIII γ , β -Défensines) produits respectivement par les cellules caliciformes et les cellules de Paneth. Dans les GALT, les antigènes issus des microorganismes commensaux et/ou pathogènes sont reconnus par les cellules du système immunitaire adaptatif. Cette réponse aboutit à la sécrétion d'IgA hautement spécifiques et affines par les plasmocytes. Ainsi, mucus, peptides anti-microbiens et IgA constituent une barrière dont les propriétés physico-chimiques permettent de repousser et/ou de limiter le passage des microorganismes et des toxines associées dans la circulation systémique. Les ILC3 situées dans la muqueuse contribuent également au maintien de l'étanchéité de cette barrière grâce à la production d'IL-22 qui promeut le renouvellement des cellules souches épithéliales et la sécrétion de peptides antimicrobiens par les cellules de Paneth (Sanos et al., 2011; Sonnenberg and Artis, 2012).

Certaines pathologies sont caractérisées par des dérèglements de la perméabilité intestinale pouvant provoquer des infections bactériennes systémiques ou une inflammation de la muqueuse intestinale associée à des symptômes tels que les douleurs abdominales et la diarrhée. Parmi les pathologies inflammatoires associées à une rupture partielle de la barrière intestinale on retrouve la maladie de Crohn et la Colite Ulcéraire. Dans ce contexte, le

bouleversement du micro-environnement tissulaire associé à l'inflammation favorise l'émergence de sous types d'ILC3 productrices d'IFN γ dont le rôle pathogène sera abordé dans les paragraphes suivants (cf chapitre II-c).

A l'inverse, plusieurs travaux ont mis en évidence un rôle protecteur des ILC3 et de l'IL-22 dans la réparation et le maintien de la barrière intestinale au cours de la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD : *Graft versus Host Disease*). La maladie du greffon contre l'hôte correspond à une réaction immunitaire excessive et dérégulée à la suite d'une greffe de moelle osseuse (Figure 20). Il a été montré que la déplétion des ILC affecte gravement la réparation tissulaire dans un modèle de GvHD aigue chez la souris (Aparicio-Domingo et al., 2015; Lindemans et al., 2015) et que la neutralisation de l'IL-22 augmente la sévérité des symptômes en provoquant une apoptose excessive des cellules épithéliales (Hanash et al., 2012).

Chez l'homme, la prolifération et l'activation des ILC sanguines (expression de CD69) ont été observées suite à la greffe de moelle osseuse. En outre, les auteurs ont observé une augmentation de l'expression de $\alpha 4\beta 7$ et CCR6 par les ILC sanguines dans ce contexte suggérant un potentiel accru de migration au sein des tissus cibles (intestins, foie et peau...) (Munneke et al., 2014).

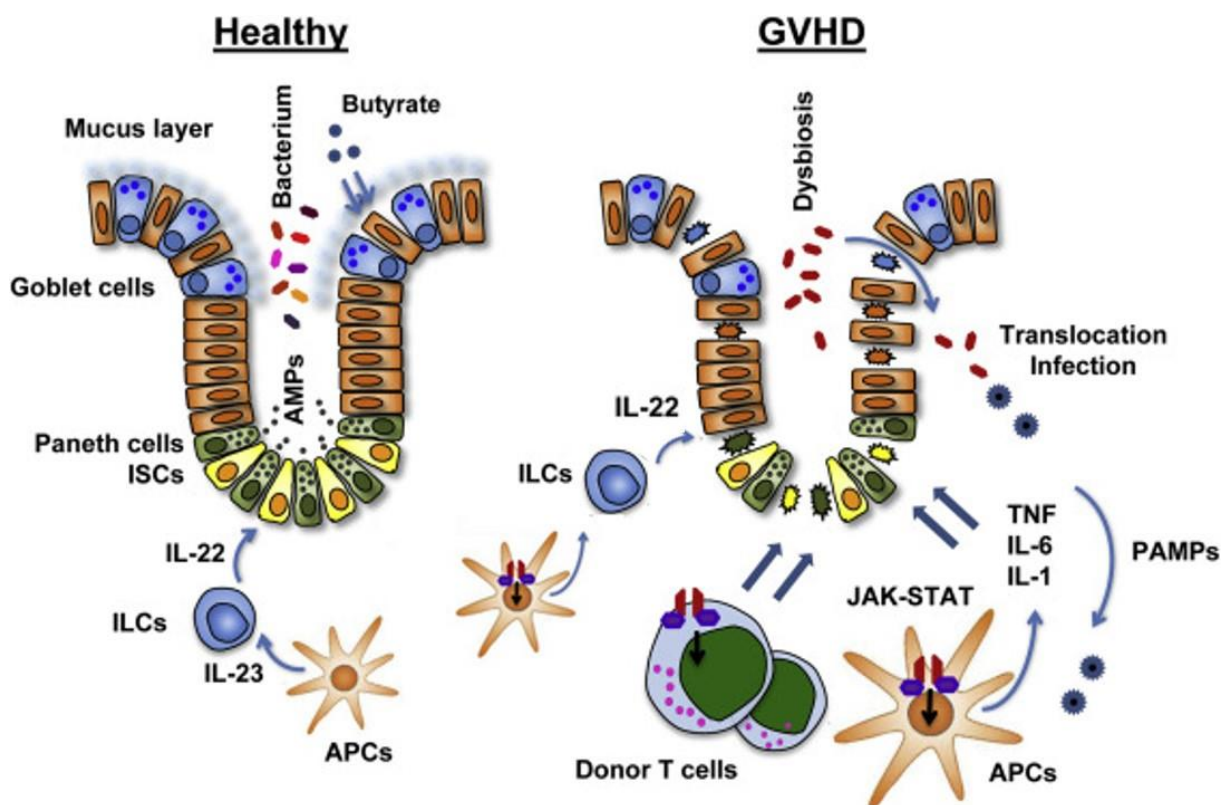


Figure 20 adaptée à partir de (Teshima et al., 2016) : Schéma explicatif de la maladie du greffon contre l'hôte. Les patients souffrant de cancers (Leucémies) ou autres maladies hématologiques (myélodysplasies...) subissent un conditionnement ayant pour conséquence la destruction des cellules hématopoïétiques. Afin de reconstituer un système hématopoïétique sain, les patients (receveurs) subissent une greffe de cellules souches hématopoïétiques (HSC : Hematopoïetic Stem Cells) à partir d'un donneur génétiquement différent (greffe allogénique). De ce fait, les lymphocytes T CD4⁺ du donneur (Lymphocytes T alloréactifs) reconnaissent les tissus ou cellules cancéreuses du receveur comme corps étrangers, induisant une forte réaction immunitaire. Dans ce cas de figure, certains organes (foie, peau, intestin, muqueuses) sont spécifiquement ciblés et subissent de graves dommages dus à la « tempête cytokinique » qui en découle. Cette dernière repose sur la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IFN γ et TNF) par les lymphocytes T et par les cellules dendritiques (IL-1, IL-6) du greffon contre les cellules de l'hôte. En parallèle, les ILC3 du receveur sont activées suite à la sécrétion d'IL-23 et produisent l'IL-22 dont l'activité protège et renforce la barrière intestinale.

Les ILC2 participent également à la protection de l'épithélium intestinal grâce à la sécrétion d'amphiréguline, protéine membre de la famille des facteurs de croissance EGF (*Epithelium Growth Factor*). Dans le contexte d'un modèle d'inflammation intestinale induite par le DSS (*Dextran Sodium Sulfate*), la sécrétion d'alarmines telles que l'IL-33 active les ILC2 sécrétrices d'amphiréguline. L'interaction amphiréguline / récepteur à l'EGF (EGFR) exprimé par les cellules épithéliales jouerait un rôle majeur dans l'induction de la production de mucus

par les cellules caliciformes du colon et dans le maintien des jonctions serrées (via la Claudine 1) renforçant ainsi la barrière intestinale (Monticelli et al., 2015). En revanche, malgré le rôle protecteur connu des cytokines de type 2 (produites par les TH2 et les ILC2) dans la GvHD (Bruce et al. JCI, 2017), le rôle de l'amphiréguline n'a pas encore été mis en évidence dans ce contexte (Blazar et al., 2012; Konya and Mjösberg, 2015).

ii. L'épithélium respiratoire

L'épithélium respiratoire remplit deux fonctions essentielles: celle d'une barrière physique contre les pathogènes et celle de facilitateur d'échanges gazeux au niveau des alvéoles. La fonction respiratoire est par conséquent affectée lorsque l'intégrité de l'épithélium est compromise par les infections virales aiguës, l'asthme ou encore les allergies respiratoires.

1. ILC2 et épithélium respiratoire

Le rôle aggravant des ILC2 dans l'hyper réactivité des voies respiratoires a été mis en évidence dans un modèle murin d'asthme aiguë causé par une infection virale (virus de la grippe A de type H3N1). En effet, les auteurs démontrèrent que l'expansion rapide des ILC2 ainsi que la sécrétion d'IL-13 de façon dépendante de l'IL-33 consécutives à l'infection virale étaient nécessaires et suffisantes pour provoquer une hyperactivité aiguë des voies respiratoires (Chang et al. 2011). Cependant, il a également été montré que la production d'amphiréguline par les ILC2 joue un rôle dans le remodelage et la réparation tissulaire du poumon dans un modèle d'infection virale H1N1 chez la souris (Monticelli et al., 2011). Ainsi, il apparaît que les ILC de type 2 peuvent à la fois aggraver les symptômes de l'hyperactivité des voies respiratoires en produisant des cytokines de types 2 tout en participant à la réparation des tissus endommagés par l'inflammation et/ou l'agent infectieux via la production d'amphiréguline (Chang et al. 2011) (Monticelli et al., 2011).

2. Les ILC3 sécrétrices d'IL-22 participent à la protection de l'épithélium respiratoire

L'IL-22 a plusieurs effets sur l'épithélium du poumon: la production de peptides antimicrobiens comme la lipocaline 2 et la bêta-défensine 2, la prolifération et la réparation

tissulaire tandis que l'IL-17 induit le recrutement de neutrophiles et de granulocytes (Aujla et al., 2008). L'IL-22 peut entrer en synergie avec l'IL-17 pour induire la production de G-CSF, d'IL-6 et de mucus (Eyerich et al., 2017). La combinaison entre IL-22 et IL-17 peut aussi induire les MMP (*Matrix Metallo Proteases*) qui jouent un rôle dans la physiopathologie de l'emphysème (Eyerich et al., 2017). Cependant, l'IL-22 produite par les ILC pourrait participer à la protection contre *Pseudomonas aeruginosa* induite par *Candida albicans* (Mear et al., 2014) en stimulant la réparation de l'épithélium. La production d'IL-22 par les ILC3 a également été rapportée dans des modèles murins d'infections par *Klebsiella pneumoniae* (Xu et al., 2014) et *Streptococcus pneumoniae* (Van Meale et al. Infect Dis. 2014) suggérant un rôle protecteur à la fois au niveau de la réparation tissulaire et de la réponse anti-microbienne.

iii. Le thymus

Les cellules épithéliales thymiques sont divisées en deux catégories selon leur localisation : les cellules épithéliales corticales (CTEC : *Cortical Thymic epithelial cells*) et les cellules épithéliales médullaires (mTEC : *Medular Thymic epithelial cells*). Ces cellules jouent un rôle essentiel dans la différenciation, la survie et la sélection des lymphocytes T et peuvent être détruites ou endommagées suite à une irradiation. Il a été rapporté que les ILC3 CD4⁺ CCR6⁺ NKp46⁻ ou « LTI-like » participent au développement et à la maturation des mTEC (Rossi et al. 2007). Par ailleurs, le rôle protecteur de l'IL-22 dans la régénération des épithélia intestinaux et pulmonaires suggère que les « LTI-like » résidentes du thymus et productrices de cette cytokine pourraient participer à la régénération de ce tissu après irradiation. Cette hypothèse a été testée chez des animaux déficients en IL-22 (Dudakov et al., 2012) au sein desquels un bouleversement à très long terme de la composition des cellules épithéliales thymiques (TEC) et non-épithéliales thymiques (cellules endothéliales, fibroblastes) a été observé après irradiation. Par ailleurs, une augmentation de la sécrétion d'IL-22 dépendante du facteur de transcription ROR γ t a été observée dans le thymus des souris après irradiation. Enfin, une augmentation de la fréquence des LTI RANKL⁺ favorisant la maturation des mTEC (Rossi et al., 2007) a été constatée suggérant que les ILC3 pourraient jouer un rôle double dans la restauration de l'épithélium thymique. Enfin, le rôle de l'IL-22 dans le rétablissement de la thymopoïèse a été confirmé chez des souris irradiées puis traitées à l'IL-22 recombinante. Ce

traitement induisait à la fois une augmentation de la cellularité du thymus et la prolifération des TEC, renforçant l'idée d'une coopération entre ILC3 productrices d'IL-22 et cellules épithéliales dans la régénération thymique (Dudakov et al., 2012).

iv. Le tissu adipeux

L'inflammation du tissu adipeux blanc, constituant la source la plus importante d'apport en triglycérides, est associée au développement de l'obésité. Le tissu adipeux brun est composé de nombreux récepteurs UCP1 (*UnCoupling Protein 1*) transformant l'énergie en chaleur par oxydation mitochondriale des acides gras et contribue à la diminution de la quantité de triglycéride (Saely et al., 2012). D'autre part, les adipocytes dits « Beiges » se développent au sein du tissu adipeux blanc en réponse à divers stimuli (Figure 21). Des travaux effectués chez la souris rapportent que les ILC2 résident dans le tissu adipeux blanc à l'état d'équilibre et que celles-ci favorisent la thermogenèse, un phénomène également appelé « *Beiging* » (Lee et al., 2015) (Molofsky et al., 2015; Qiu et al., 2014). En effet, il a été observé que l'obésité chez l'homme et la souris est associée à une diminution de la fréquence des ILC2 au sein des tissus adipeux blancs (Brestoff et al., 2015). Par ailleurs, le traitement de souris sauvages avec de l'IL-33 recombinante (alarmine activatrice des ILC2) réduit l'accumulation des graisses et augmente les dépenses caloriques. L'ensemble de ces travaux a permis d'identifier un mécanisme d'action des ILC2 dans l'homéostasie du tissu adipeux:

- L'IL-33 induit la sécrétion d'IL-5 par les ILC2, en résulte le recrutement et l'activation des éosinophiles qui à leur tour produisent de l'IL-4, cytokine activatrice des macrophages activés de façon alternative (M2).
- La production de Norépinephrine par ces derniers pourrait directement agir sur les progéniteurs des adipocytes, induisant ainsi leur prolifération et différenciation en adipocyte beige (Lee et al., 2015). De plus, la Norépinephrine augmenterait l'expression des récepteurs UCP1 par les adipocytes beiges, contrant ainsi la prise de poids (Brestoff et al., 2015). Enfin, les ILC2 peuvent agir directement sur les adipocytes beiges via la production d'enképhaline (Brestoff et al., 2015).

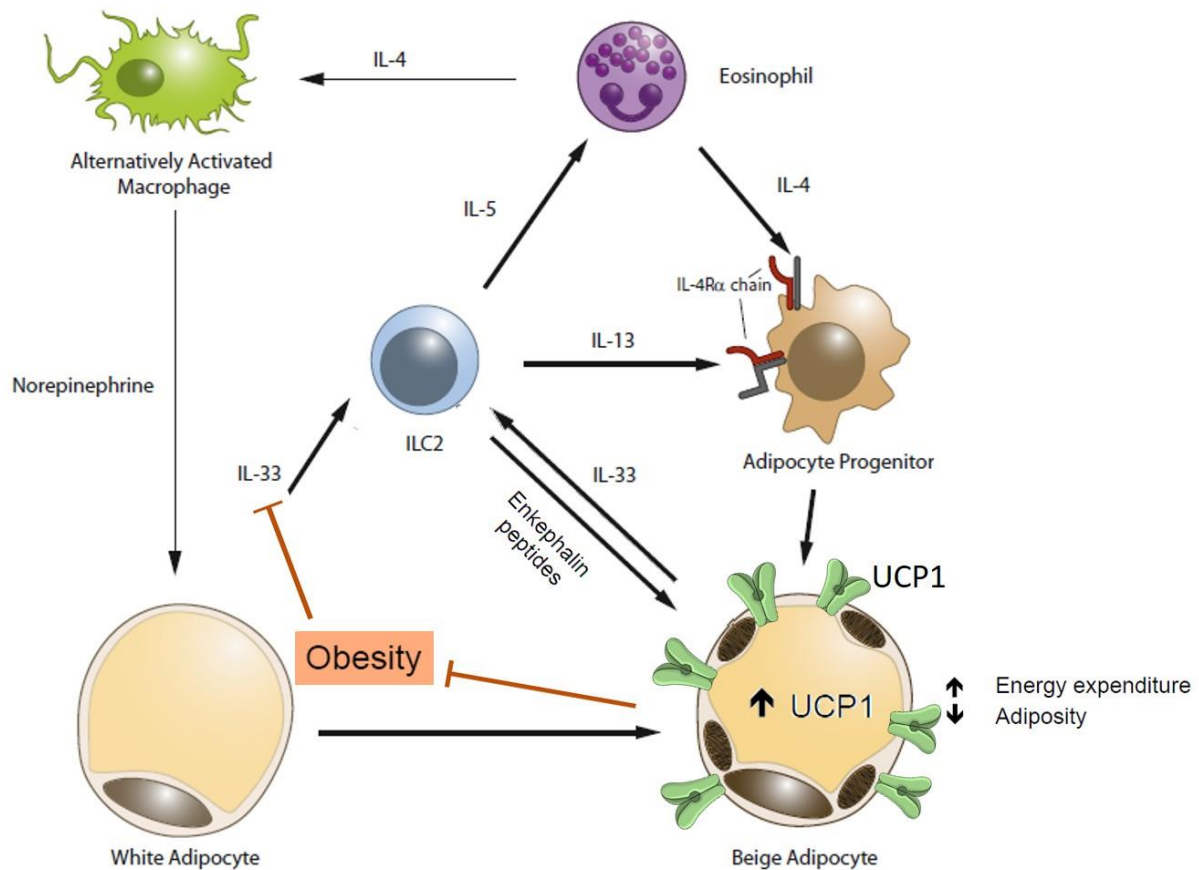


Figure 21 adaptée à partir de (Brestoff et al., 2015; Flach and Diefenbach, 2015) : Le rôle des ILC2 dans le « Beiging » du tissu adipeux blanc. L'IL-33 endogène ou exogène induit la production de cytokines de type 2 par les ILC (IL-5, IL-13, IL-4). L'IL-5 produite par les ILC2 recrute les éosinophiles qui à leur tour activent les macrophages alternatifs via la sécrétion d'IL-4. Ces derniers produisent de la norépinephrine stimulant les adipocytes blancs à exprimer les récepteurs UCP1 : c'est le « beiging ». D'autre part, les ILC2 activées agissent directement sur les progéniteurs des adipocytes et sur les adipocytes beiges via la production d'IL-13 et d'énképhalines. Ces deux facteurs stimulent la dépense énergétique, l'expression de récepteurs UCP1 et réduisent l'accumulation des graisses à long terme.

d. ILC et microbiote

i. Le rôle du microbiote dans le développement de l'immunité muqueuse

1. Définition du microbiote intestinal

La peau et le tube digestif sont colonisés par un ensemble de bactéries, virus, parasites et champignons (10^{14} micro-organismes) qui constituent le microbiote. Dans le tube digestif, le microbiote participe à la dégradation des macromolécules alimentaires et fournit des vitamines et autres nutriments essentiels à l'organisme. Au niveau de la muqueuse intestinale,

les antigènes et les motifs moléculaires associés au microbiote stimulent constamment les cellules immunitaires localisées dans la *Lamina propria* de l'intestin. Ainsi, le microbiote et les métabolites associés jouent un rôle essentiel dans le développement et la fonction d'une multitude de cellules du système immunitaire (Figure 22).

2. Le microbiote active le système immunitaire intestinal

L'interaction entre le microbiote et le système immunitaire permet de contrôler l'exposition aux bactéries et réduit les risques d'agression par les pathogènes. L'épithélium intestinal est constitué d'une monocouche de cellules dont la cohésion est assurée par les jonctions serrées. Cette monocouche quasiment hermétique est recouverte d'une couche de mucus composée de glycoprotéines, de peptides antimicrobiens et d'IgA dont l'épaisseur varie en fonction de la localisation. Cet ensemble constitue une barrière physique contrant l'entrée des microorganismes dans la circulation sanguine (Kawamoto et al., 2014)(Bermon et al., 2015; Britanova and Diefenbach, 2017).

La majorité des ILC résidentes de la *Lamina propria* de l'intestin sont les ILC3 NKp46⁺ sécrétrices d'IL-22. A l'état d'équilibre, les cellules dendritiques et les macrophages CX3CR1⁺ interagissent directement avec le microbiote. Ces cellules effectuent un échantillonnage des microorganismes via la projection de leurs dendrites à travers les cellules épithéliales. L'activation des DC et des macrophages via les TLR induit la sécrétion d'IL-23 (Klose and Artis, 2016). L'IL-23 active la production d'IL-22 par les ILC3 pour stimuler les cellules épithéliales à produire des peptides anti-microbiens. De plus, au sein des plaques de Peyer et des ILF, les lymphocytes B produisent des IgA spécifiques des bactéries échantillonnées. Ainsi, contrairement aux DC, les ILC3 sont stimulées indirectement par le microbiote (Eberl and Lochner, 2009; Spits and Cupedo, 2012).

Outre l'impact de la flore microbienne sur les ILC, les lymphocytes T_H17 et T_H1 sont activés par les DC migratoires CD103⁺ afin d'induire une réponse immunitaire spécifique contre les bactéries commensales et pathogènes. Les DC migratoires CD103⁺ jouent également un rôle essentiel dans la différenciation des Tregs en périphérie, ces dernières favorisent à leur tour la diversité bactérienne et participent à la tolérance alimentaire (Hadis et al., 2011; Kawamoto et al., 2014). Ainsi, la symbiose entre les microorganismes commensaux et le système

immunitaire mucosal est à la base de l'homéostasie intestinale. Toute rupture, déficience ou déséquilibre affectant un ou plusieurs des acteurs impliqués aboutit à ce qui a été nommé la « dysbiose ».

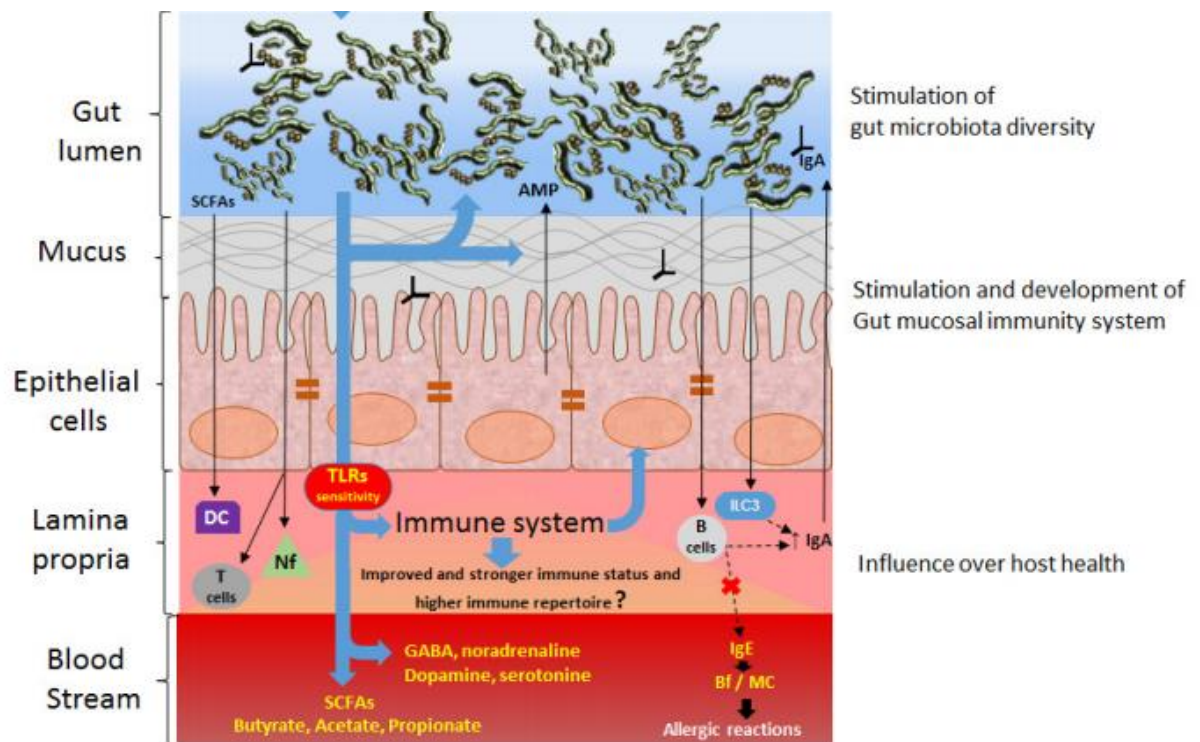


Figure 22 (Bermon et al., 2015): Interaction entre le microbiote intestinal et le système immunitaire.

La première interface entre circulation sanguine et lumière intestinale consiste en une barrière physique constituée par une monocouche de cellules épithéliales recouvertes de mucus. La deuxième interface comprend le système immunitaire intestinal situé dans la *Lamina propria* de l'intestin. Les tissus lymphoïdes associés à la muqueuse intestinale (GALT= Gut Associated Lymphoid Tissues) sont le siège d'une collaboration étroite entre cellules dendritiques, macrophages, ILC et lymphocytes B et T pour lutter contre les pathogènes et maintenir les commensaux à bonne distance. Cellules dendritiques et macrophages sont directement activés par la flore intestinale via les TLR. Ces cellules sont ensuite relayées par les lymphocytes innés et adaptatifs impliqués dans le maintien de la diversité bactérienne et l'étanchéité de la barrière intestinale. Les ILC3 et les plasmocytes participent activement à ce processus via la sécrétion d'IL-22 et d'IgA respectivement.

3. Le rôle du microbiote dans le développement du système immunitaire intestinal

L'utilisation de modèles murins exempts de microorganismes « *Germ-Free (GF)* » a permis d'établir que le microbiote joue un rôle dans le développement de certaines structures lymphoïdes associées à l'intestin. En effet, en absence de bactéries commensales, les follicules

lymphoïdes isolés (ILF) dits « matures » sont absents, les centres germinatifs sont peu nombreux dans les plaques de Peyer, la sécrétion d'IgA et de peptides antimicrobiens sont diminuées (Hooper, 2004; Sanos et al., 2009) et les mLN sont de plus petite taille (Bauer et al., 1963; Macpherson et al., 2001; Pollard and Sharon, 1970).

D'autre part, certaines études démontrent que l'absence de microbiote a un impact sur le développement des lymphocytes T_H17 et des $T CD4^+ Foxp3^+$. Les lymphocytes T_H17 représentent une population abondante au sein de la *lamina propria* de l'intestin. Ces cellules sécrétrices d'IL-17 jouent un rôle dans le développement des maladies auto-immunes et sont fortement impactées au sein des souris *GF* et/ou de souris dont la flore commensale est dépourvue de SFB (*Segmented Filamentous Bacteria*) (Ivanov et al., 2008). Ainsi, la colonisation de souris *GF* avec SFB (*Segmented Filamentous Bacteria*) restaure le développement des lymphocytes T_H17 via la production d'IL-23 et d'IL-6 par les DC de la *Lamina propria* (Gaboriau-Routhiau et al., 2009; Ivanov et al., 2009). En outre, Weiss et al rapportent en 2012 que la proportion de Treg induites est fortement diminuée dans la *Lamina propria* du colon de souris *GF*. La recolonisation de ces souris avec une souche bactérienne appartenant à la famille de *Clostridium* favorise l'émergence de ces cellules. Ainsi, la diversité des espèces bactériennes constituant la flore microbienne conditionne la différenciation des Tregs capables de supprimer l'activité des lymphocytes $T CD4^+$ effecteurs contre les bactéries commensales (Atarashi et al., 2011; Weiss et al., 2012).

Il existe donc une action réciproque du système immunitaire (T_H17 , ILC3, lymphocytes B) sur la diversité microbienne d'une part et du microbiote sur l'organogenèse des tissus lymphoïdes tertiaires et la différenciation de populations immunes essentielles au maintien de l'homéostasie (Treg et T_H17) d'autre part.

ii. Impacte du microbiote sur le développement et la fonction des ILC

Les ILC (plus particulièrement les ILC3) constituent 5 à 10% des lymphocytes de la *Lamina propria* de l'intestin et jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie intestinale. Des changements importants dans la composition de ces cellules ont été observés après la naissance et au moment du sevrage chez la souris et suggèrent que la colonisation du

tractus digestif pas les bactéries commensales joue un rôle dans la différenciation, la survie et/ou la fonction de ces cellules.

1. Développement

Plusieurs équipes ont mené des études indépendantes afin de tester cette hypothèse à l'aide de modèles de souris axéniques (*Germ Free* ou traitées aux antibiotiques). Certains de ces travaux montrent que la diminution de la charge bactérienne dans la lumière intestinale résulte en une diminution des ILC3 NKp46⁺ tandis que les ILC3 CCR6⁺ NKp46⁻ (LTi) ne sont pas affectées (Sanos et al., 2009; Satoh-Takayama et al., 2008b; Vonarbourg et al., 2010). Cependant, d'autres travaux rapportent que les proportions d'ILC3 NKp46⁺ et LTi restent inchangées en absence de bactéries commensales (Bouskra et al., 2008; Reynders et al., 2011; Sawa et al., 2011). En ce qui concerne les ILC1 et les ILC2, plusieurs études rapportent qu'elles se développent indépendamment de la colonisation bactérienne (Fuchs et al., 2013; Ganal et al., 2012; Monticelli et al., 2011), cependant le nombre d'IEL1 (ILC1 intra-épithéliales) est diminué chez les souris axéniques (Fuchs et al., 2013). En outre, deux études indépendantes démontrent que l'expression de l'IL-7 est diminuée dans les intestins des souris axéniques (GF ou traitées aux antibiotiques). Or, cette cytokine est nécessaire au développement et à la survie de l'ensemble des ILC et à la stabilité de l'expression du facteur de transcription ROR γ t (Shalapour et al., 2010; Vonarbourg et al., 2010). Cette diminution peut-elle rendre compte des réductions en nombre d'ILC3 NKp46⁺ et d'IEL1 observées dans certains des travaux cités précédemment (Fuchs et al., 2013; Sanos et al., 2009; Satoh-Takayama et al., 2008b; Vonarbourg et al., 2010)? Si tel est le cas, comment expliquer que les ILC2 ne soient pas elles aussi affectées par la diminution en IL-7 ?

2. Fonction

Bien que l'impact réel du microbiote sur le développement des ILC reste sujet à controverse, plusieurs travaux ont mis en évidence un lien entre l'activité des ILC3 et la colonisation par les bactéries commensales. Certains observèrent une diminution de la sécrétion d'IL-22 par les ILC ROR γ t⁺ de la *lamina propria* de l'intestin (Sanos et al., 2009) tandis que d'autres constatèrent à l'inverse une augmentation de l'activité de ces cellules chez des souris axéniques (Sawa et al., 2011). Dans ce dernier cas, l'augmentation de la production d'IL-22 par les ILC3 est la conséquence de la diminution de la sécrétion d'IL-25 par les cellules

épithéliales de l'intestin résultant en une augmentation de la production d'IL-23 par les DC (Sanos et al., 2009; Sawa et al., 2011). Par ailleurs, l'analyse transcriptomique des ILC issues de souris traitées aux antibiotiques ou *GF* a permis d'identifier des « sous-cluster » d'ILC dont la signature est significativement impactée par le microbiote, révélant ainsi un niveau de complexité supplémentaire dans la biologie des ILC (Gury-BenAri et al. 2017). Il a récemment été démontré que les ILC3 sont activées de façon précoce au cours de la vie par les bactéries commensales qui colonisent l'intestin et que le développement et la mise en place des réponses adaptatives au microbiote suppriment indirectement leur activité (Mao et al., 2018). Nous aborderons dans ce travail de thèse, un cas particulier d'interaction entre microbiote et ILC qui a lieu en absence d'une partie de la réponse adaptative avant et après le sevrage (cf Résultats).

e. Les ILC jouent un rôle dans la réponse aux pathogènes

i. Réponse anti-virale

Le rôle des cNK dans la défense anti-virale et anti-bactérienne a été mis en évidence par de nombreuses équipes (Lodoen and Lanier, 2006). Les ILC1, ayant des caractéristiques semblables représentent également une population cellulaire à fort potentiel pour la réponse innée de type 1 contre les microorganismes tels que les virus et les bactéries (Fuchs, 2016). Récemment, Weizman et son équipe ont rapporté que lors de l'infection de souris sauvages et lymphopéniques avec le virus MCMV (*Murine cytomegalovirus*), les premières cellules à répondre à l'infection par la sécrétion d'IFN γ sont les ILC1 suivies plus tardivement par les cellules cNK (Weizman et al., 2017). La présence des ILC1 au site d'infection et l'étroite collaboration avec les cellules dendritiques productrices d'IL-12 fournissent à ce stade de l'infection une source d'IFN γ rapidement mobilisable.

Les virus de l'immunodéficience humaine et simienne (HIV et SIV) sont des rétrovirus responsables du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) se traduisant par une immuno-suppression (diminution drastique des lymphocytes T CD4⁺) ainsi qu'une perte de l'intégrité de la barrière intestinale, rendant les patients fortement susceptibles aux infections. Sur la base des similarités fonctionnelles entre les lymphocytes T effecteurs et les

ILC dans l'homéostasie intestinale et la réparation tissulaire (cf chapitre II-a), plusieurs équipes ont étudié le devenir des ILC dans le contexte d'une infection virale causée par HIV ou SIV. Une première étude menée chez les macaques révèle que les ILC3 sécrétrices d'IL-17 et d'IL-22 diminuent drastiquement en nombre une semaine après l'infection par le virus SIV et plus tard durant la phase chronique (Reeves et al., 2011). En 2016, Kløverpris et al rapportent que le pourcentage des trois sous-types d'ILC diminue drastiquement dans la circulation sanguine (mort par apoptose) 7 à 14 jours après infection et ce, même après traitement antirétroviral, alors que les ILC résidentes de l'intestin et des amygdales ne sont pas affectées (Kløverpris et al., 2016). D'autre part, les ILC circulantes et persistantes de la phase chronique expriment CD69, un marqueur d'activation qui pourrait être induit en réponse à l'infection alors que les ILC3 NKp44⁺ résidentes des amygdales secrètent moins d'IL-22, de TNF- α et de GM-CSF que chez les sujets sains. Ainsi, l'infection par HIV a un impact sur le nombre d'ILC circulantes lors de la phase aiguë alors que les ILC résidentes des tissus sont relativement moins impactées.

ii. Réponse anti-bactérienne

1. Le rôle des ILC1 dans la protection contre *Clostridium difficile* et *Salmonella typhimurium*

Dans un modèle murin d'infection par l'entérobactérie pathogène *Clostridium difficile*, l'équipe d'Eric Pamer a pu démontrer qu'en absence de système immunitaire adaptatif la réponse innée reposant sur T-bet et l'IFN γ fournit une protection efficace et rapide contre le pathogène (Abt et al., 2015). L'observation que les souris lymphopéniques dépourvues d'ILC (Rag2^{-/-} Il2r γ ^{-/-}) succombaient plus rapidement à l'infection que les souris Rag2^{-/-} pointait vers un rôle clef des ILC dans la protection contre *C. difficile*. L'amélioration des scores cliniques obtenus à la suite d'un transfert adoptif d'ILC provenant de souris Rag2^{-/-} suggère en effet que ces cellules sont suffisantes pour protéger contre *Clostridium difficile*. L'importante mortalité observée chez les souris Rag2^{-/-} Tbx21^{-/-} (déficientes en T-bet) permet d'identifier les ILC1 sécrétrices d'IFN γ comme la sous classe d'ILC principalement responsable de la protection. Cependant, la sécrétion d'IL-12 par les DC en réponse à l'infection favorise les phénomènes de plasticité entre les différents sous-types d'ILC (cf. paragraphe I-d). Ainsi, sous l'effet de l'IL-12, les ILC3 répriment l'expression de *Rorc* et induisent celle de *Tbx21* pour adopter un

phénotype d'ILC1-Like productrices d'IFN γ . Ces « ex ILC3 » participent également à la réponse innée contre *Salmonella typhimurium* (Klose et al., 2013b). Enfin, les ILC1 intra épithéliales occupent une position stratégique pour limiter le passage des bactéries pathogènes dans la circulation systémique et limiter la gravité de la réaction inflammatoire (Fuchs et al., 2013).

2. La réponse anti-bactérienne des ILC3, le rôle de l'IL-22 et de l'IL-17

L'IL-22 joue un rôle important dans le maintien et la réparation de la barrière épithéliale intestinale à l'état d'équilibre et suite aux infections par des bactéries entéro-pathogènes telles que *Citrobacter rodentium* (équivalent de l'*Escherichia coli* entéro-pathogène chez l'homme) (Wolk et al., 2004; Zheng et al., 2008). La production d'IL-22 par les ILC est restreinte aux ILC de type 3 ILC3 NKp46⁺ et LTi-like (ILC3 NKp46⁻ CCR6⁺). Le rôle protecteur des ILC3 a été mis en évidence chez des souris immunodéficientes *Rag2^{-/-} Il2ry^{-/-}* dépourvues d'ILC et de système immunitaire adaptatif (Sato-Takayama et al., 2008b; Sonnenberg and Artis, 2012, 2015; Sonnenberg et al., 2012). Ces animaux perdent du poids et succombent rapidement à l'infection par *C.rodentium* tandis que les souris seulement dépourvues de système immunitaires adaptatif (*Rag2^{-/-}*) résistent. Ces observations suggèrent que les ILC constituent une source suffisante d'IL-22 pour garantir une protection efficace contre cet entéro-pathogène en absence de système immunitaire adaptatif.

La même démarche a été utilisée pour déterminer le rôle des ILC dans la protection contre *Streptococcus pneumoniae*. Dans les poumons des souris infectées, les ILC3 CCR6⁺ constituaient la source majeure d'IL-22 en absence de système immunitaire adaptatif. Les auteurs proposèrent donc que la stimulation des cellules épithéliales pulmonaires par l'IL-22 induit la sécrétion de peptides antimicrobiens et promeut la réparation tissulaire pour freiner l'intrusion du pathogène (Van Maele et al., 2014).

Il a été rapporté que l'IL-17A intervient dans la réponse contre la bactérie commensale opportuniste *Klebsiella Pneumoniae* via la régulation du niveau de G-CSF nécessaire au recrutement des macrophages (Ye et al., 2001). Les sources cellulaires d'IL-17 sont multiples (T_H17, T $\gamma\delta$ et ILC3) mais chez la souris, le rôle des ILC3 sécrétrices d'IL-17A peut être abordé grâce à l'utilisation de modèles animaux dépourvus de système immunitaire adaptatif (*Rag2^{-/-}*

^{-/-}). Ainsi il a été rapporté que les ILC3 peuvent contribuer précocement à la protection via le recrutement des macrophages inflammatoires et l'induction de leur activité microbicide de manière dépendante de l'IL-17A. D'autre part, les auteurs proposent que le TNF α sécrété par les macrophages pourrait induire à son tour la sécrétion d'IL-17A par les ILC, mettant ainsi en place une boucle d'activation positive qui favorise l'élimination du pathogène (Xiong et al., 2016).

iii. Réponse anti-parasitaire

1. Les ILC2 luttent contre le pathogène *Nippostrongylus brasiliensis*

En 2010, l'équipe d'Andrew McKenzie a identifié une autre source importante d'IL-13 au sein d'une population nonB/nonT sensible à l'IL-25 et à l'IL-33 qu'ils ont nommé Nuocytes (ILC2) (Neill et al., 2010). L'IL-13 induit la contractilité des muscles lisses ainsi que la production de mucus par les cellules caliciformes, deux phénomènes qui contribuent à l'expulsion des parasites intestinaux (von Moltke et al., 2016). Les auteurs firent alors l'hypothèse que ces « nuocytes » sont mobilisés et impliqués dans la réponse antiparasitaire de façon dépendante de l'IL-25 et/ou de l'IL-33. L'infection de souris déficientes pour le récepteur à l'alarmine IL-33 (*Il1rl1^{-/-}*) ou à l'IL-25 (*Il17rb^{-/-}*) avec l'helminthe *Nb* a révélé que les souris *Il1rl1^{-/-}* et *Il17rb^{-/-}* expulsent le parasite normalement alors qu'un délai important est observé dans l'élimination du pathogène chez les animaux doublement déficients (*Il1rl1^{-/-} Il17rb^{-/-}*). Ce délai fut corrélé à un défaut d'expansion des nuocytes producteurs d'IL-13 chez les animaux *Il1rl1^{-/-} Il17rb^{-/-}*. Ces résultats suggéraient une redondance partielle entre ces deux alarmines ainsi qu'un rôle potentiel des nuocytes dans l'élimination du parasite. Le transfert adoptif d'ILC2 cultivées *in vitro* chez des souris receveuses *Il17rb^{-/-}* ou *Il1rl1^{-/-} Il17rb^{-/-}* infectées par le parasite permit de restaurer l'immunité anti-helminthe. Cependant cela ne fut pas le cas chez des souris dépourvues de système immunitaire adaptatif (*Rag2^{-/-}*). Ce résultat met en évidence l'importance du dialogue et de la collaboration entre les ILC et le système immunitaire adaptatif dans la mise en place de réponses optimales aux pathogènes. J'aborderai dans ce travail de thèse, les mécanismes qui sous-tendent certaines de ces interactions à l'état d'équilibre.

2. Les ILC1 dans l'infection par le parasite *Toxoplasma gondii*

L'implication des ILC non-NK sécrétrices d'IFN γ a été démontrée dans la protection contre le parasite intracellulaire *Toxoplasma gondii* (Klose et al., 2014). En effet, chez la souris, les ILC1 non-NK résidentes de la *lamina propria* de l'intestin représentent la source majeure d'IFN γ et de TNF en réponse à l'infection par le parasite. D'autre part, la charge parasitaire reste élevée chez les animaux déficients en T-bet (*Tbx21*^{-/-}) ou dépourvus d'ILC (*Rag2*^{-/-} *IL2r γ* ^{-/-}) en lien avec un défaut de recrutement de monocytes inflammatoires nécessaires à l'élimination du pathogène. Le transfert adoptif d'ILC1 rétablit la sécrétion d'IFN γ et de TNF ainsi que le recrutement de monocytes inflammatoires chez les hôtes immuno-déficients infectés. Ces données suggèrent que les ILC1 T-bet⁺ non-NK participent à la réponse aux pathogènes intracellulaires tels que *T. gondii*.

iv. Le rôle des ILC dans la réponse anti-fongique

En outre de leur activité anti-bactérienne traitée précédemment, les ILC3 participent également à la lutte contre les infections fongiques. L'IL-17 produite par les lymphocytes T recrute les neutrophiles indispensables à la protection contre les pathogènes fongiques (Conti and Gaffen, 2015; Imbert et al., 2016; Wüthrich et al., 2016). Les lymphocytes T_H17 sont considérés comme une source majeure d'IL-17. Cependant, l'infection de souris *Rag2*^{-/-} avec le pathogène *Candida albicans* induit le recrutement très rapide des ILC sécrétrices d'IL-17 (Gladiator et al., 2013b). La déplétion des ILC (et par conséquent de la principale source d'IL-17) favorise la persistance du pathogène aux sites infectieux (langue, muqueuse oropharyngée). Ces résultats suggèrent qu'en absence de lymphocytes T et B, les ILC3 sécrétrices d'IL-17 prennent une part essentielle dans la protection contre ce pathogène. Les auteurs confirmèrent ces résultats en utilisant des souris *Rorc*^{-/-} dépourvues de cellules T_H17 et d'ILC3. Ainsi, les ILC3 pourraient participer à la protection de l'hôte contre l'infection médiée par *C. albicans* via la sécrétion d'IL-17 au même titre que les lymphocytes T_H17.

f. Le côté sombre des ILC

i. Rôle des ILC dans les pathologies inflammatoires

1. *Modèles de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin chez la souris*

La contribution des ILC dans l'inflammation intestinale a été évaluée chez la souris dans plusieurs modèles de colite expérimentale. En 2006, l'équipe de Fiona Powrie observe que l'infection de souris lymphopéniques *Rag2^{-/-}* par *Helicobacter Hepaticus* (Protéobactérie à gram⁻) entraîne l'augmentation de l'expression et de la sécrétion d'IL-23, d'IL-17 et d'IFN γ par les cellules du colon suggérant un rôle clef pour ces 3 cytokines dans la mise en place de l'inflammation (Hue et al., 2006). En 2010, Buonocore et al démontrent dans ce même modèle que l'IL-23 est essentielle à l'activation des ILC identifiées comme principale source des cytokines inflammatoires IL-17 et IFN γ (Buonocore et al., 2010). Dans un autre modèle de colite qui repose sur l'inactivation de T-bet dans des souris lymphopéniques (TRUC T-bet^{-/-} Rag^{-/-}) il fut démontré que l'induction de la production d'IL-17 par les ILC3 colitogènes dépend de la sécrétion d'IL-23 et d'IL-1 β par les DC stimulées par la voie NOD2 (Ermann et al., 2014).

2. *Les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin chez l'homme*

Chez l'homme, les gènes impliqués dans la voie de signalisation IL-23/IL-17, la voie de production du mucus et la voie de signalisation NOD2 (NOD= *Nucleotide oligomerization domain receptors*) sont induits chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin suggérant un rôle possible des ILC dans l'émergence de la pathologie (Björklund et al., 2016; Jostins et al., 2012). L'atteinte de la barrière intestinale serait un facteur de risque pour les patients souffrant de cette maladie, mais le rôle protecteur ou inducteur de l'IL-22 reste à ce jour au cœur des débats. Berninck et al démontrent que la proportion d'ILC3 sécrétrices d'IL-22 est réduite alors que la fréquence des ILC1 est augmentée au sein des intestins des patients atteints de la maladie de Crohn (Figure 23). Des phénomènes de plasticité entre les ILC3 et les ILC1 (cf chapitre I-d) ont été décrits chez l'homme et pourraient expliquer ces modifications (Bernink et al., 2015). D'autre part, les ILC1 et les ILC3 CD56⁻ sont en quantités plus élevées dans les intestins de patients atteints de la maladie de Crohn (Bernink et al., 2013; Fuchs, 2016; Fuchs et al., 2013). Ces cellules joueraient un rôle

délétère dans ce contexte via la sécrétion d'IFN γ (ILC1) et d'IL-17/IFN γ (ILC3) (Geremia et al., 2011).

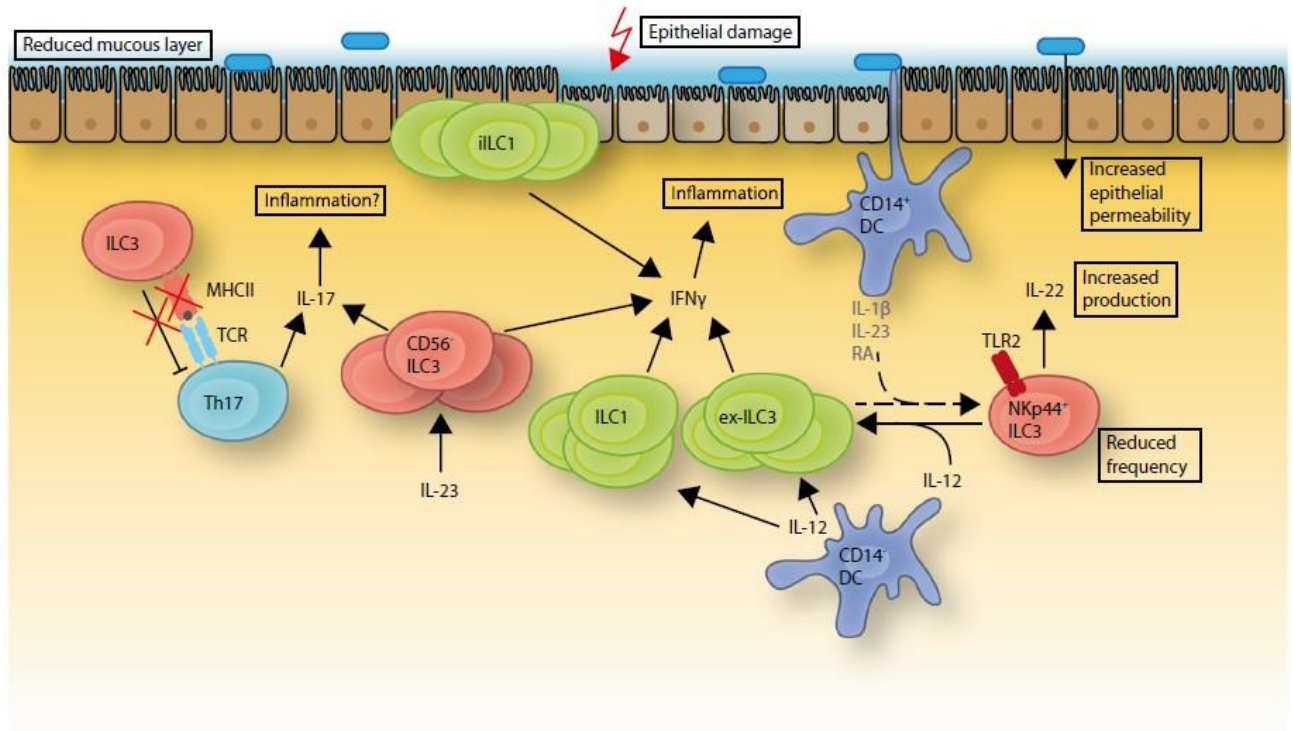


Figure 23 (Forkel and Mjösberg, 2016): ILC et inflammation intestinale. Chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, les ILC3 NKp44⁺ sécrétrices d'IL-22 associées à la protection de la barrière intestinale diminuent en proportion au profit des ILC3 CD56⁺ sécrétrices d'IL-17 et d'IFN γ et des ILC1 CD127⁺ sécrétrices d'IFN γ . En outre, l'environnement inflammatoire riche en IL-12, favorise la plasticité ILC3 \rightarrow ILC1. Ainsi les « ex-ILC3 » à phénotype « ILC1-like » pourraient participer à la mise en place de l'inflammation. Ce contexte riche en cytokines inflammatoires diminue l'étanchéité de la barrière épithéliale et favorise l'entrée des pathogènes dans la circulation sanguine.

3. Les pathologies affectant la peau : psoriasis

Le psoriasis est une maladie inflammatoire de la peau. Elle émerge suite à la sécrétion anormale d'IL-23 et d'IL-12 par les cellules dendritiques, activant ainsi les lymphocytes du système immunitaire adaptatif tels que les lymphocytes T_H17, T_H1, et T_H22. A leur tour, ces cellules produisent des cytokines inflammatoires telles que l'IL-17, l'IFN γ et le TNF qui stimulent la production de chimiokines (CCL20, CXCL10, CXCL11) attractives des T_H17, Neutrophiles et ILC3 par les kératinocytes. L'inflammation du derme

et de l'épiderme aboutit à l'apparition de plaques épaisses et désquamantes sur l'épiderme. Dans un modèle murin de psoriasis expérimental, les ILC3 représentent également une source d'IL-17A et F et d'IL-22 dans la peau des souris traitées à l'Imiquimod (ligand de TLR7) (Pantelyushin et al., 2012). Ces observations ont été transposées chez l'homme avec les travaux de Villanova et al et Teunissen et al. Les auteurs rapportent que la proportion d'ILC3 NKp44⁺ sécrétrices d'IL-17 et d'IL-22 est significativement plus élevée dans la peau et le sang des patients psoriasiques (Dyring-Andersen et al., 2014; Teunissen et al., 2014; Villanova et al., 2014). Le TNF α sécrété par les kératinocytes coopère avec l'IL-23 pour induire la sécrétion d'IL-17 par les ILC3 et les lymphocytes T $\gamma\delta$ (Powell et al., 2012). Ainsi, le traitement des patients par un anti-TNF (*Adalimumab*) diminue significativement la proportion d'ILC3 NKp44⁺, tandis que celle des DC, des monocytes, des NK et des lymphocytes T CD4⁺ reste inchangée (Ward and Umetsu, 2014).

4. Asthme et allergies

a. Maladies allergiques associées aux infections virales

Les ILC2 répondent aux alarmines IL-33 et IL-25 libérées par les tissus au cours des infections et sont des acteurs clefs dans la lutte contre les pathogènes tels que les helminthes ou les virus. Cependant, les ILC2 interviennent également dans l'exacerbation des réponses de type 2 dans le cadre d'affections des voies respiratoires (Barlow et al., 2012; Chang et al., 2011; Kim et al., 2012; Monticelli et al., 2011). Chez la souris, l'infection d'animaux dépourvus de système immunitaire adaptatif (*Rag2*^{-/-}) avec le virus Influenza A induit une hyperréactivité des voies aériennes respiratoires (AHR) caractéristique de l'asthme (Barlow et al., 2012; Chang et al., 2011). Ces symptômes sont drastiquement réduits lorsque la voie d'activation par l'IL-33 est inactivée (*ST2*^{-/-}) ou la production d'IL-13 abolie (*IL-13*^{-/-}). Par ailleurs, le transfert adoptif d'ILC2 issues de souris WT rétablit la sensibilité des hôtes *IL-13*^{-/-} à l'hypersensibilité respiratoire induite par l'IL-25. Ces observations confirment le rôle de l'IL-33 et des ILC2 sécrétrices d'IL-13 dans l'émergence de l'AHR (Chang et al., 2011).

Une induction de la production des cytokines de type 2 a pu être observée dans plusieurs modèles d'asthme allergique chez la souris. L'utilisation de souris reportrices pour l'IL-13 suggère que les ILC2 sensibles à l'IL-33 constituent une source d'IL-13 importante suite à la

stimulation par l'ovalbumine utilisée comme agent allergène. Ces observations ont été confirmées dans d'autres modèles : papaïne, acariens, ou encore administration d'IL-25 et d'IL-33 recombinantes. Dans ces conditions, les auteurs observèrent une augmentation significative de la proportion d'ILC2 sécrétrices d'IL-13 et d'IL-5 dans les poumons et les lavages broncho-alvéolaires associée à une éosinophilie et une hypersécrétion de mucus (Klein Wolterink et al., 2012; Wilhelm et al., 2011).

b. L'asthme induit par les champignons allergéniques

L'inhalation des spores d'*Alternaria alternata* peut entraîner des symptômes tels que l'asthme et la rhinite chez l'homme. Dans un modèle murin mimant l'asthme induit par les spores allergènes, l'administration intra-nasale d'extraits de cultures d'*Alternaria alternata* provoque une éosinophilie précoce des voies respiratoires indépendante de la réponse adaptative. Une inhalation unique d'extraits d'allergènes induit la production rapide d'alarmines IL-33 et IL-25 dans les lavages bronchoalvéolaires. Ces alarmines contribuent alors à l'activation des ILC2 productrices d'IL-13 et d'IL-5 induisant respectivement l'hypersécrétion de mucus par les cellules épithéliales pulmonaires et le recrutement des éosinophiles (Bartemes et al., 2012; Kita, 2015; Wilhelm et al., 2011). Il a été démontré plus récemment que l'exposition au champignon allergénique *Aspergillus oryzae* active les ILC2 et permet, suite à la phase de « contraction » de l'inflammation, la persistance d'une sous population d'ILC2 dites « mémoire » (mILC2) et ce, à très long terme. La caractéristique des ILC2 dites « mémoire » repose sur l'observation que ces cellules sont réactivées plus rapidement et plus fortement après un deuxième challenge avec de la papaïne (Martinez-Gonzalez et al., 2016).

c. Le rôle des ILC3 dans l'asthme associé à l'obésité

Chez la souris, le recrutement accru d'ILC3 CCR6⁺ sécrétrices d'IL-17 (« LTi-like ») dans les poumons a pu être corrélé à l'induction de l'AHR associée à un régime riche en lipides (*High Fat Diet*). Par ailleurs, l'apparition des symptômes était indépendante du système immunitaire adaptatif et le transfert adoptif d'ILC3 suffisait à induire l'hyper-réactivité des voies respiratoires chez des souris dépourvues d'ILC soumises à un régime riche en graisse indiquant le rôle suffisant des ILC3 à induire l'AHR associée à l'obésité (Kim et al., 2014).

d. Les ILC2 et l'asthme chez l'homme

Une augmentation de l'expression de l'IL-33 par les cellules épithéliales des voies respiratoires a pu être observée chez les patients souffrant de rhinite et de rhino-sinusite (Jia et al., 2016; Kamekura et al., 2012; Préfontaine et al., 2009). Par ailleurs, l'équivalent humain des ILC2 murines a été identifié dans les polypes de patients souffrant de rhino-sinusite chronique (Mjösberg et al., 2011), associé à une production élevée de TSLP (Nagarkar et al., 2013). L'ensemble de ces observations suggérerait que les ILC2 sont également impliquées dans l'exacerbation de pathologies respiratoires chez l'homme.

Des thérapies expérimentales ciblant les récepteurs à l'IL-25 et à l'IL-33 ont été testées dans des modèles animaux. Une réduction significative des symptômes d'hyper-réactivité des voies respiratoires a pu être observée en administrant un anticorps monoclonal neutralisant dirigé contre l'IL-25 dans plusieurs modèles d'asthme allergique (Ballantyne et al., 2007; Siegle et al., 2011). Des observations similaires ont également été faites en utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre l'IL-33 (Liu et al., 2009). Récemment, une étude menée chez les patients asthmatiques rapporte que le traitement des ILC2 sanguines avec la molécule immunosuppressive Dexhametazole, entraîne une diminution de la sécrétion d'IL-13 (Jia et al., 2016). Ainsi, la modulation de la réponse innée de type 2 est une piste thérapeutique en cours d'évaluation pour l'élaboration de nouveaux traitements.

ii. Les ILC dans l'auto-immunité

1. Le diabète

Le diabète est une maladie auto-immune qui aboutit à la destruction des cellules bêta (β) des îlots pancréatiques par les cellules du système immunitaire hôte. Les cellules β sont spécialisées dans la sécrétion d'insuline, une hormone qui intervient dans le métabolisme des glucides et permet d'absorber le glucose sanguin (Wilcox, 2005). Une dérégulation de la sécrétion de cytokines inflammatoires telles que l'IL-17 a été associée au diabète gestationnel qui touche 3 à 5 % des femmes enceintes (Afzali et al., 2007; Barnie et al., 2015; Nakashima et al., 2010; Sasaki et al., 2007). Cependant, la proportion de T_H17 reste inchangée durant la grossesse (Nakashima et al., 2010) et dans la circulation sanguine des patientes atteintes de

diabète gestationnel et de pré-éclampsie (hypertension artérielle liée à la grossesse) (Barnie et al., 2015). Bien que ces observations suggèrent que les ILC3 pourraient être impliquées comme autre source potentielle d'IL-17 aucune donnée expérimentale n'a encore été fournie dans ce sens (Barnie et al., 2015; Sutton et al., 2012)

2. La sclérose en plaques

La sclérose en plaque est une maladie auto-immune qui atteint le système nerveux central (CNS) et aboutit à la destruction de la gaine de myéline entourant les nerfs par des lymphocytes T auto-réactifs pouvant entraîner la paralysie des voies respiratoires (Figure 24). Un modèle expérimental de sclérose en plaque chez la souris, nommé *Autoimmune Encephomyelitis* (EAE), a permis de décrire et de mettre en évidence l'essentiel des mécanismes responsables de la réponse auto-immune (Goldenberg, 2012). La première étude mettant en évidence le rôle des cellules ROR γ t⁺ dans l'émergence de l'EAE a révélé que les souris *Rorc*^{-/-} (exemptes de T_H17 et d'ILC3) sont résistantes à l'EAE (Ivanov et al., 2006). Etant donné le rôle connu des T_H17 dans l'émergence des maladies auto-immunes (Langrish et al., 2005; Park et al., 2005), les auteurs concluent que les T_H17 sont responsables de l'induction de la maladie. Cependant, il a été observé que la reconstitution des souris *Rorc*^{-/-} avec des cellules T_H17 ne restore pas la maladie (Hatfield and Brown, 2015). Un des inconvénients majeurs de l'utilisation des souris *Rorc*^{-/-} pour induire l'EAE est l'absence de tissus lymphoïdes secondaires qui pourraient non seulement jouer un rôle critique dans le développement de la maladie, mais également apporter des facteurs de survie et des signaux chimiotactiques essentiels aux cellules T_H17 transférées. Les auteurs proposent néanmoins que cette observation pointe vers un rôle des ILC3 dans l'induction de la maladie. En effet, une population de cellules Lin⁻ CCR6⁺ ROR γ t⁺ CD30L⁺ OX40L⁺ productrice d'IL-17 est détectée dans les méninges des souris développant une EAE. Bien qu'aucune démonstration ne soit fournie dans ce contexte, les auteurs postulent que l'expression de molécules de la famille du TNF comme CD30L et OX40L par les ILC3 promeut l'activation des lymphocytes T (Croft et al., 2009; Tang et al., 2008) et biaise leur différenciation vers les T_H1 tout en favorisant la survie des T mémoires auto-réactifs. Ainsi, les auteurs suggèrent que les ILC3 sont nécessaires à l'accumulation des lymphocytes T CD4⁺ activés dans les méninges (Hatfield and Brown, 2015).

Récemment, le rôle des ILC NKp46⁺ (regroupant les ILC1 et une partie des ILC3) et du facteur de transcription T-bet a été mis en évidence dans l'émergence de l'EAE (Kwong et al., 2017). En effet, T-bet est impliqué dans la pathogénicité des lymphocytes T_H17 dans l'EAE (Wang et al., 2014; Yang et al., 2009) et l'utilisation de souris *Tbx21*^{f/f} NKp46-Cre (déficientes en cellules NK, ILC1 et en ILC3 NKp46⁺ T-bet⁺) démontre que l'absence de ces cellules est associée à une diminution du score clinique. Ces cellules favoriseraient la rupture de la *Glia limitans* (l'isolant des méninges), l'infiltration du CNS par les T CD4⁺ T_H17 auto-réactives et leur maintien en facilitant indirectement la production de certaines cytokines telles que l' IL-1β, l'IL-6, le TNF, la LTα, l'IL-23 et de chimiokines telles que CCL20 (Brown and Russi, 2017) (Figure 24). Cependant, les mécanismes qui sous-tendent les interactions entre les ILC dépendantes de T-bet et le micro-environnement pro-inflammatoire des T CD4⁺ T_H17 auto-réactives restent à identifier.

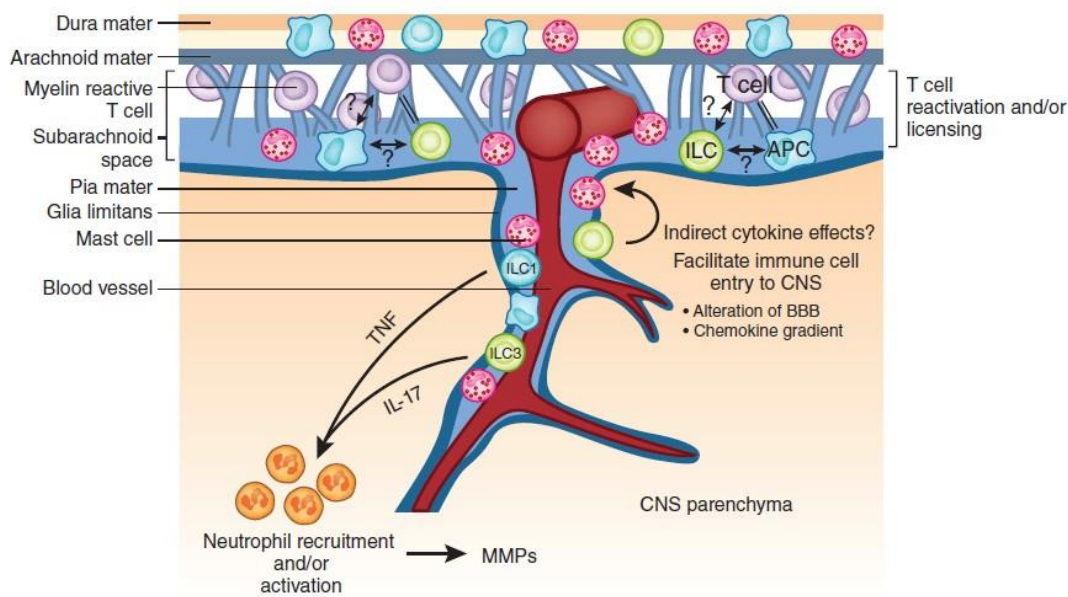


Figure 24 (Brown and Russi, 2017) : La sclérose en plaques, contribution et fonction des ILC. La sclérose en plaques est associée à un environnement inflammatoire riche en IL-17 et TNF. Les ILC T-bet⁺ NKp46⁺ produisant ces cytokines participent activement au recrutement et à l'activation de neutrophiles sécrétant des metalloprotéases (peptidases). L'activité de ces dernières favorise la rupture de la Glia Limitans et l'altération de la barrière hémato-encéphalique préalables au passage des lymphocytes T auto-réactifs dans le système nerveux central.

g. ILC et cancer

Les paragraphes précédents suggèrent que dans les situations de réponse aux pathogènes, de stress inflammatoire ou de réponses auto-immunes les ILC peuvent jouer des rôles antagonistes et participer à l'homéostasie tissulaire ou à l'induction d'un environnement inflammatoire pathogénique. De façon similaire, les trois sous-types d'ILC peuvent favoriser ou empêcher la progression tumorale par le biais des cytokines qu'elles produisent et de leurs interactions avec les autres cellules du système immunitaire inné comme les cellules dendritiques suppressives, les macrophages ou les éosinophiles (Figure 25).

1. L'activité anti-tumorale des ILC

Depuis 1975, les cellules NK (appartenant au groupe 1 des ILC) ont été décrites comme jouant un rôle majeur dans la lutte anti-cancéreuse (Kiessling et al., 1975). Les ILC1 et les NK représentant une source importante d'IFN γ , dans les phases précoces de développement tumoral (Carrega et al., 2016). L'IFN γ a une activité anti-proliférative (Chin et al., 1996), anti angiogénique (Beatty and Paterson, 2001) et pro-apoptotique (Chawla-Sarkar et al., 2003) visant les cellules tumorales. L'IFN γ induit également le recrutement et l'activation des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (LTc) et la polarisation des lymphocytes naïfs en T_H1 acteurs clés de l'immunité anti-tumorale (Bradley et al., 1996; Knutson and Disis, 2005) (WANG and LIN, 2008). Par ailleurs, l'IFN γ induit l'expression de CMHI et CMHII par les DC et les cellules tumorales, contribuant ainsi à l'activation des lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ spécifiques (Seliger et al., 2008) et renforçant la réponse immunitaire adaptative anti-cancéreuse. Ainsi, les ILC1 interviennent indirectement dans la mise en place de la réponse anti-cancéreuse par le biais de l'IFN γ .

Les ILC2 sécrétrices d'IL-5 favoriseraient également la réponse anti-tumorale via le recrutement d'éosinophiles capables de libérer des granules cytotoxiques (Peroxydase d'éosinophiles, Neurotoxine dérivée d'éosinophiles) sur le site tumoral (Cosmi and Annunziato, 2017; Muniz et al., 2012; Nussbaum et al., 2013). En effet, la présence de granules associées aux éosinophiles a pu être mise en évidence dans la masse tumorale de patients atteints d'adénocarcinomes gastriques (Caruso et al., 2011). Alors que le rôle anti tumoral des

éosinophiles n'a pas encore été démontré chez l'homme, la tumorigénicité accrue du fibrosarcome induit par le methylcholanthrène est associée à l'absence d'éosinophiles au site tumoral chez les souris dépourvues de ces cellules (Simson et al., 2007). De plus, l'administration d'IL-5 exogène induit l'infiltration de la tumeur par les éosinophiles et prévient la formation des métastases pulmonaires chez la souris (Ikutani et al., 2012). Ainsi, les ILC2 sécrétrices d'IL-5 pourraient participer, par le biais des éosinophiles, à la mise en place de la réponse anti-tumorale.

La fréquence des ILC3 NKp44⁺ est significativement augmentée dans les tissus lymphoïdes tertiaires (TLO : *Tertiary lymphoid organs*) drainants la masse tumorale de patients atteints de cancer du poumon (Carrega et al., 2015). Ces TLS constitués de DC, de lymphocytes T et B et d'ILC sont des structures dont l'organisation favorise les réponses spécifiques aux antigènes tumoraux (cf chapitre III-a-2). De ce fait, ils sont associés à un pronostic favorable dans le contexte des cancers (Jones et al., 2016). En outre, l'interaction des ILC3 avec les cellules tumorales et les fibroblastes constituant la tumeur induit la sécrétion d'IL-8, de TNF- α et d'IL-22 qui pourrait limiter les dommages tissulaires via le recrutement de neutrophiles et autres granulocytes sur le site tumoral, plutôt qu'une inhibition de la croissance tumorale ou une activité cytotoxique à l'encontre de ces dernières (Carrega et al., 2015).

2. Les ILC favorisent le développement et la croissance tumorale

Malgré l'activité anti-cancéreuse des ILC1, l'IFN γ peut également participer à la progression tumorale. L'IFN γ augmente les capacités métastatiques des cellules B16 dans la cavité pulmonaire des souris (Taniguchi et al., 1987) et induit l'expression de molécules de MHC I qui inhibent l'activité cytotoxique des cellules NK (Long et al., 2013). Ainsi, du fait de l'absence de récepteurs inhibiteurs, les ILC1 pourraient agir plus efficacement dans les phases précoces du développement tumoral (Carrega et al., 2016). L'IFN γ induit le recrutement de MDSC (*Myeloid Derived Suppressor Cells*) dont l'activité contribue à la croissance tumorale en interférant avec l'activation et la prolifération des lymphocytes T soit par le biais des voies métaboliques (Katz et al., 2008) (Geiger et al., 2016) soit en agissant sur la présentation des

antigènes (Gabrilovich and Nagaraj, 2009). De ce fait, l'immunité adaptative anti-tumorale est compromise, ce qui favorise un environnement pro-tumorigène.

Les cytokines de type 2 (IL-5 et IL-13) sécrétées par les lymphocytes T_H2 et les ILC2 peuvent également favoriser la formation et la progression tumorale. Une augmentation de la production d'IL-33 a pu être observée dans un modèle murin de cancer du sein. Celle-ci est accompagnée par le recrutement de MDSC et d'ILC2 sécrétrices d'IL-13 et par la diminution de la proportion de cellules NK (Jovanovic et al., 2014). Par ailleurs, les MDSC sensibles à l'IL-13 sécrètent également du TGF- β , cytokine induisant l'activation des Macrophages M2 dont l'activité pro-angiogénique favorise la progression tumorale (Chanmee et al., 2014). Le TGF- β induit également la polarisation des lymphocytes T naïfs en Tregs dont l'activité suppressive compromet la réponse anti-tumorale (Moo-Young et al., 2009). En somme, l'activation des ILC2 par l'IL-33 et la sécrétion d'IL-13 qui en découle pourraient avoir des effets indirects sur la progression tumorale.

L'expression d'IL-17 et d'IL-23 a été mise en évidence au sein de plusieurs cancers chez l'homme (poumons, seins, foie, colon) (Carrega et al., 2016). Dans un modèle murin d'adénocarcinome du colon et de fibrosarcome, l'IL-17 induit d'une part l'augmentation de la croissance tumorale et d'autre part la production de facteurs pro-angiogéniques tels que VEGF, PGE1, PGE2 par les fibroblastes et les cellules tumorales (Murugaiyan and Saha, 2009; Numasaki et al., 2003). Cependant, aucune étude n'a rapporté le rôle des ILC3 dans ce contexte. Récemment, il a été rapporté que l'interaction des ILC3 avec les cellules stromales sécrétrices de CXCL13 induit la production de RANKL associé à une moindre sensibilité aux chimiothérapies ainsi qu'à des risques élevés de rechute tumorale (Pfitzner et al., 2014; Renema et al., 2016). Par ailleurs, la déplétion des ILC3 ou la neutralisation de RANKL est suffisante pour diminuer les métastases, suggérant fortement l'implication des ILC3 dans la croissance tumorale (Irshad et al., 2017).

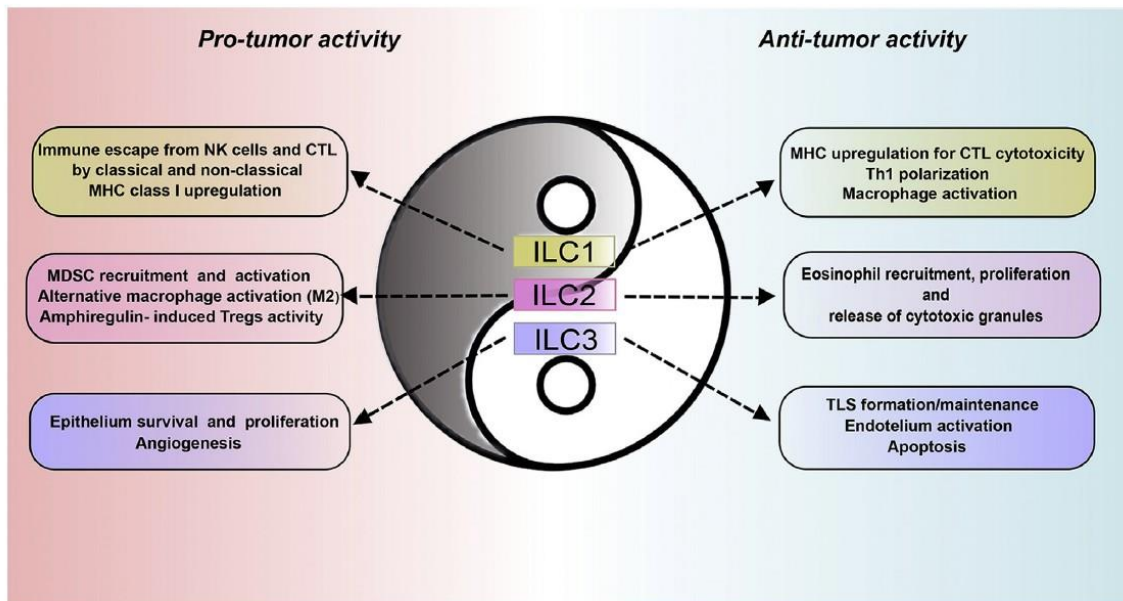


Figure 25 (Carrega et al., 2016) : Le Yin et le Yang des ILC dans le cancer. Les ILC1, ILC2 et ILC3 arborent des activités pro (gauche) et anti-tumorales (droite), principalement via la sécrétion de cytokines.

III. COLLABORATION SYSTEME IMMUNITAIRE ADAPTATIF (SIA) / ILC

a. Complémentarité et redondance des ILC

De nombreuses études ont rapporté que les ILC participent à l'homéostasie tissulaire via la réparation de tissus endommagés (poumons, thymus). Les ILC jouent également un rôle dans le confinement du microbiote intestinal en collaboration avec les cellules myéloïdes et lymphocytaires B (cf chapitre II). Enfin, les ILC contribueraient aux réponses immunitaires à l'encontre de divers pathogènes (viraux, bactériens, parasitaires et fongiques). Cependant, ces observations proviennent majoritairement d'études menées sur des lignées murines immunodéficientes (*Rag^{-/-}*). De ce fait les interactions et les collaborations possibles entre le système immunitaire adaptatif et les ILC ne sont pas systématiquement mises en évidence, nous interrogeant sur le rôle des ILC au sein d'organismes immunocompétents.

Plusieurs articles rapportent que chez la souris, les ILC3 sécrétrices d'IL-22 jouent un rôle crucial dans la protection contre l'entéro-pathogène *C. Rodentium* (Rankin et al., 2013; Vonarbourg et al., 2010). Des modèles murins dans lesquels la globalité des ILC3 (ILC3 NKp46⁺

et NKp46⁻) ou uniquement les ILC3 NKp46⁺ sont absentes ont été développés afin d'évaluer l'étendue de la redondance fonctionnelle avec les cellules T (Song et al., 2015). Les auteurs montrent que les ILC3 jouent un rôle déterminant dans l'aggravation des symptômes de la colite induite par l'anti-CD40L. En effet, la gravité de celle-ci est accrue chez les animaux déficients en cellules T en comparaison aux animaux dépourvus à la fois de cellules T et d'ILC3. La complémentation de souris immuno-déficientes NSG (NOD SCID $\gamma^c^{-/-}$) avec des ILC3 NKp46⁺ suffit pour rendre ces animaux plus susceptibles à la colite induite par l'anti-CD40L et démontre un potentiel pathogène accru de ces dernières en comparaison aux ILC3 NKp46⁻. Dans le modèle d'infection par l'entéro-pathogène *C. Rodentium*, les auteurs confirment le rôle protecteur des cellules T alors que les ILC3 NKp46⁺ s'avèrent redondantes en présence de cellules T ou d'ILC3 NKp46⁻ (Song et al., 2015). De même, Rankin et al confirment qu'en présence de lymphocytes T, la production d'IL-22 par les ILC3 NKp46⁺ n'est pas essentielle à la protection contre *C. rodentium* (Rankin et al., 2015).

Chez l'homme, il a été rapporté que la transplantation de patients SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*) par greffe allogénique de cellules souches hématopoïétique (HSCT : *Hematopoietic Stem cell Transplantation*) permet la reconstitution des lymphocytes T en périphérie mais pas celle des ILC (Vély et al., 2016). Ainsi, 7 à 39 années après greffe, aucun signe clinique lié à cette déficience n'a été constaté. De ce fait, les ILC seraient également redondantes chez l'homme en présence d'un système immunitaire adaptatif fonctionnel et dans les pays industrialisés où l'accès à l'eau potable et aux soins médicaux est garanti.

Ces études confirment l'importance d'étudier les ILC en prenant compte l'environnement cellulaire adaptatif. Nous aborderons dans la suite de ce chapitre de nombreux exemples de collaboration entre les ILC et système immunitaire adaptatif.

b. Le développement des organes lymphoïdes secondaires et tertiaires

i. Les tissus lymphoïdes secondaires associés à l'intestin (GALT)

La toute première collaboration entre ILC et système immunitaire adaptatif a lieu avant la naissance au moment de la formation des tissus lymphoïdes secondaires, sièges de la mise en place de la réponse immunitaire adaptative. Certains de ces tissus lymphoïdes sont

spécialisés dans la surveillance des muqueuses qui représentent le lieu d'entrée d'une grande quantité d'antigènes étrangers de part leur exposition à l'environnement extérieur. Ces tissus lymphoïdes ont une architecture semblable (zone T, zone B) et sont regroupés sous le nom de MALT pour tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT=*Mucosal Associated lymphoid Tissues*) (Figure 26). Les GALT (GALT=*Gut Associated lymphoid Tissues*) drainent l'intestin grêle et le colon, les NALT (NALT=*Nasal Associated lymphoid Tissues*) drainent la cavité nasale et les BALT (BALT=*Bronchus Associated lymphoid Tissues*) drainent l'arbre bronchique et les poumons. Dans un autre registre, il existe également des tissus lymphoïdes atypiques associés au tissu adipeux viscéral nommés FALC (FALC=*Fat Associated Lymphoïdes Clusters*) (Randall and Mebius, 2014).

Le développement des GALTs est essentiellement dépendant des ILC3 fœtales nommées LTi alors que les NALT et les FALC se développent normalement en leur absence (Bar-Ephraïm and Mebius, 2016; Buettner and Lochner, 2016). Ainsi, alors que l'ensemble des structures lymphoïdes citées précédemment (MALT) sont regroupées sous le même terme : organes lymphoïdes secondaires (OLS), leur développement ne fait pas intervenir les mêmes acteurs cellulaires ni les mêmes voies de signalisation.

Les GALT (Tissus lymphoïdes associés aux intestins) constituent un ensemble de tissus lymphoïdes regroupés ou isolés dans la *lamina Propria* de l'intestin et du colon (Figure 27). On distingue : les plaques de Peyer (PP), les Cryptoplaques (CP), les Follicules lymphoïdes isolés (ILF) et les ganglions mésentériques (mLN) (Eberl, 2005; Forchielli and Walker, 2005). L'ensemble de ces structures sont constituées en majorité de lymphocytes T, B et DC tandis que les ILC se retrouvent en proportion minoritaire (Eberl, 2005). Comme dans tout tissu lymphoïde, les lymphocytes T et B occupent des zones distinctes (paracortex et cortex respectivement) alors que les ILC2 et ILC3 occupent les zones interfolliculaires et sous-capsulaires (Randall and Mebius, 2014).

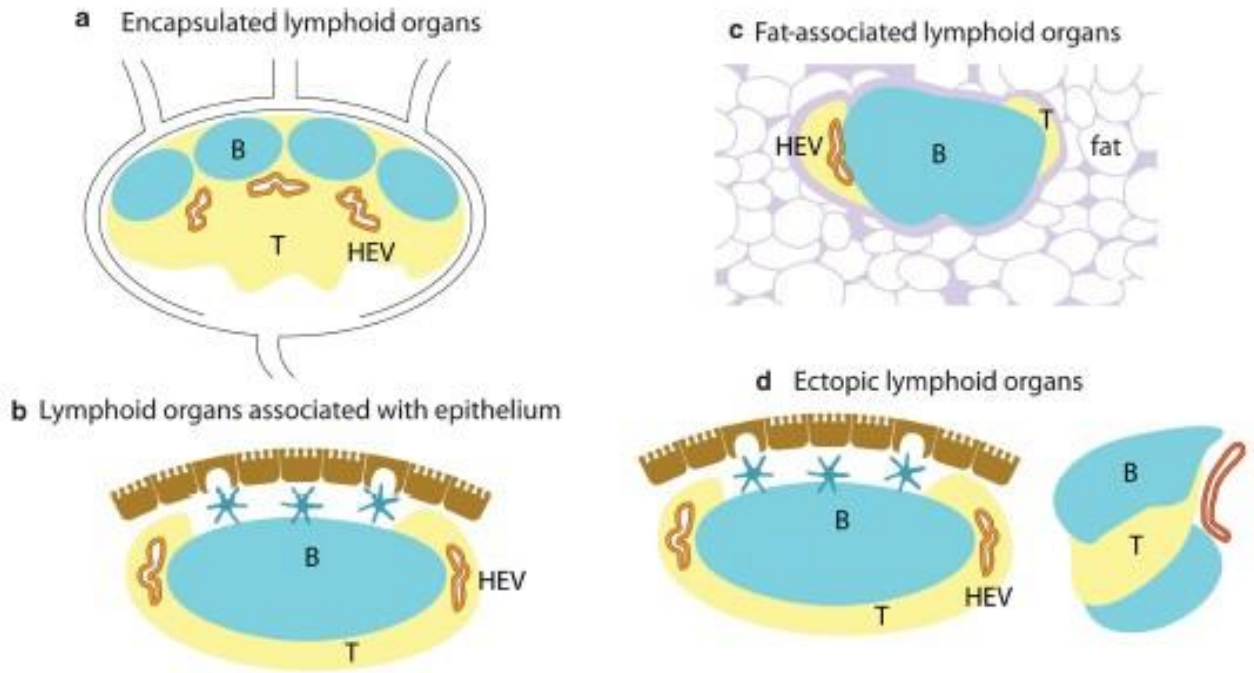


Figure 26 (Randall and Mebius, 2014): Les différents types d'organes lymphoïdes associés aux muqueuses. A Les ganglions lymphatiques (ganglions mésentériques et périphériques) sont des organes lymphoïdes encapsulés. Les lymphocytes T et B sont organisés en zones distinctes. Les lymphocytes T sont regroupés dans le cortex et les follicules B sous la capsule, dans le paracortex. Les vaisseaux lymphatiques afférents transportent continuellement les antigènes drainants les tissus au sein des ganglions, tandis que les HEV (High Endothelial Veinule) transportent les cellules du système immunitaire provenant de la circulation sanguine. B et D Les Plaques de Peyer, les SILT et les organes lymphoïdes tertiaires font partie des tissus lymphoïdes non-encapsulés, associés à l'épithélium. Les cellules immunitaires sont également organisés en zones T et B (la zone B étant majoritaire), tandis que les DC situées à proximité des cellules M, contrôlent le lieu d'entrée des antigènes provenant du microbiote intestinal. Ces tissus ne sont pas constitués de vaisseaux lymphatiques car le drainage des antigènes s'effectue directement à proximité de l'épithélium. En revanche, comme pour les ganglions lymphatiques, ils possèdent des HEV. C Les tissus lymphoïdes associés aux tissus adipeux sont également exempts de capsule. Les lymphocytes sont organisés en zone T et B et les antigènes proviennent directement du milieu extérieur riche en adipocytes.

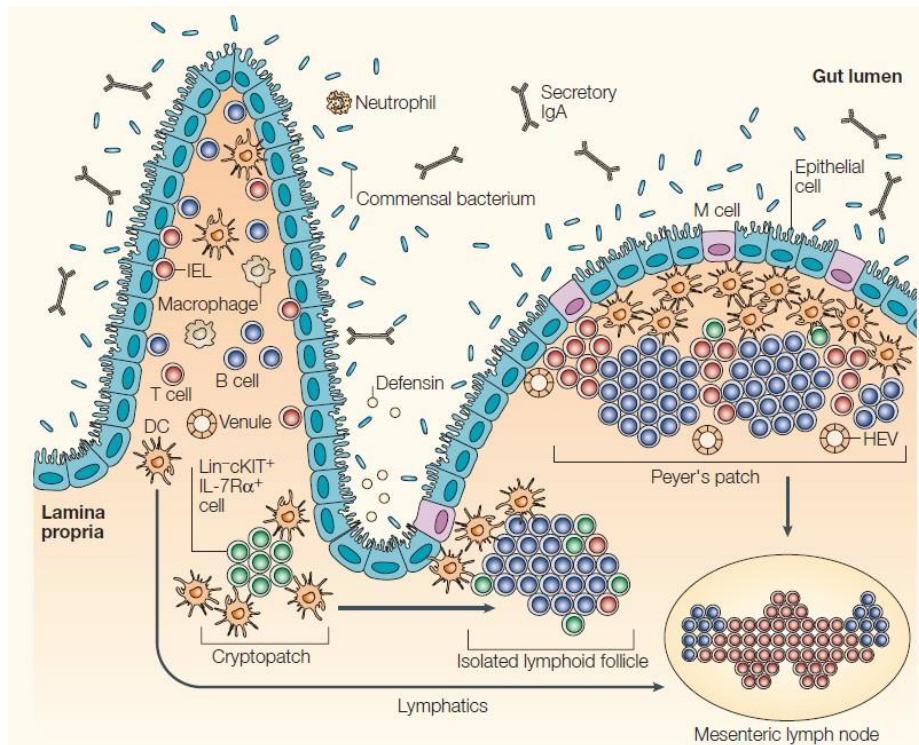


Figure 27 (Eberl, 2005): Vue d'ensemble des organes lymphoïdes secondaires associés à la lamina propria de l'intestin, chez la souris. La muqueuse intestinale est composée d'une couche unique de cellules épithéliales protégée par une couche de mucus composée d'IgA, de peptides antimicrobiens et de bactéries. La lamina propria est composée de divers sites d'induction de la réponse qui constituent le système immunitaire intestinal. On distingue les tissus lymphoïdes associés à l'épithélium intestinal: les cryptoplaques (CP), les follicules lymphoïdes isolés (ILF) et les plaques de Peyer (PP), ainsi que les ganglions lymphatiques situés dans le mésentère et drainant les antigènes du microbiote : les ganglions mésentériques (mLN). Les PP et les ILF sont le lieu de production d'IgA de manière dépendante et indépendante des lymphocytes T respectivement. Les ILC3 dispersées dans la lamina propria jouent un rôle crucial dans la production de peptides anti-microbiens (défensines) par les cellules de paneth. Les ganglions mésentériques constituent le siège d'activation et de différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T effecteurs ou T régulateurs. Les ILC3 y jouent un rôle majeur dans la régulation négative des lymphocytes T CD4⁺.

1. Fonction et développement des ganglions lymphatiques tels que les mLN

Les ganglions mésentériques constituent une chaîne d'organes lymphoïdes secondaires situés dans le mésentère et qui drainent l'intestin grêle et le colon. Ces tissus sont constitués à 98% de lymphocytes T et B, tandis que les ILC et les cellules myéloïdes (DC, macrophages) y sont minoritaires. Les ganglions mésentériques abritent la mise en place de la tolérance aux organismes commensaux et aux antigènes alimentaires qui repose sur les lymphocytes T régulateurs. Les lymphocytes T naïfs s'y différencient également en

lymphocytes T effecteurs en réponse aux antigènes de micro-organismes pathogènes. L'ensemble de ces réponses est intégré afin de maintenir l'homéostasie de la muqueuse intestinale (Macpherson and Smith, 2006; Randall and Mebius, 2014).

Les ganglions mésentériques sont parmi les premiers organes lymphoïdes à être formés chez la souris et leur développement (induit par les LT_i) est similaire à celui d'autres ganglions lymphatiques tels que les ganglions périphériques (pLN) (Rennert et al., 1998). Le développement des ganglions lymphatiques et des plaques de Peyer est induit par les LT_i au stade fœtal chez la souris (E= 9.5-12.5) et chez l'homme (entre la 8 et 11^{ème} semaine de gestation) (Hoorweg and Cupedo, 2008; van de Pavert and Vivier, 2016) (Figure 28). Le rôle de ces cellules a été démontré chez les souris déficientes pour les facteurs de transcriptions nécessaires à leur développement : ROR γ t et Id2 (Eberl and Littman, 2004; Eberl et al., 2004).

Le développement de ces structures s'effectue en trois étapes :

a. Etape 1 : Recrutement et différenciation des LT_i

La première étape de développement des ganglions lymphatiques, débute par la stimulation des cellules mésenchymateuses par l'acide rétinoïque préalablement transformé par l'enzyme Rétinaldéhyde déshydrogenase-2 (RALDH2) provenant des fibres nerveuses situées à proximité du ganglion lymphatique (Iwata et al., 2004; Pavert and Mebius, 2010; van de Pavert et al., 2009). Les cellules mésenchymateuses sécrétrices de CXCL13 en collaboration avec les cellules endothéliales sécrétrices de la chimiokine CCL21 (ligand de CCR7) recrutent alors les précurseurs des LT_i, les LT_{i0} : IL7R α ⁺ ROR γ t^{+/-} NCR⁻ RANKL⁻ RANK⁺ CD4⁻ CXCR5⁺ CCR7⁺), au sein de l'ébauche ganglionnaire (van de Pavert et al., 2014a). Par ailleurs, l'acide rétinoïque présent dans l'environnement induit l'expression du facteur de transcription ROR γ t par les LT_{i0}, induisant leur différenciation en cellules matures LT_{i4}, exprimant RANKL et CD4 (Buettner and Lochner, 2016; van de Pavert et al., 2014a).

Etant donné que les souris déficientes pour CXCR5 et CCR7 et les chimiokines correspondantes (CXCL13, CCL19/CCL21) sont dépourvues de ganglions périphériques et de PP à l'exception des mLN, les signaux nécessaires spécifiquement au développement des mLN restent à identifier (Ohl et al., 2003).

b. Etape 2 : Interactions LT_0 – LT_i

Le regroupement des LT_i et l'interaction RANK/RANKL induisent l'expression de la lymphotoxine hétérotrimérique $\alpha 1\beta 2$ à la membrane des LT_i et l'activation des cellules mésenchymateuses exprimant le récepteur à la lymphotoxine $\alpha 1\beta 2$, $LT\beta R$ (Bénézech et al., 2010; Eberl et al., 2004). L'activation de la voie de signalisation $NF\kappa B$ au sein des cellules mésenchymateuses induit la production de chimiokines et de cytokines (CXCL13, CCL19, CCL21 et IL-7) et l'expression de molécules d'adhérence vasculaires (I-CAM, V-CAM, MAd-CAM) (Bénézech et al., 2010). Ces cellules mésenchymateuses activées sont nommées cellules stromales organisatrices des tissus lymphoïdes (LT_0). D'autre part, la signalisation passant par $LT\beta R$ induit l'expression de RANKL par les LT_i , ce ligand étant lui-même inducteur de l'expression de la $LT\alpha 1\beta 2$ par ces cellules. Ces modifications transcriptionnelles engendrent le recrutement et l'accumulation des LT_i dans l'ébauche ganglionnaire permettant la mise en place d'une boucle de rétrocontrôle positive (Sugiyama et al., 2012). Le fait que les souris déficientes pour la lymphotoxine α , β , le récepteur $LT\beta R$ ou RANKL soient exemptes de ganglions lymphatiques (pLN et mLN), confirme l'importance de cette interaction $LT\alpha 1\beta 2/LT\beta R$ (Chappaz et al., 2010; Sugiyama et al., 2012). En revanche, l'absence de RANKL n'impacte pas le développement des plaques de Peyer, suggérant un mécanisme développemental différent (Sugiyama et al., 2012).

c. Etape 3 : Colonisation de l'ébauche ganglionnaire par les lymphocytes T et B

Quelques jours après la naissance, les cellules stromales produisent le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire VEGF-C (VEGF= *vascular endothelial growth factor*) (Vondenhoff et al., 2009). La production de ce facteur permet la connexion entre les vaisseaux sanguins et les vaisseaux lymphatiques dans le ganglion et la colonisation par les lymphocytes T et B dans leurs zones respectives. Enfin, l'interaction entre les lymphocytes et les cellules stromales du ganglion induit la différenciation de ces dernières en différents sous-types : les FRC (FRC= *Fibroblastic Reticular Cells*), les FDC (*Follicular Dendritic Cells*) et les MRC (*Marginal Reticular Cells*), permettant ainsi l'organisation anatomique du ganglion (Koning and Mebius, 2012).

2. Définition et fonction des plaques de Peyer (PP)

Les plaques de Peyer (PP) sont des organes lymphoïdes secondaires de l'intestin grêle composés de 10^5 à 10^6 cellules (T, B, ILC et DC). On en dénombre 8 à 12 dans les intestins d'une souris adulte (Fagarasan et al., 2002). Les PP sont des tissus lymphoïdes non encapsulés associés à l'épithélium intestinal (Figure 26). Le transport des antigènes provenant du microbiote s'effectue par des cellules intestinales exemptes de vili à forte activité endocytique : les cellules M (Randall and Mebius, 2014). Les DC situées à proximité de ce lieu d'entrée absorbent les antigènes présentés par les cellules M pour initier la réponse IgA (Gebert et al., 1996; Hamada et al., 2002). Par ailleurs, l'environnement de ces tissus favorise l'entrée des lymphocytes B par les HEV (*High endothelial Veinule*) directement situées au sein des follicules B via l'interaction $\alpha 4\beta 7$ -MAdCAM (Okada et al., 2002; Reboldi and Cyster, 2016) (Reboldi and Cyster, 2016). Ainsi la principale fonction des plaques de Peyer est l'induction de la réponse IgA hautement spécifique des antigènes commensaux alimentaires ou pathogènes contenus dans la lumière intestinale. (Hamada et al., 2002). Les IgA dispersées dans le mucus surplombant les cellules épithéliales se lient aux microorganismes ou toxines de la flore microbienne, les rendant alors inefficaces.

La génération des IgA dans les PP est dépendante des lymphocytes T et s'effectue en 2 étapes :

- a. La commutation de classe isotypique des IgM vers les IgA

Les lymphocytes B naïfs des follicules sont activés par les cellules dendritiques folliculaires (FDC) via la présentation des antigènes du microbiote. D'autre part, les lymphocytes Tfh (Tfh= *T follicular Helper*) procurent les signaux d'« aide » aux lymphocytes B basés sur les interactions TCR/CMHII et CD40/CD40L (Allen et al., 2007). L'ensemble de ces signaux induit l'expression de l'enzyme AID (AID=*Activation-induced cytidine deaminase*) nécessaire à la commutation isotypique (CI) des IgM en IgA et aux hypermutations somatiques (HMS) des régions variables des Ig (Fagarasan, 2008) (Figure 28).

b. Différenciation, sortie et migration des IgA⁺ vers la muqueuse intestinale

Les DC résidentes des PP et les cellules épithéliales surplombant le follicule B expriment fortement l'enzyme RALDH responsable de la synthèse d'acide rétinoïque à partir de vitamine A (Iwata, 2009; Mora and von Andrian, 2009). L'acide rétinoïque et l'IL-6 produits par les DC seraient essentiels pour la commutation isotypique IgM → IgA, la génération de plasmocytes IgA⁺ et la migration des plasmocytes vers la *lamina propria* de l'intestin (Sato et al., 2003) (Dullaers et al., 2009; Iwata et al., 2004; Mora et al., 2003, 2006; Pabst et al., 2004). Les IgA sécrétées par les plasmocytes sont prises en charge par les cellules épithéliales de la *lamina propria* qui les transportent vers la lumière intestinale où s'effectue la régulation de l'expansion bactérienne (Johansen and Kaetzel, 2011).

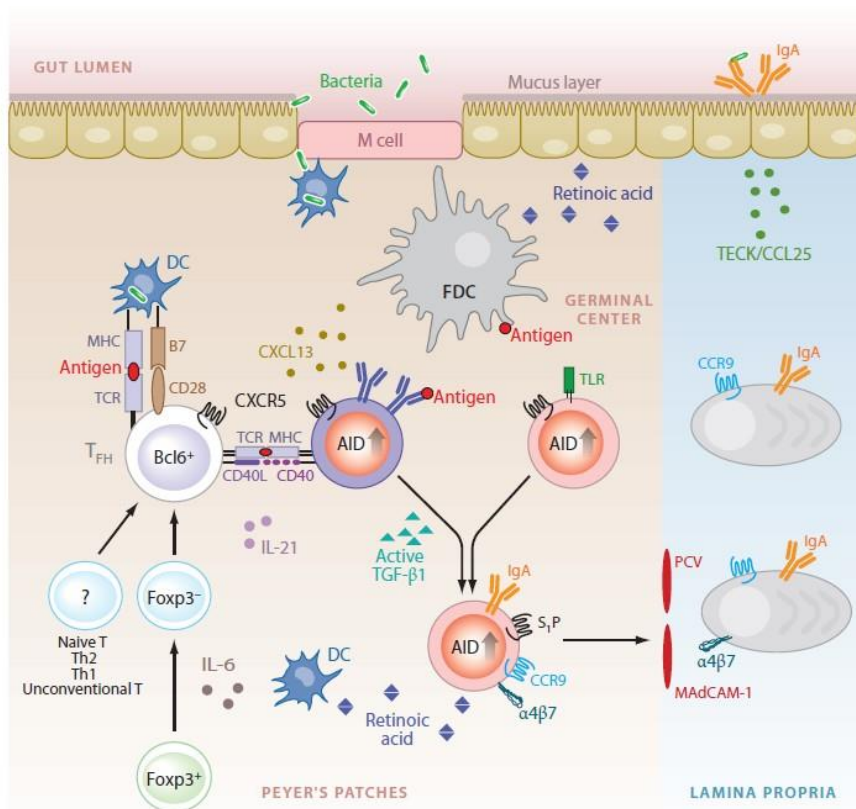


Figure 28 (Fagarasan et al., 2010) : Différenciation des plasmocytes IgA⁺ dans les plaques de Peyer. Les plaques de Peyer sont des tissus lymphoïdes non encapsulés, situés à proximité des cellules épithéliales de l'intestin. Les cellules M de l'épithélium intestinal favorisent le passage continu d'antigènes vers les DC situées à proximité. Les cellules dendritiques activent alors les lymphocytes T CD4⁺ des PP, certains induisent l'expression de BCL6 et CXCR5, on les nomme alors les Tfh (*T Follicular Helper*). Dans

un environnement riche en IL-6 et en IL-21, les lymphocytes Tregs peuvent se différencier en lymphocytes Tfh en réprimant l'expression du facteur de transcription FOXP3. L'expression du récepteur de la chimiokine CXCL13, CXCR5 leur permet d'accéder aux follicules B et de fournir les signaux de co-stimulation (CD40/CD40L) nécessaires à l'activation des lymphocytes B et à la formation des centres germinatifs. Ces étapes reposent sur l'expression de l'enzyme AID nécessaire à la commutation de classe isotypique IgM vers IgA ainsi qu'à la maturation d'affinité des Ig par hypermutations somatiques des régions variables. La production d'acide rétinoïque et de TGF- β mature par les cellules présentatrices d'antigènes des plaques de Peyer est essentielle à la génération des lymphocytes B IgA⁺ et à leur différenciation en plasmocytes. L'expression de l'intégrine α 4 β 7 et de CCR9 et la répression de CXCR5 par les LB IgA⁺ favorisent la sortie des centres germinatifs et la migration vers la lamina propria de l'intestin où les IgA sécrétées sont transportées dans la lumière intestinale.

3. Développement des plaques de Peyer (PP)

Le développement des PP s'effectue plus tardivement que celui des ganglions lymphatiques (entre les stades embryonnaires (E=12.5 et 15.5) (Adachi et al., 1998). Le processus initiant la formation des PP s'effectue indépendamment des LTi et des chimiokines CXCL13, CCL19, CCL21 (Patel et al., 2012). Les premières cellules colonisant l'ébauche des PP ont été caractérisées comme étant CD11c⁺ IL7R α ⁻ CD4⁺ CD3⁻ c-Kit⁺ CD45⁺. Nommées cellules initiateuses de tissus lymphoïdes (LTin), ces dernières expriment la lymphotoxine β ainsi que le récepteur à la tyrosine kinase RET (RET= *Rearranged during Transfection*) (Patel et al., 2012). Ces deux molécules sont cruciales pour la formation initiale des PP. La déficience pour l'une de ces deux molécules (LT β ou RET) induit l'absence de développement de ces structures lymphoïdes.

Suite à l'interaction avec les ligands de la kinase RET (*glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF), *neurturin* (NRTN), *artemin* (ARTN) et *persephin* (PSPN) possiblement exprimés par les cellules avoisinantes, les LTin forment tout d'abord un regroupement cellulaire formant l'ébauche des PP. Patel et al rapportent que l'induction de la voie de signalisation passant par RET, induit l'expression de la molécule d'adhérence VCAM-1 par les cellules mésenchymateuses situées à proximité des LTin. Ainsi, via la lymphotoxine β les LTin interagissent avec les cellules mésenchymateuses LT β R⁺ promouvant la maturation des cellules mésenchymateuses en LTo. Ces dernières expriment alors les molécules d'adhérence VCAM, ICAM, MadCAM ainsi que la chimiokine CXCL13 (Buettner and Lochner, 2016; Patel et al., 2012; van de Pavert and Vivier, 2016). Les LTi exprimant l'hétérotrimère LT α 1 β 2 seraient

alors recrutées en grande quantité au sein de l'ébauche des PP, interagissant à leur tour avec les LTo, elles participent à la mise en place d'une boucle de rétrocontrôle positive. La suite des événements est identique à celle décrite précédemment au sein des ganglions lymphatiques. Ainsi, les souris déficientes pour *Roryt* ou *Id2* sont dépourvues de PP ce qui démontre le rôle crucial des LTi dans ces dernières étapes.

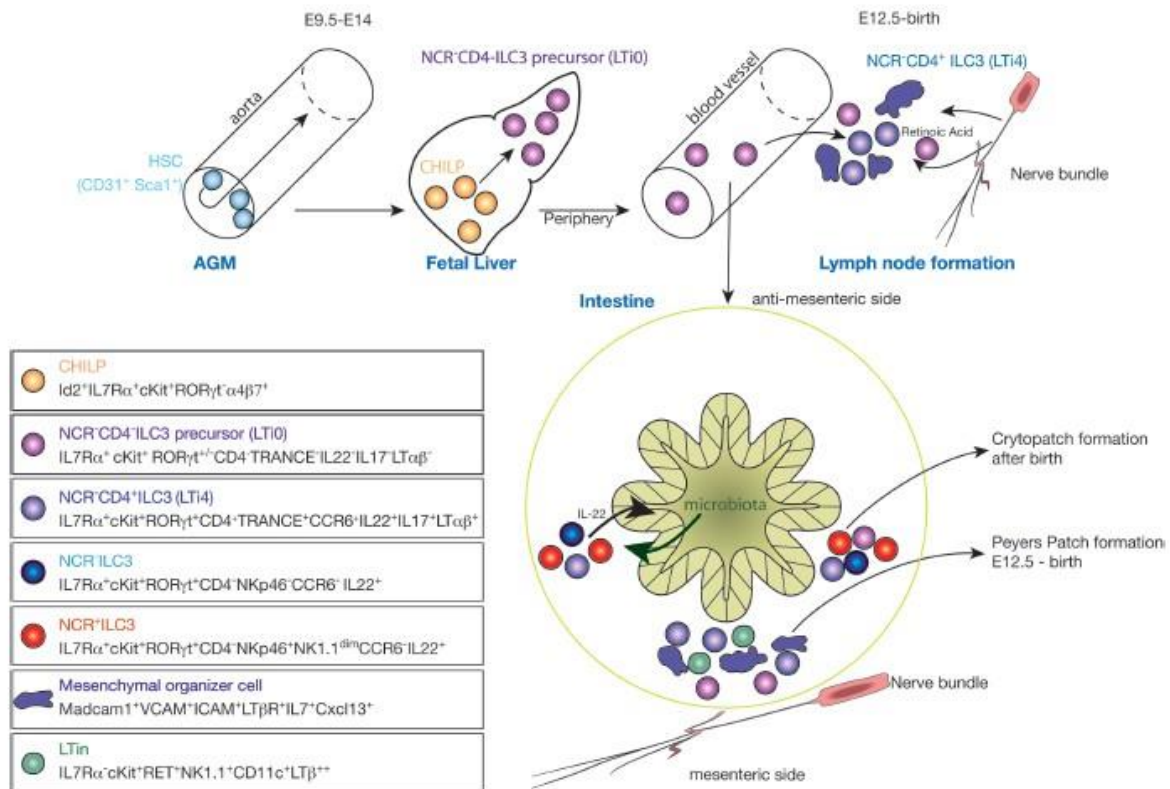


Figure 29 (van de Pavert and Vivier, 2016) : Les étapes de développement des organes lymphoïdes secondaires chez la souris. Au stade embryonnaire E=9,5, les cellules souches hématopoïétiques migrent de la circulation sanguine vers le foie fœtal où elles se différencient en CHILP sous l'influence d'*Id2*, *Tox* et *TCF1*. Le CHILP se différencie alors en précurseur des LTI exprimant faiblement le facteur de transcription *RORγt* (LTI₀). Ces derniers migrent vers la périphérie afin de former les ébauches ganglionnaires mésentériques et plus tardivement les plaques de Peyer tandis que les crypto-plaques se forment après la naissance. Au stade embryonnaire E=12,5 la différenciation des LTI₀ en LTI₄ s'opère sous l'influence de l'acide rétinoïque et de l'induction de l'expression du facteur de transcription *RORγt*. L'acide rétinoïque induit également la sécrétion de CXCL13 par les cellules mésenchymateuses afin de recruter d'avantage de LTI dans l'ébauche ganglionnaire. L'interaction entre les LTI et les cellules mésenchymateuses via l'hétérotrimère de lymphotoxine LTα1β2 enclenche leur maturation en cellules stromales « organisatrices » des tissus lymphoïdes. Ces dernières jouent un rôle crucial après la naissance dans le recrutement des lymphocytes T et B au niveau des ébauches ganglionnaires.

4. Définition et fonction des ILF

Les SILT (*Solitary intestinal lymphoid tissues*) représentent un ensemble de tissus lymphoïdes solitaires, éparpillés dans la *Lamina Propria* de l'intestin grêle. Parmi ces SILT on distingue les follicules lymphoïdes isolés (ILF) et leurs précurseurs, les cryptoplaques (CP). Ces structures se développent après la naissance et augmentent en taille et en diversité cellulaire au fur et à mesure de la colonisation bactérienne. Les CP ont été décrites pour la première fois en 1996 par Kanamori et al. Les auteurs rapportent que ces structures de petite taille sont composées de regroupement de 100 à 1000 cellules hématopoïétiques (ILC, lymphocytes B, DC et de rares cellules T) et se localisent à proximité des cryptes de l'intestin grêle (Kanamori et al., 1996). A l'état d'équilibre, environ 1500 CP résident au sein de la *lamina propria* de l'intestin de la souris adulte, contre 150 dans le colon (Kanamori et al., 1996) alors que les ILF sont de 150 à 300 (Hamada et al., 2002; Lorenz et al., 2003).

i. Génération des IgA de manière indépendante des lymphocytes T

Des études menées chez des souris dépourvues de plaques de Peyer ($LT\alpha^{-/}$) (Rennert et al., 1998; Yamamoto et al., 2000) ou de lymphocytes T ($Tcrb^{-/}Tcrd^{-/}$) (Macpherson et al., 2000; Tsuji et al., 2008) montrent que la quantité de lymphocytes B IgA⁺ est deux à trois fois supérieure au sein de la *lamina propria* en comparaison aux animaux contrôles. Par ailleurs, malgré l'importance des signaux apportés par les Tfh pour induire la formation des centres germinatifs, la production d'IgA n'est globalement pas affectée chez les souris CD40^{-/-} (Bergqvist et al., 2006). L'abondance des lymphocytes B au sein des ILF justifia l'hypothèse selon laquelle ils pourraient constituer un site d'intérêt pour la production d'IgA de façon indépendante des cellules T (Hamada et al., 2002; Lorenz and Newberry, 2004). Par la suite, l'équipe de S. Fagarasan rapporta que les ILF des souris déficientes en lymphocytes T contiennent des lymphocytes B IgA⁺ exprimant AID malgré l'absence de centres germinatifs (Tsuji et al., 2008). Ils émettent alors l'hypothèse que les ILF sont suffisants à la génération d'IgA indépendamment des lymphocytes T. Ils démontrèrent que les interactions croisées entre les LTi-Like, les cellules stromales et les stimuli provenant du microbiote sont nécessaires et suffisants au recrutement des lymphocytes B, à l'induction de AID et à la commutation de

classe isotypique des IgM vers les IgA. D'une part, le LPS (Lipopolysaccharide) combiné à la co-culture avec des *LTi-Like* induit une augmentation de l'expression de MadCAM1, CCL20 et BAFF par les cellules stromales. D'autre part, le TNF- α sécrété par les DC iNOS⁺ et les *LTi-Like* induit la production de TGF- β mature nécessaire à la commutation de classe des IgM vers les IgA dans les ILF (Figure 30).

Cependant, la spécificité et la diversité des IgA T-indépendantes seraient inférieures à celles des IgA T-dépendantes. En effet, le laboratoire de Sidonia Fagarasan a rapporté que la diversité bactérienne du microbiote est altérée chez les souris déficientes en lymphocytes T (Fagarasan et al., 2002; Kawamoto et al., 2014). D'autre part, les IgA spécifiques de *SFB* ou *Mucispirillum* ne sont pas détectées dans la fraction qui recouvre les bactéries présentes dans les feces de souris déficientes en cellules T confirmant une perte de diversité et/ou d'affinité du répertoire B (Bunker et al., 2015). Le maintien de cette diversité pourrait reposer sur l'expression de PD1 par les Tfh (Kawamoto et al., 2012).

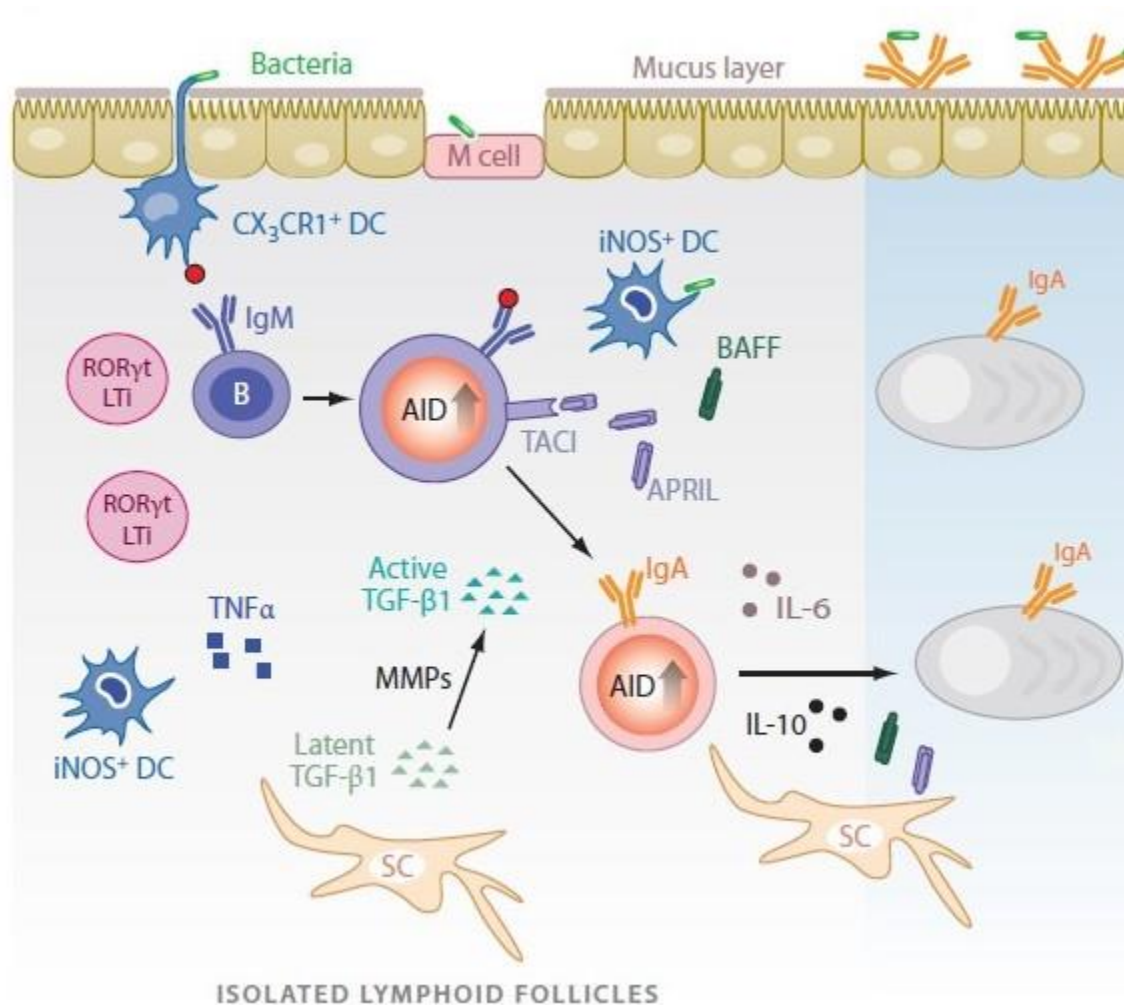


Figure 30 adaptée à partir de (Fagarasan et al., 2010): Génération des IgA de façon indépendante des lymphocytes T au sein des ILF. La génération d'IgA par les lymphocytes B peut s'effectuer en absence de lymphocytes T au sein des ILF. Les ILF sont des structures lymphoïdes solitaires non encapsulées et dispersées dans la lamina propria de l'intestin. Elles sont constituées en majorité de lymphocytes B, d'ILC3 et de cellules dendritiques tandis que les lymphocytes T sont très peu représentés. Les cellules présentatrices d'antigène CX3CR1⁺ situées sous les cellules M captent les antigènes provenant de la lumière intestinale en projetant leurs dendrites à travers les cellules épithéliales. Une fois activées les DC participent à l'activation d'AID par les lymphocytes B qui initie la commutation de classe isotypique. D'autre part, l'environnement riche en TNF-α induit la production de MMP par les cellules stromales environnantes permettant la maturation du TGF-β. En collaboration avec les facteurs de survie environnants (BAFF, APRIL) et l'expression de AID par les cellules B, le TGF-β induit la commutation isotypique des IgM vers les IgA. D'autre part, la sécrétion d'IL-6 et d'IL-10 par les cellules stromales environnantes induit la différenciation des lymphocytes B IgA⁺ en plasmocytes dans la lamina propria de l'intestin.

5. Le développement des CP et des ILF nommés tissus lymphoïdes solitaires intestinaux (SILT)

Au même titre que les ganglions mésentériques et les PP, les CP se développent de manière dépendante des LTI, avant la naissance et de manière programmée. Leur maturation donne naissance aux ILF dont la taille et la diversité cellulaire augmentent au fur et à mesure de la colonisation bactérienne (Figure 31). Plusieurs acteurs cellulaires et moléculaires sont nécessaires d'une part à la formation des CP et d'autre part à la maturation des CP en ILF.

a. Le rôle des LTI

Les CP se forment 14 jours après la naissance de la souris, indépendamment de la flore microbienne et de la voie de signalisation passant par NFκB nécessaire au développement des ganglions lymphatiques (Kanamori et al., 1996). Le développement de ces structures s'effectue tout d'abord par le regroupement et l'accumulation de LTI dans les cryptes de l'intestin grêle (Eberl and Littman, 2004; Kanamori et al., 1996). Comme pour le développement des LN et des PP, les LTI interagissent avec les cellules stromales par la voie $LT\alpha 1\beta 2/LT\beta R$ (Lorenz et al., 2003; Taylor et al., 2004). En effet, ces structures sont absentes chez les souris déficientes pour le gène *Rorc* ou *Ltbr* (Eberl et al., 2004; Sun et al., 2000). La formation des CP repose également sur des ligands d'Ahr comme les polyphénols et glucosinolates qui sont apportés par l'alimentation et transmis de la mère au fœtus. La délétion de *Ahr* au sein des ILC $ROR\gamma t^+$ abolit la formation des CP et des ILF tandis que le développement des PP et des LN n'est pas affecté (Kiss et al., 2011; Lee et al., 2011). Ainsi *Ahr* contrôle la formation des SILT de part son rôle essentiel dans le développement des ILC3 après la naissance (Hooper, 2011; Kiss et al., 2011; Lee et al., 2011).

b. Le rôle des Lymphocytes B

La maturation des CP en ILF se traduit par une accumulation de lymphocytes B au sein de CP dont le recrutement s'effectue grâce à la sécrétion de la chimiokine CXCL13 par les cellules stromales et les DC avoisinantes. Les lymphocytes B $CCR6^+$ sont ensuite recrutés en plus grande quantité suite à la production de la chimiokine CCL20 par les cellules épithéliales en réponse à la colonisation bactérienne (McDonald et al., 2007, 2010; Pabst et al., 2006). (Bouskra et al 2008)

c. Le rôle du microbiote intestinal

La paroi des bactéries constituant le microbiote intestinal est reconnue par le récepteur NOD1 exprimé par les cellules épithéliales de l'intestin. Ces dernières induisent alors l'expression de la chimiokine CCL20 qui favorise le recrutement des LB CCR6⁺ au sein des ILF (Bouskra et al., 2008). L'élaboration de modèles animaux dépourvus de flore bactérienne (Germ Free) a permis de démontrer que les CP se développent normalement en absence de microbiote contrairement aux ILFs (Pabst et al., 2006). Par ailleurs, le déficit en AID, enzyme indispensable à la commutation de classe et à la maturation d'affinité des Immunoglobulines, conduit à un déséquilibre de la flore commensale qui à son tour induit une augmentation du nombre et de la taille des ILF (Fagarasan et al., 2002). En conclusion, le développement des ILF n'est pas un processus programmé et nécessite l'intervention de certains facteurs environnementaux comme les ligands de AhR pour la formation des CP et la colonisation du tractus digestif par la flore commensale pour la maturation de ces dernières en ILF.

Nota bene : L'expression de la chimiokine CCL20 par les cellules épithéliales intestinales induit le recrutement des ILC3 CCR6⁺ (LTi-like) à proximité des cryptes, tandis que les ILC3 NKp46⁺ CCR6⁻ apparaissent plus dispersées dans la lamina propria de l'intestin.

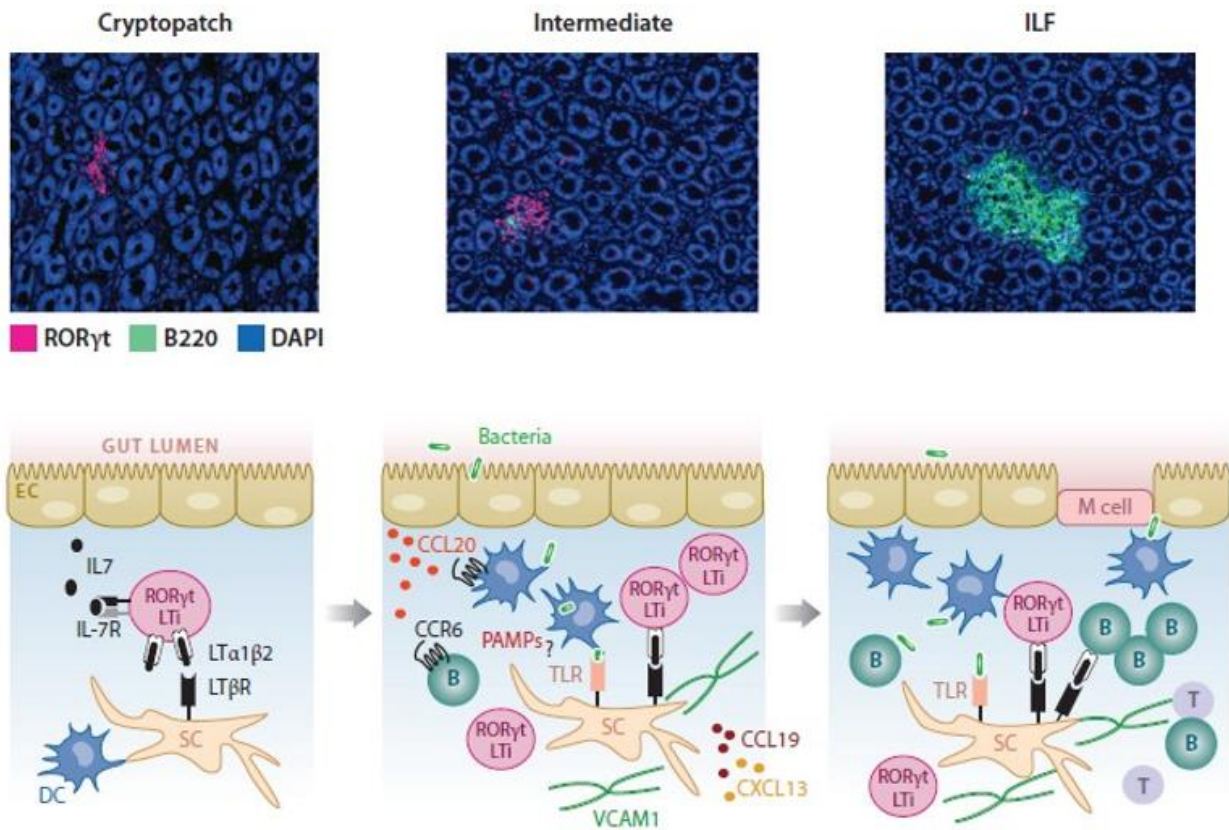


Figure 31 adaptée à partir de (Fagarasan et al., 2010) : Les différentes étapes de maturation des CP en ILF matures. Représentations de coupes histocytologiques de l'intestin grêle de souris déficientes pour ROR γ t reconstituées avec des LTI (3 sections du haut). Les LTI sont représentées en rose, les lymphocytes B en vert et l'ADN en bleu. Les 3 sections du bas schématisent les interactions cellulaires et moléculaires nécessaires au développement des CP (panel de gauche), des ILF immatures (panel du milieu) et des ILF matures (panel de droite). Les CP sont des tissus lymphoïdes dispersés dans la LP de l'intestin et se développent 14 jours après la naissance de la souris. Ils sont constitués de DC, de cellules stromales (SC) et en majorité de LTI. Les interactions entre les LTI et les cellules stromales via LT β /LT β R promeut le développement des CP. L'interaction SC/LTI induit la sécrétion par les SC de chimiokines telles que CXCL13 nécessaire au recrutement de lymphocytes B et à la formation des ILF immatures. Les cellules épithéliales surplombant les ILF immatures sécrètent la chimiokine CCL20 en réponse aux signaux activateurs provenant du microbiote. CCL20 induit le recrutement de cellules CCR6 $^{+}$ telles que les lymphocytes B, les DC ainsi que des LTI. En outre, les interactions croisées entre LTI (via LT β R), DC (via les TLR) et cellules stromales induisent le recrutement des lymphocytes B pour former les ILF matures.

6. Le développement des organes lymphoïdes tertiaires

Les tissus lymphoïdes tertiaires ou Tertiary Lymphoid Organs (TLO) constituent une catégorie particulière de MALT qui se développe suite à une réponse immunitaire ou à une inflammation locale (Lochner et al., 2011; Moyron-Quiroz et al., 2004; Shields et al., 2010; Spahn et al., 2002). Ainsi, les NALT (NALT=Nasal Associated lymphoid Tissues) et les BALT

(BALT=*Bronchus Associated lymphoid Tissues*) sont spécialisés dans le drainage de la cavité nasale et de l'arbre bronchique respectivement. Il a été démontré que des TLO peuvent se former en réponse à un stimulus inflammatoire aigu (colite au DSS) dans la lamina propria du colon chez des souris dépourvues de LTi (Lochner et al., 2011). Bien que la voie LTBR soit impliquée dans la formation de ces structures, la population hématopoïétique qui fournit le ligand $LT\alpha 1\beta 2$ aux cellules mésenchymateuses est constituée de lymphocytes B (Lochner et al., 2011). Par ailleurs, la production de CXCL13 et l'expression de la molécule d'adhérence VCAM-1 par les cellules stromales seraient nécessaires à la formation de ces TLO (Olivier et al., 2016).

a. Rôle des ILC dans la mise en place de la réponse immunitaire adaptative

Les ILC peuvent influencer directement ou indirectement les réponses immunitaires adaptatives. En effet, les ILC2 et les ILC3 expriment à leur surface des molécules de CMHII et peuvent donc interagir et présenter directement des antigènes aux lymphocytes T des ganglions. D'autre part, étant donné que les ILC représentent une population cellulaire répondant rapidement à leur environnement via la sécrétion de cytokines, elles peuvent agir indirectement sur la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T effecteurs de type TH2 ou TH1, via la sécrétion de molécules solubles telles que les cytokines de type 2 (IL-4) ou l'interféron gamma respectivement.

i. Les ILC3 jouent un rôle dans la sélection du répertoire T via le CMHII

Les équipes de David Artis et de Gregory Sonnenberg ont rapporté que les ILC3 $NKp46^-$ $CMHII^+$ jouent un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie intestinale en réprimant la réponse T $CD4^+$ dirigée contre les bactéries commensales (Hepworth et al., 2013, 2015b) (cf chapitre I-b-c). Ainsi, bien que les ILC3 $NKp46^-$ expriment la machinerie nécessaire à la présentation des antigènes par le CMHII, ces dernières induisent l'apoptose plutôt que l'activation et la prolifération des LT $CD4^+$ (Hepworth et al., 2013, 2015b). En effet, l'absence de molécules de co-stimulation (CD80, CD86, CD40) induirait l'anergie des lymphocytes T et

l'expression de molécules pro-apoptotiques (Bim et Nur77) entraînant leur mort sélective et programmée.

ii. Les ILC3 sécrétrices de Csf2 jouent un rôle dans la différenciation des Tregs

Le maintien de l'homéostasie intestinale fait intervenir diverses populations lymphoïdes telles que les lymphocytes T_H1 , T_H17 , Tregs et les ILC de type 3 (Hepworth et al., 2013; Mortha et al., 2014). Par ailleurs, certaines populations myéloïdes comme les macrophages et les DC interviennent de part leur capacité à interagir directement avec les bactéries de la flore intestinale et à stimuler les ILC3 et les lymphocytes T (cf chapitre II-d). L'équipe de Myriam Merad a récemment démontré que Les ILC3 participent indirectement à la génération de Tregs induites via la sécrétion de GM-CSF (Mortha et al., 2014). Ainsi l'IL-1 β d'origine myéloïde stimule la production de GM-CSF par les ILC3 qui contribue à son tour au maintien de la fonction inductrice de Tregs au sein des cellules myéloïdes (RALDH, TGF β et IL-10).

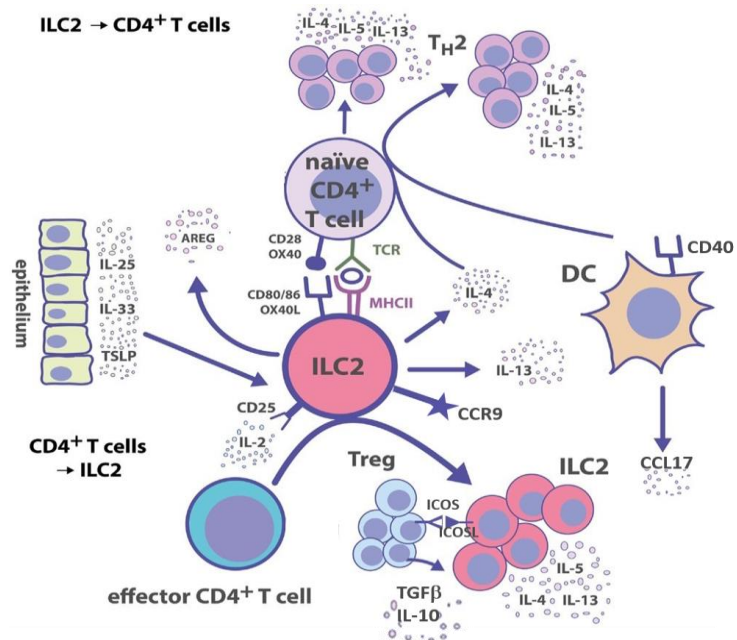
iii. Les ILC2 favorisent la différenciation et le recrutement des T_H2

Deux études majeures ont mis en évidence l'impact des ILC2 sur la potentialisation des lymphocytes T_H2 dans un modèle d'allergie respiratoire induite par la papaine (Halim et al., 2014, 2015). Au cours de la réponse primaire, la sécrétion d'IL-13 par les ILC2 induit la migration des DC CD40⁺ vers les ganglions favorisant ainsi la différenciation des lymphocytes T naïfs en T_H2 (Halim et al., 2014). Au cours de la réponse secondaire, l'IL-13 produite par les ILC2 active la production de la chimiokine CCL17 par des DC spécialisées, attirant ainsi les T_H2 mémoire sur le site inflammatoire (Halim et al., 2015).

iv. La collaboration ILC2/ T_H2 promeut l'immunité anti-parasitaire de type 2

Le rôle des molécules du CMH de classe II exprimées par les ILC2 dans la réponse anti-parasitaire a récemment été mis en évidence (Oliphant et al., 2014). La majorité (70%) des ILC2 exprime les CMHII à l'état d'équilibre suggérant un rôle important pour ce complexe dans

la réponse de type 2. En effet, l'élimination du parasite intestinal Nb est retardée chez des souris déficientes en IL-13 reconstituées avec des ILC2 déficientes pour les molécules du CMH de classe II confirmant le rôle de ce complexe dans la réponse anti-parasitaire. D'autre part, les auteurs ont mis en évidence le rôle des signaux de co-stimulation CD80/CD86 procurés par les ILC2 dans l'activation des lymphocytes T *in vitro*. *In vivo*, l'IL-2 produite par les lymphocytes T_H2 activés lors de la réponse anti-parasitaire augmente significativement la sécrétion d'IL-13 par les ILC2. Ainsi la collaboration ILC2/T_H2 favorise non seulement l'activation des Th2 mais elle augmente également l'efficacité des ILC2 dans l'élimination du parasite.



INTESTINE

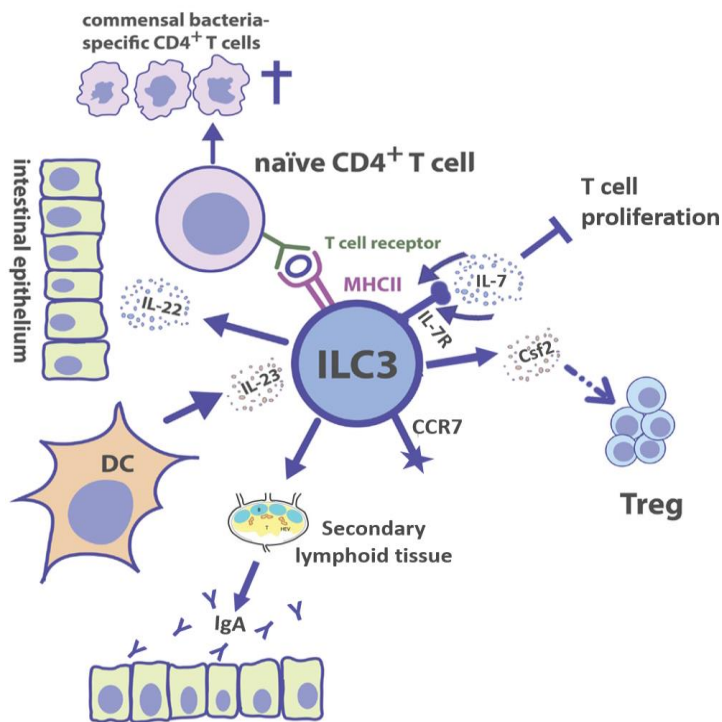


Figure 32 Dialogue ILC/lymphocytes T adaptée à partir de (von Burg et al., 2015) : Haut : Résumé schématique du dialogue ILC2/lymphocytes T_H2 et lymphocytes T régulateurs. Bas : résumé schématique du dialogue ILC3/lymphocytes T $CD4^+$ et microbiote intestinal.

b. Régulation des ILC par le système immunitaire adaptatif

Malgré la redondance entre les ILC et les lymphocytes T, le dialogue entre ces deux types cellulaires est essentiel au cours de la réponse antiparasitaire de type 2 (précédent chapitre) et pour la sélection du répertoire des lymphocytes T CD4⁺ spécifiques des antigènes du microbiote (cf chapitre III-b et II-a). Cependant, il existe diverses situations où le système immunitaire adaptatif est immature ou affecté (naissance, vieillissement, leucémie..). Nous pouvons alors nous interroger sur le rôle des ILC dans ce contexte. Ces dernières compenseraient-elles l'absence des lymphocytes T ? La régulation des ILC est-elle impactée dans ces conditions ? Après avoir abordé les travaux concernant le rôle des ILC dans la régulation des réponses T, je vais passer en revue les données publiées sur la régulation des ILC par le système immunitaire adaptatif.

i. La régulation des ILC3 par le système immunitaire adaptatif (SIA)

En 2014, Korn et al. a publié la première étude relatant du rôle des lymphocytes T CD4⁺ dans la régulation de l'homéostasie des ILC3 résidentes de l'intestin grêle (Korn et al., 2014). En effet, les ILC3 jouent un rôle crucial dans le maintien de la barrière intestinale via la sécrétion d'IL-22 (Chapitre I-b). Cependant, les auteurs observent que la barrière intestinale des souris RAG^{-/-} est fortement affaiblie (diminution de la production des peptides antimicrobiens (PAM)) en absence de système immunitaire adaptatif et constatent également une augmentation drastique du nombre d'ILC3 et de la sécrétion d'IL-22 par ces cellules. La reconstitution du compartiment T fut suffisante pour rétablir la fonction et le nombre des ILC3 dans les intestins ainsi que la sécrétion des PAM. Cela confirme le rôle des lymphocytes T CD4⁺ dans la régulation négative des ILC3 résidentes des intestins. L'un des premiers objectifs de mon travail de thèse a été d'étudier le/les mécanisme(s) nécessaire(s) à cette régulation. L'équipe de Yasmine Belkaid s'est également intéressée à ce(s) mécanisme(s) de régulation (Mao et al., 2018). Ils ont déterminé que les ILC3 anormalement activées au sein des souris RAG^{-/-} ou Tcr α ^{-/-}, expriment le facteur de transcription STAT3 phosphorylé (pSTAT3). Cette signature transcriptionnelle des ILC3 serait induite par des signaux provenant du microbiote intestinal. Les auteurs démontrent également que les lymphocytes T CD4⁺ (Tregs, T_H17)

préviennent indirectement la phosphorylation et l'activation des ILC3 en agissant respectivement sur la composition de la flore microbienne et la production d'IL-23 par les cellules dendritiques.

ii. Les iTregs régulent négativement la fonction des ILC2 dans le cadre de l'asthme induite

Etant donné le rôle suppresseur des lymphocytes Tregs en conditions inflammatoires, Rigas et al se sont intéressés à la modulation des ILC2 par les lymphocytes Tregs dans le cadre d'un modèle d'asthme induit chez la souris (Rigas et al., 2017). Les auteurs ont observé *in vitro* que les Tregs induites (iTregs) ont la capacité de réprimer la sécrétion de cytokines de type 2 par les ILC2 via des interactions ICOS-ICOSL (ICOS= *Inducible T cell COStimulator*). D'autre part, dans le cadre d'un modèle d'asthme induit, le co-transfert d'ILC2 et d'iTregs au sein de souris NSG (NSG= *NOD scid gamma*) induit la suppression des symptômes médiés par l'AHR (AHR= *Airway HyperResponsiveness*). Ainsi, les Tregs pourraient agir directement sur la fonction des ILC2 dans un contexte inflammatoire. En revanche, aucune donnée ne font état du/des mécanisme(s) de régulation de l'homéostasie des ILC2 par les cellules du SIA à l'état d'équilibre. Cette question a donc fait l'objet du deuxième volet de mon travail de thèse.

Ce basant sur ces aspects de la littérature, l'objectif principal de ma thèse a été d'évaluer le rôle du système immunitaire adaptatif dans la régulation de la composition et de la fonction des ILC2 et des ILC3 à l'état d'équilibre, dans les intestins et les ganglions lymphatiques des souris déficientes en lymphocytes T ($CD3\epsilon^{-/-}$).

IV. PROBLEMATIQUE

De nombreuses études ont rapporté que les ILC participent à l'homéostasie tissulaire via la réparation des tissus endommagés (poumons, intestins, thymus). Les ILC jouent également un rôle dans les réponses anti-microbiennes (virus, bactéries, parasites et champignons) et le confinement du microbiote intestinal (cf chapitre II). 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 collaborations entre les ILC et les cellules du système immunitaire adaptatif ne sont pas prises en compte, 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 l'entéropathogène murin *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⁺ 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 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 monter de meilleures réponses anti-parasitaire de type 2 et pour assurer la sélection négative des lymphocytes T CD4⁺ spécifiques des antigènes du microbiote en périphérie (cf chapitre III-b et II-a).

Cependant, il existe diverses situations où le système immunitaire adaptatif est immature ou affecté (naissance, vieillissement, leucémie..). Nous pouvons alors nous questionner sur le rôle des ILC dans ce contexte. Ces dernières compenseraient-elle un déficit en lymphocytes T ? La régulation des ILC est-elle impactée dans ces conditions ?

Les travaux de plusieurs équipes scientifiques 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 *TCRβδ*^{-/-} (Korn et al., 2014; Mao et al., 2018) tandis que la fréquence des ILC2 augmente dans les mLN au détriment des ILC3 CCR6⁺ (Mackley et al., 2015). Le rétablissement de la réponse adaptative par transfert adoptif de splénocytes ou de lymphocytes T CD4⁺ 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⁺) 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, le laboratoire a fait l'observation de modifications du nombre et de la composition des ILC dans les mLN et la *lamina propria* de l'intestin de souris déficientes en lymphocytes T (CD3 ϵ ^{-/-}). Alors que la fréquence et l'activité des ILC3 NKp46⁺ se trouvent significativement augmentées dans la *lamina propria* de l'intestin de ces souris, les ILC sécrétrices de cytokines type 2 deviennent majoritaires au sein de mLN 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 projet de thèse a été de décrire certains des mécanismes par lesquels les lymphocytes T participent à la régulation de l'homéostasie des ILC.

- Par quels facteurs tissulaires et environnementaux les ILC des intestins et des ganglions mésentériques (mLN) sont-elles activées en absence de cellules T ?
- Ces facteurs sont-ils identiques dans ces deux tissus ?
- Comment les lymphocytes T agissent-ils sur ces facteurs pour contrôler le nombre et l'activité des ILC dans chacun de ces tissus?

V. RESULTATS

a. Article en préparation

CD4⁺ T cells regulate the homeostasis of Mesenteric Lymph Nodes ILC2 and Gut-resident ILC3 through distinct mechanisms

Priscillia Bresler¹, Emmanuel Tejerina¹, Jean Marie Jacob², Agnes Legrand¹, Véronique Quellec¹, Sophie Ezine¹, Lucie Peduto², Marie Cherrier¹

1 Institut Necker Enfants Malades, Université Paris Descartes, INSERM U1151, CNRS UMR 8253, 14 rue Maria Helena Vieira Da Silva, Paris

2 Institut Pasteur, INSERM U1124, Stroma, Inflammation et réparation tissulaire, 25 rue du Docteur Roux, Paris

Corresponding author: Marie Cherrier (marie.cherrier@inserm.fr)

b. Introduction

Les ILC représentent une population lymphoïde Lin⁻ CD45⁺ IL-7R α ⁺ majoritairement résidente au sein des tissus (lymphoïdes et non lymphoïdes) ayant une demi-vie de 3 semaines (Cherrier and Eberl, 2012). Nos diverses analyses de la composition des ILC par cytométrie en flux montrent qu'à l'état d'équilibre le pourcentage d'ILC totales parmi les cellules hématopoïétiques varie en moyenne entre 0,2% dans les ganglions et 5% dans la *lamina propria* de l'intestin d'un organisme murin immunocompétent. Cependant, nous avons observé une augmentation significative du pourcentage d'ILC totales chez les souris déficientes en lymphocytes T. Celui-ci atteint en moyenne 1,4% dans les ganglions mésentériques (mLN) et 22% dans les intestins tandis qu'une légère augmentation est observée dans les ganglions périphériques (pLN), passant de 0,2 à 0,5%. Ces modifications suggèrent que les lymphocytes T participent à l'équilibre homéostatique des ILC au sein de ces tissus. Certains mécanismes de régulation des lymphocytes T par les ILC ont été mis en évidence récemment. A l'inverse, la manière dont les lymphocytes T régulent les ILC reste en partie incomprise. Dans la première partie de l'article nous rapportons que la régulation de la fréquence et de l'activité des ILC3 NKp46⁺ dans la *lamina propria* de l'intestin repose sur la capacité des lymphocytes T CD4⁺ à participer au confinement du microbiote intestinal. Dans la seconde partie, nous décrivons un des mécanismes de régulation des ILC2 par les lymphocytes T basé sur la régulation indirecte de l'expression de l'alarmine IL-33 au sein des ganglions mésentériques.

c. Hypothèses de travail

i. 1^{ère} hypothèse

Plusieurs équipes ont rapporté que les ILC3 de la *lamina propria* de l'intestin sont anormalement activées au sein des souris immunodéficientes *Rag*^{-/-} ou *TCRβδ*^{-/-} (Korn et al., 2014; Mao et al., 2018). Notre équipe de recherche a également fait l'observation de modifications du nombre et/ou de la composition des ILC3 dans les mLN et la *lamina propria* de l'intestin de souris *CD3ε*^{-/-} avant et après sevrage (cf article en préparation). Alors que le nombre et l'activité des ILC3 NKp46⁺ se trouvent significativement augmentés dans la *lamina propria* de l'intestin, la fraction d'ILC3 CCR6⁺ devient minoritaire dans les mLN uniquement après le sevrage. L'arrêt de l'allaitement et le passage à une nourriture solide (sevrage) induit des modifications dans la composition du microbiote intestinal et l'abondance des bactéries commensales de l'intestin qui pourraient jouer un rôle majeur dans l'activation des ILC3 en absence de cellules T (Gomez de Agüero et al., 2016; van de Pavert et al., 2014b; Sawa et al., 2010).

En effet le rôle du microbiote intestinal dans l'activation des ILC3 de la *lamina propria* a pu être mis en évidence chez des animaux immuno-compétents grâce à des modèles murins axéniques ou gnotobiotiques (axéniques colonisées par une ou plusieurs espèces bactériennes commensales). Plusieurs articles ont rapporté qu'au sein des souris « *Germ-Free* » la proportion d'ILC3 NKp46⁺ est significativement diminuée dans la *lamina propria* de l'intestin, confirmant le rôle du microbiote sur l'homéostasie de ces cellules (Sanos et al., 2009; Satoh-Takayama et al., 2008b; Vonarbourg et al., 2010) (cf chapitre II-b). Concordant avec ces précédentes observations, il a été récemment décrit que la bactérie commensale *SFB* (*Segmented Filamentous Bacteria*) suffit pour induire l'activation des ILC3 résidentes de l'intestin grêle (Ivanov et al., 2009; Kawamoto et al., 2014; Mao et al., 2018; Sano et al., 2016) (cf chapitre II-b).

D'autres travaux de la littérature suggèrent également que les ILC3 pourraient être anormalement activées par le microbiote en absence d'immunité adaptative. D'une part, l'équipe de S. Fagarasan a rapporté que la diversité du microbiote intestinal est altérée au sein des souris *CD3ε*^{-/-} (Kawamoto et al., 2014). D'autre part, l'équipe de Y. Belkaid a rapporté que le transfert adoptif de lymphocytes T_H17 ou de Tregs permettrait de réguler le nombre et la

fonction des ILC3 dans la *lamina propria* de l'intestin de souris *Rag*^{-/-} (Korn et al., 2014; Mao et al., 2018). Cela suggère que le microbiote intestinal pourrait être un facteur d'activation important pour les ILC en absence de cellules T du fait :

- d'un déséquilibre de la flore commensale
- d'une activation accrue de l'immunité innée via les cellules épithéliales intestinales et les cellules myéloïdes

Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que le rôle exercé par les lymphocytes T dans le confinement du microbiote intestinal pourrait être un facteur déterminant dans la régulation des ILC3 de l'intestin et des ganglions mésentériques.

ii. 2^{ème} hypothèse

Mackley et al ont rapporté que les ILC2 sont en proportion normale dans la *lamina propria* de souris lymphopéniques *Rag*^{-/-} mais significativement élevées dans les ganglions mésentériques de ces dernières (Mackley et al., 2015). Nous avons fait la même observation chez des souris dépourvues de lymphocytes T au sein desquelles la fraction des ILC sécrétrices de cytokines de type 2 (IL-13 et IL-5) est significativement augmentée dans les mLN (cf article en préparation).

Les raisons de cette dérégulation restent à ce jour inconnues. Contrairement aux ILC de type 3, le lien entre ILC2 et microbiote reste peu décrit et mal compris. L'induction et le recrutement de lymphocytes Treg dans l'intestin pour induire la tolérance alimentaire (Kim et al., 2016) pourrait participer à la régulation des ILC2 cependant, aucun article n'a confirmé cette hypothèse à ce jour. D'autre part, Rigas et al ont rapporté que les lymphocytes Tregs ont une activité suppressive envers les ILC2 dans un contexte d'asthme induit. Aussi, les lymphocytes T et les ILC2 consomment les mêmes facteurs de croissance (IL-2, IL-7) et les Tregs sensibles à l'alarmine IL-33 pourraient entrer en compétition avec les ILC2 pour cette molécule sécrétée majoritairement par les cellules non-hématopoïétiques des ganglions lymphatiques (Pichery et al., 2012) (Liew et al., 2016).

Nous faisons l'hypothèse que la déficience en lymphocytes T (Tregs inclus) a un impact sur l'environnement tissulaire du ganglion (production d'alarmines, disponibilité des facteurs de survie et de croissance) qui favorise l'expansion et l'activation des ILC2 dans les mLN. Cet aspect est traité dans le deuxième volet de l'article.

d. Stratégies expérimentales

i. 1^{ère} hypothèse

Nous avons tout d'abord analysé la composition et la fonction des ILC au sein de plusieurs tissus (mLN, pLN, *lamina propria* de l'intestin grêle), en présence et en absence de lymphocytes T, afin d'évaluer l'impact de ces derniers sur l'homéostasie des ILC à l'état d'équilibre avant et après le sevrage.

Les lignées murines utilisées pour ces analyses sont les suivantes :

- CD3 ϵ ^{-/-} CD45-1
- C57BL/6J ROR γ t-GFP (références).
- CD3 ϵ ^{-/-} ROR γ t-GFP et CD3 ϵ ^{+/-} ROR γ t-GFP. Les lignées CD3 ϵ ^{-/-} CD45-1 et B6 ROR γ t-GFP ont été croisées afin d'obtenir des animaux homozygotes et hétérozygotes pour la mutation CD3 ϵ dans la même portée et de pouvoir détecter l'expression de ROR γ t grâce au reporteur GFP.

La composition des ILC a été analysée par cytométrie en flux en utilisant les combinaisons suivantes de marqueurs pour définir les principaux sous types d'ILC (Figure 33, Tableau 1).

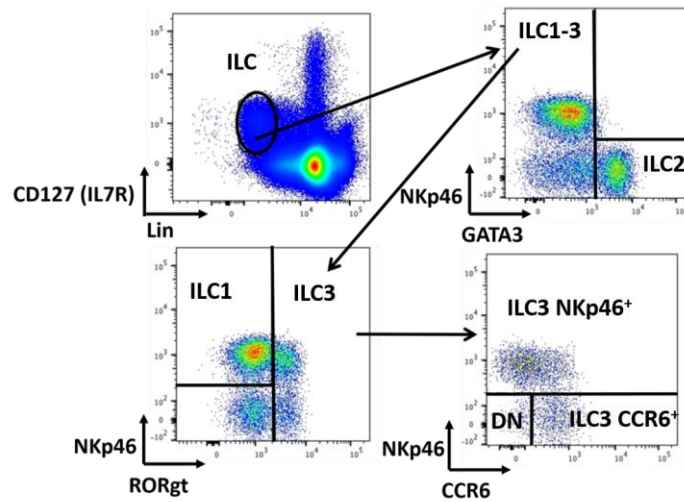


Figure 33 : Stratégie d'analyse des sous-types d'ILC par cytométrie en flux (ganglions mésentériques): Les ILC expriment le récepteur à l'IL-7 (CD127) en absence de marqueurs de lignage (Lin⁻). Au sein de la fraction Lin⁻ CD127⁺, les ILC2 expriment fortement GATA-3. Au sein des ILC GATA-3^{int/-}, les ILC exprimant NKp46 en absence de RORγt sont considérées comme des ILC1. Les ILC3 expriment RORγt et sont constituées d'une population NKp46⁺, d'une population CCR6⁺ et d'une population n'exprimant aucun de ces marqueurs (DN : NKp46⁻ CCR6⁻).

	Sous-type d'ILC	Marqueurs
Lignage : CD3ε ⁻ , TCRαβ, TCRβδ, B220, CD19, TER-119, GR-1, CD11c, CD11b	ILC1	Lin ⁻ , IL-7Rα ⁺ (CD127 ⁺), NKp46 ⁺ , RORγt ⁻ , GATA3 ⁻ , KLRG1 ⁻
	ILC2	Lin ⁻ , IL-7Rα ⁺ (CD127 ⁺), NKp46 ⁻ , RORγt ⁻ , GATA3 ⁺ , KLRG1 ⁺
	ILC3	Lin ⁻ , IL-7Rα ⁺ (CD127 ⁺), NKp46 ^{+/-} , RORγt ⁺ , GATA3 ^{int} , KLRG1 ⁻
	LTi ILC3 NKp46 ⁺ ILC3 DN	Parmi les ILC3 NKp46 ^{+/-} RORγt ⁺ : CCR6 ⁺ , NKp46 ⁻ CCR6 ⁻ , NKp46 ⁺ CCR6 ⁻ , NKp46 ⁻

Tableau 2: Récapitulatif des marqueurs utilisés pour l'identification des sous-types d'ILC murines par cytométrie en flux.

La sécrétion des cytokines IL-5, IL-13, IL-17A, IL-22 a également été mesurée par cytométrie en flux au sein de la globalité des ILC dans chacun de ces tissus après re-stimulation *ex vivo* en présence de PMA (PMA= Phorbol 12-Myristate 13-Acetate), Ionomycine, Brefeldine A et d'IL-23 dans le cas de la détection d'IL-22.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'impact du microbiote intestinal sur la composition et la fonction des différentes sous-populations d'ILC en faisant varier deux paramètres :

1-La présence ou l'absence de microbiote intestinal en traitant les souris dès la naissance avec un cocktail d'antibiotiques à large spectre.

2-La présence ou l'absence de lymphocytes T au sein des souris traitées aux antibiotiques dès la naissance

Troisièmement, nous avons abordé l'effet d'une reconstitution du compartiment T sur la régulation des ILC à l'aide de greffes de lobes thymiques et de transferts adoptifs de différentes sous populations de lymphocytes T dans les souris CD3 ϵ ^{-/-}.

Les IgA générées de manière dépendante des lymphocytes T dans les Plaques de Peyer jouent un rôle crucial dans le confinement et la diversification des bactéries commensales (Chapitre III-2). Par conséquent, nous avons étudié le rôle de la coopération T-B dans la régulation de l'activité des ILC3. Ainsi, nous avons procédé à l'étude de la composition des ILC dans les ganglions et la *lamina propria* de souris Rag2^{-/-} déficientes en lymphocytes T et B ou reconstituées avec des lymphocytes T. Cette analyse figure dans les résultats complémentaires non publiées de ce mémoire de thèse (cf schéma expérimental [figure 34](#)).

ii. 2^{ème} hypothèse

Nous avons analysé par qPCR l'expression des alarmines suivantes IL-25, IL-33 et TSLP dans les mLN et l'iléon distal de l'intestin grêle afin d'identifier les facteurs responsables de l'activation des ILC2 en absence de lymphocytes T. Celle-ci a révélé une augmentation significative de l'expression des transcrits codant pour l'IL-33 dans les mLN des souris déficientes en lymphocytes T par comparaison aux souris contrôles immunocompétentes. Nous avons pu

confirmer le rôle de cette alarmine dans la régulation des ILC2 via la neutralisation de l'IL-33 environnante au sein des souris déficientes de lymphocytes T (cf schéma expérimental [figure 34](#)).

La source cellulaire de cette molécule est essentiellement non hématopoïétique, le compartiment stromal des ganglions étant un candidat de choix, nous avons mis en place une collaboration avec l'équipe de Lucie Peduto spécialisée dans l'étude du stroma. Cette collaboration nous a permis de comparer l'expression de l'IL-33 par les cellules stromales des mLN dans plusieurs conditions : souris déficientes et compétentes en cellules T ou déficientes reconstituées avec des lymphocytes T.

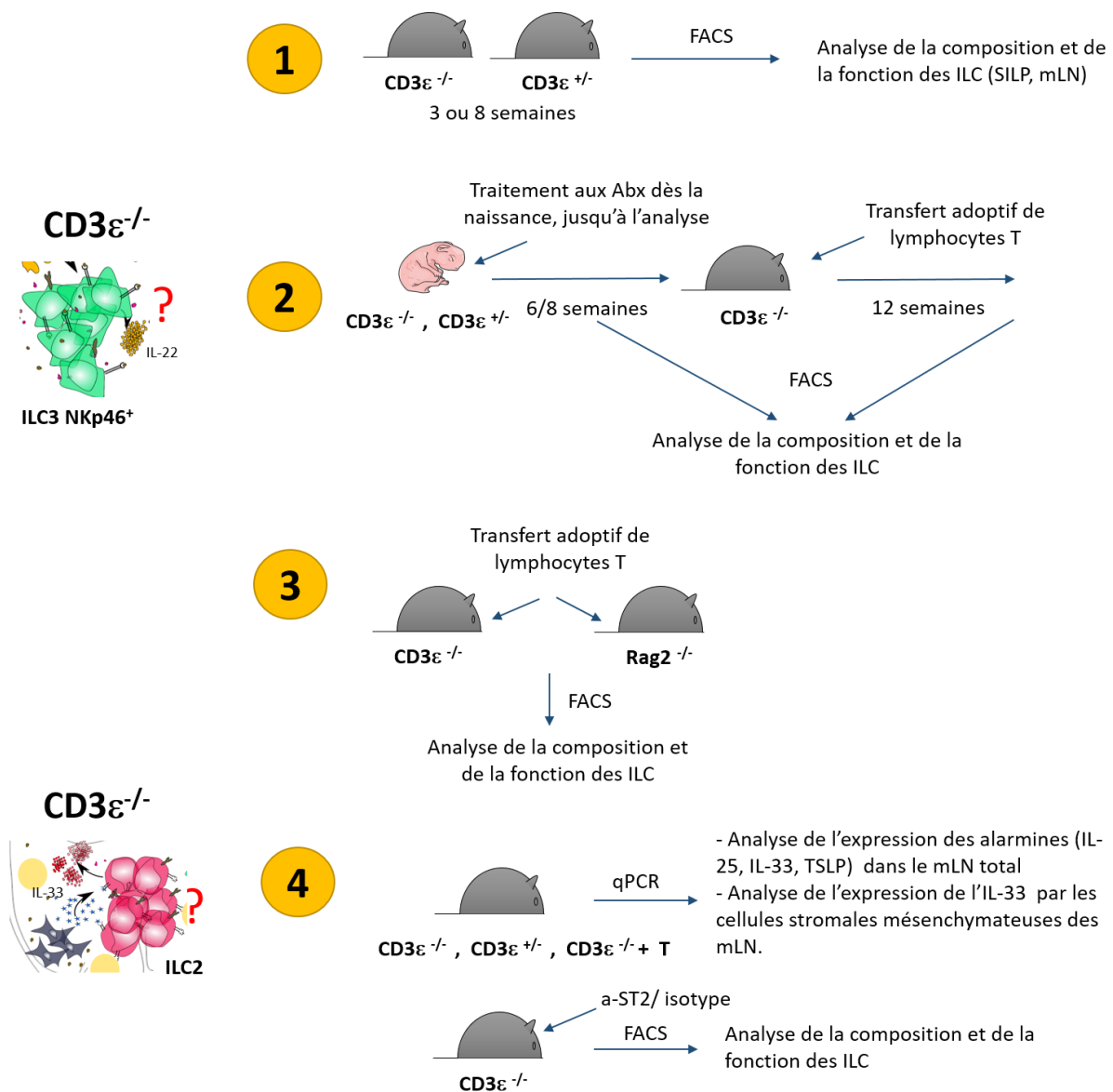


Figure 34 : Stratégie expérimentale du travail de recherche : 1) Analyse de la composition et de la fonction des ILC dans les ganglions mésentériques, périphériques et la *lamina propria* de l'intestin de souris $CD3\epsilon^{-/-}$ et $CD3\epsilon^{+/-}$ à l'état d'équilibre. **2)** Traitement des souris $CD3\epsilon^{-/-}$ et $CD3\epsilon^{+/-}$ dès la naissance avec un cocktail d'antibiotiques à large spectre afin d'évaluer l'impact du microbiote et de la déficience en lymphocytes T sur l'homéostasie des ILC. **3)** Transfert adoptif de différentes sous-populations de lymphocytes T afin d'évaluer leur rôle dans la régulation des ILC en périphérie. **4)** Mesure de l'expression de l'IL-33 par qPCR et neutralisation de l'alarmine afin d'évaluer son rôle dans l'activation des ILC2 en absence de lymphocytes T.

CD4⁺ T cells regulate the homeostasis of Mesenteric Lymph Nodes ILC2 and Gut-resident ILC3 through distinct mechanisms

Priscillia Bresler¹, Emmanuel Tejerina¹, Jean Marie Jacob², Agnès Legrand¹, Véronique Quéllec¹, Sophie Ezine¹, Lucie Peduto², Marie Cherrier¹

¹ Institut Necker Enfants Malades, Université Paris Descartes, INSERM U1151, CNRS UMR 8253, 14 rue Maria Helena Vieira Da Silva, Paris

² Institut Pasteur, INSERM U1124, Stroma, Inflammation et réparation tissulaire, 25 rue du Docteur Roux, Paris

Corresponding author: Marie Cherrier (marie.cherrier@inserm.fr)

Abstract

Innate lymphoid cells have recently emerged as key regulators of innate and adaptive immunity in the context of host-microbe interactions, lymphoid organogenesis, tissue remodeling and metabolism. ILCs and T cells can be complementary or redundant in each of these processes suggesting that a constant dialogue between these two cell types is necessary for optimal immune and metabolic fitness. While ILCs were shown to play important roles in the polarization and selection of effector T cells, it remains unclear whether adaptive immunity can shape the composition, the activity and the fitness of ILCs in return. Here we show that T cells regulate ILC homeostasis through distinct mechanisms depending on the ILC subtype and tissue microenvironment. In mesenteric lymph nodes, T cells antagonize stroma-derived IL-33 dependent expansion and cytokine production of tissue-resident ILC2. In the small intestine, T cells indirectly suppress IL-22 production by ILC3 through the containment of gut commensal bacteria. These observations confirm that the cross talk between ILCs, adaptive immune cells and micro-environmental cues is key to maintain ILCs as quiescent sentinels. Such interactions may also prevent deregulated activation of ILCs that was shown to promote the development of immune disorders such as inflammatory diseases and allergies.

Introduction

Emerging research has implicated Innate Lymphoid Cells (ILCs) as critical immune cell populations that orchestrate host-commensal bacteria relationships and impact immunity, inflammation and tissue homeostasis ^{1,2}. ILCs are frequent at mucosal sites and closely associated with airways and intestinal epithelial barriers. To date three

main ILC subsets have been described based on developmental and functional homologies with helper T cells.

- Group 1 ILCs (ILC1) express T-bet, they are not cytotoxic and produce IFN γ in the context of immune responses against intra and extracellular pathogens.
- Group 2 ILCs (ILC2) express GATA-3 and produce IL-5 and IL-13 in response to epithelial cell derived IL-25 and IL-33 upon infection with intestinal worms and respiratory viruses. They are also involved in allergy and asthma as well as in adipose tissue homeostasis.
- Group 3 ILCs (ILC3) express the retinoic acid related orphan receptor gamma t (ROR γ t). During embryogenesis, fetal ILC3 named Lymphoid Tissue inducer cells (LTis) initiate the formation of secondary lymphoid organs (SLOs). After birth, CCR6⁺ ILC3 also called LTi-like cells and IL-22 producing NKp46⁺ ILC3 participate in the protection of the epithelial barrier after colonization of the gut by commensals. In contrast with conventional T cells, ILCs provide rapid reactivity and immune defense in the early period following pathogen encounter. Moreover, the constitutive production of certain soluble factors by ILCs induces steady-state stimulation of intestinal and respiratory epithelia thereby providing a 'pre-emptive' immune defense.

Both T cells and ILCs are involved in intestinal homeostasis and immunity. ILCs were recently shown to be redundant in mice and humans in which T cells are present, diverse and fully functional^{3,4,5}. However, there are many situations in life in which this is not the case, for instance infections, leukemia, infancy and aging. Therefore a dialogue between T cells and ILCs is necessary to coordinate optimal immune responses in each of these situations⁶. It has been shown that ILCs have the capacity to promote and/or to modulate T cell responses towards microbiota-derived antigens^{7,8}. Whether and how T cells can in turn shape the composition and the activity of ILCs still needs to be investigated. RAG and T cell deficient mice harbor deregulated ILC populations in secondary lymphoid organs and in the intestine suggesting that adaptive immunity plays an essential role in the homeostasis of these populations^{9,10,11}. However, little is known about the functional requirements for the adaptive immune system to regulate the number, the composition, the activity and the fitness of ILCs throughout life. Additionally it is unclear to which extent adaptive immunity participates in the modulation of these innate effectors and maintains them as quiescent sentinels.

We closely analyzed the composition and the activity of ILCs in mice that are devoid of T cells and showed that constitutive T cell deficiency results in strikingly different functional and homeostatic outcomes for ILCs depending on the tissue in which they reside. Consistently with previous reports, we show that IL-22 producing NKp46⁺ ILC3 as well as ILC3 residing in cryptopatches and Isolated Lymphoid Follicles (ILFs) are increased in the lamina propria of the small intestine (SILP) of T cell deficient mice. In contrast, a major shift towards type 2 innate immunity was observed in the lymph nodes

draining the intestine. Adoptive transfers of T cells and antibiotic treatment confirmed that distinct mechanisms and micro-environmental cues account for the differences observed between lymphoid tissue and gut resident ILCs of T cell deficient mice. In the mesenteric lymph nodes, T cells could suppress stroma derived IL-33 dependent expansion of tissue-resident ILC2. In the small intestine, T cells indirectly antagonize IL-22 production by ILC3 through the containment of gut commensal bacteria. These observations suggest that the cross talk between adaptive immune cells and tissue micro-environmental cues is key to prevent deregulated activation of ILCs that may promote the development of immune disorders such as food allergies and inflammatory diseases.

Results

Constitutive T cell deficiency results in different functional and homeostatic outcomes depending on the tissue in which ILCs reside

In order to address whether and how T cells participate in the regulation of ILC homeostasis, the composition and the activity of ILCs were analyzed in the Small Intestine Lamina Propria (SILP), mesenteric Lymph Nodes (MLNs) and peripheral Lymph Nodes (PLNs) of T cell deficient mice ($CD3\epsilon^{-/-}$) and compared with control littermates ($CD3\epsilon^{+/+}$) before and after weaning. In weaned (8 weeks old) T cell deficient mice, the fraction of $NKp46^{+}$ ILC3 among $CD45^{+}$ cells was significantly increased in the SILP (Fig.1A and C) as well as the frequency of IL-22 producing ILCs compared to control littermates (Fig. 1G and I). Consistently with what was previously reported by Fagarasan et al.¹² the number of mature Isolated Lymphoid Follicles was also significantly increased in the SILP of weaned T cell deficient mice compared to control littermates (SFig. 1). Changes in the composition of ILCs were also observed in the mesenteric lymph nodes (MLNs) of weaned T cell deficient mice but they did not recapitulate those of the SILP. The frequency of type 2 ILCs (Fig.1 A and B) and the fraction of $CD45^{+}$ Lin^{-} $CD127^{+}$ cells producing IL-5 and IL-13 were significantly increased in MLNs compared to control littermates (Fig 1G and H). Additionally, although the fraction of type 3 ILCs was not significantly affected in the absence of T cells, the proportion of DN ($NKp46^{-}$ $CCR6^{-}$) ILC3 was significantly increased at the expense of $CCR6^{+}$ ILC3 in the MLNs of T cell deficient mice (Fig.1D and E). Finally the frequency of each ILC subset was increased in the peripheral lymph nodes of weaned T cell deficient mice leaving the composition of ILCs unaffected (SFig. 2). Consistently, the fraction of Lin^{-} $CD127^{+}$ cells secreting type 2 cytokines was also significantly increased in the peripheral lymph nodes of T cell deficient mice compared to control littermates (SFig. 2). The composition of commensal bacteria colonizing the intestinal tract was shown to undergo drastic changes upon weaning. Moreover, the composition and the activity of SILP ILCs change around that time with $NKp46^{+}$ ILC3 becoming

predominant while the fraction of CCR6⁺ ILC3 that includes “LTI-like” cells is reduced^{13,14}. In order to evaluate the effect of weaning on the homeostasis of ILCs in the absence of T cells, we analyzed the composition of ILCs in the MLNs and SILP of T cell deficient and control littermates before weaning at 3 weeks of age (Fig. 1B and C, Fig. 1E and F). In the MLNs, the fraction of CCR6⁺ ILC3 (LTI-like cells) was significantly increased in T cell deficient mice compared to control littermates (Fig. 1E). In contrast, the proportion of these cells was significantly reduced in the MLNs of T cell deficient mice after weaning (Fig. 1E). We observed that T cell deficiency has little impact on the composition of other ILC subsets in the MLNs and SILP before weaning (Fig. 1B and C) suggesting that the transition from milk to solid food and the associated changes in the intestinal microbial community^{15,16} may play an essential role in the regulation of ILC homeostasis by adaptive immunity.

Commensal bacteria play a major role in the activation of ILC3 in the absence of T cells

In order to address whether commensal bacteria are responsible for the activation of type 3 ILCs in the SILP of weaned T cell deficient mice, a cocktail of wide spectrum antibiotics (ampicillin, streptomycin, metronidazole and 2% Glucose in drinking water) was given from birth to T cell deficient mice and their control littermates. The composition and the activity of ILCs were analyzed 8 weeks after birth in the mesenteric lymph nodes and in the SILP of antibiotic-treated mice and compared with those of mice receiving only 2% Glucose in their drinking water. We found that the fraction of NKp46⁺ ILC3 and IL-22 producing ILCs were significantly reduced in the SILP of T cell deficient mice treated with antibiotics compared to controls treated with glucose only (Fig. 2C, 2E and 2G). Importantly, antibiotic treatment from birth resulted in a significant reduction of the fraction of NKp46⁺ ILC3 and IL-22 producing ILCs in the SILP of T cell deficient mice to similar levels as those observed in immuno-competent hosts treated or not with antibiotics. Furthermore, we did not observe significant changes in the fraction of NKp46⁺ ILC3s and IL-22 producing ILCs in T cell competent mice upon antibiotics treatment suggesting that commensal bacteria have little if no effect on these parameters in immuno-competent hosts. Interestingly, antibiotic treatment from birth resulted in the complete restoration of CCR6⁺ ILC3 (LTI-like cells) in the MLNs of T cell deficient mice since their abundance among CD45⁺ cells was similar in antibiotics treated T cell deficient mice and immuno-competent host treated or not with antibiotics (Fig. 2D). Altogether, these observations show that commensal bacteria play a dominant role in the regulation of the abundance, the composition and activity of SILP and MLN resident type 3 ILC in the absence of T cells. This is in accordance with recent observations showing that T cells participate in the regulation of ILC3 homeostasis through their ability to promote the containment of commensal microbial species¹⁷.

We showed that the fraction of type 2 ILCs was significantly increased in the MLNs of T cell deficient mice after but not before weaning (Fig. 1B) suggesting that the transition from milk to solid food and/or the associated changes in the composition of commensal microbial species may trigger the expansion and the activation of MLNs resident type 2 ILCs in the absence of T cells. Although the fraction of type 2 ILCs and the proportion IL-13 producers (IL-13⁺ IL-5⁻) among CD45⁺ cells were significantly reduced in the MLNs of antibiotic-treated T cell deficient mice, they were still significantly increased compared to those observed in T cell-competent hosts (Fig. 2B and 2F). Antibiotic treatment from birth failed to significantly reduce the fraction of ILCs producing both IL-5 and IL-13 in the MLNs of antibiotic-treated T cell deficient mice after weaning (Fig. 2F). These observations suggest that commensal bacteria do not play a dominant role in the regulation of MLN resident type 2 ILCs in the absence of T cells. It has been claimed that the microbiota plays a key role in regulating type 2 immunity via specific subsets of T cells¹⁸. However, we did not observe a significant shift towards type 2 ILCs among MLN and gut resident ILCs of antibiotics-treated control littermates suggesting that microbiota has little impact on these populations in immuno-competent hosts at the steady state. We therefore hypothesized that additional T cell dependent mechanisms are necessary to ensure the homeostasis of MLNs resident type 2 ILCs.

T cell reconstitution suppresses the expansion and the activity of ILCs in the small intestine lamina propria and mesenteric lymph nodes of T cell deficient recipients

In order to address whether ILC homeostasis could be restored upon T cell reconstitution after weaning, thymic lobes from WT neonates were grafted under the kidney capsule of adult T cell deficient mice in order to mimic progressive and physiological T cell colonization (SFig. 3A). Although T cell reconstitution was achieved as soon as four weeks after the graft, significant effects on ILC homeostasis could not be observed before 12 weeks (SFig. 3B). This time lag between full T cell reconstitution and significant modifications in ILC composition indicates that T cell mediated regulation of ILC homeostasis does not only rely on changes in the availability of essential micro-environmental cues but may also involve the slow renewal of recipient ILCs and/or the generation of specialized activated T cells subsets.

In order to address which T cell subset was sufficient to restore ILC homeostasis in the context of T cell reconstitution, T cells isolated from the peripheral LNs and spleen of WT or Foxp3EGFP mice were sorted according to the expression of CD4, CD8 and Foxp3. Distinct combinations of T cell subsets were adoptively transferred into CD3ε^{-/-} mice (Fig. 3A) and the composition and the activity of ILCs were analyzed in the MLNs and SILP of recipient mice 12 weeks later. A significant reduction in the proportion of type 2 ILCs was observed among recipient CD45.1⁺ cells in the MLNs of mice reconstituted with a combination of CD4⁺ and CD8⁺, CD4⁺ or Foxp3⁺ CD4⁺ T cells (Fig. 3B). This was consistent with the decrease in the fraction of ILCs secreting IL-13 and

IL-15 among recipient CD45.1⁺ cells in the same compartment (Fig. 3F). Consistently with what has been previously reported in RAG and TCR $\gamma\delta$ deficient mice, the adoptive transfer of T cells (CD4⁺ combined with CD8⁺ or CD4⁺ T cells alone) resulted in a significant reduction in the fraction of type 3 ILCs, NKp46⁺ ILC3 and IL-22 producing ILC subsets among recipient CD45.1⁺ cells in the small intestine lamina propria.

Strikingly the adoptive transfer of Foxp3⁺ CD4⁺ T cells alone resulted in a significant reduction of ILC2 in the MLNs and in a reduction of ILC3 in the SILP of recipient mice. This reduction was similar to the one observed with bulk CD4⁺ T cells or a combination of both CD4⁺ and CD8⁺ T cells suggesting that the adoptive transfer of Tregs is sufficient to suppress the expansion of ILCs in the MLNs and SILP of recipient mice. However, we and others observed that a significant fraction of Foxp3⁻ CD4⁺ T cells emerge from Foxp3⁺ CD4⁺ T cells when adoptively transferred into lymphopenic hosts¹⁹ raising the question of the real contribution of Tregs in this process.

Microbiota dependent T cell activation is not necessary to suppress MLNs type 2 ILCs in the context of T cell reconstitution

Polyclonal CD4⁺ T cells undergo microbiota-dependant activation and proliferation when adoptively transferred into lymphopenic hosts²⁰⁻²². In order to determine whether microbiota dependent activation of T cells is necessary to regulate ILC homeostasis, T cell deficient mice were treated with antibiotics from birth and CD4⁺ T cells from WT mice were adoptively transferred at 8 weeks of age. Treatment with antibiotics was maintained for 12 weeks and the composition and cytokine secretion of ILCs were analyzed in MLNs. Adoptive transfer of CD4⁺ T cells into antibiotic treated recipients did not further reduce the secretion of IL-22 or IL-17A by SILP ILCs compared to antibiotic treatment alone (Fig. 4B). However adoptive transfer of T cells significantly reduced the frequency of IL-13 and IL-5 producing ILCs in MLNs of antibiotic treated recipient compared to antibiotic treated T cell deficient mice (Fig. 4C). These observations confirm that T cells mainly regulate type 3 ILCs through their ability to promote the containment of commensal bacteria. Moreover, we show that T cells can suppress the secretion of type 2 cytokines by MLNs resident ILCs in a microbiota-independent way.

In order to confirm that microbiota-independent CD4⁺ T cell activation achieves significant regulation of MLNs ILC2 homeostasis, T cells derived from RAG2^{-/-} OTII TCR transgenic (tg) mice were adoptively transferred into T cell deficient mice. In contrast with polyclonal CD4⁺ T cells, OTII TCR tg T cells fail to up-regulate CD44 and to significantly expand in the absence of antigen when adoptively transferred into lymphopenic hosts²². We observed that in these conditions, OTII TCR tg T cells failed to significantly reduce the fraction of type 2 ILCs in the MLN. Accordingly, the production of type 2 cytokines by ILCs was not reduced in the MLNs of recipient mice (Fig. 4E and F). In contrast, the addition of 1,5% ovalbumin in the drinking water of T

cell deficient mice adoptively transferred with CD4⁺ OTII cells resulted in a significant reduction in the fraction of type 2 ILCs in the MLNs (Fig. 4E and F). These observations confirm that microbiota-independent T cell activation is sufficient to suppress ILCs in the context of T cell reconstitution.

IL-33 participates in the activation of MLNs ILC2 in the absence of T cells

Alarmins such as IL-25, IL-33 and TSLP have been described to promote type 2 immunity. In order to investigate the link between T cell deficiency and the local induction of type 2 ILCs, we measured relative mRNA expression of IL-25, IL-33 and TSLP in the distal part of the small intestine and in the MLNs of T cell deficient mice and control littermates. Significant reduction in IL-25 mRNA expression was observed in the SIPL of T cell deficient mice compared to control littermates (Fig. 5A). It has been reported that IL-25 represses IL-22 production by type 3 ILCs through the modulation of IL-23 production by dendritic cells²³. Consistently, reduced expression of IL-25 may de-repress IL-23 production by myeloid cells and promote IL-22 production by gut resident type 3 ILCs in the absence of adaptive immunity. In addition, mRNA expression of IL-33 was significantly increased in the MLNs of T cell deficient mice compared to control littermates (Fig. 5B). In order to address whether IL-33 could promote the expansion and the activation of type 2 ILCs, IL-33 signaling was blocked *in vivo* using an anti-IL-33R monoclonal antibody (mAb). 200 µg of anti-IL-33R (anti-T1-ST2) mAb or control isotype were injected once IP in 8 weeks old CD3ε^{-/-} mice and PLNs and MLNs were collected 24 hours later for flow cytometry analysis (Fig. 5D). The fraction of type 2 ILCs was significantly reduced in the MLNs but not in the PLNs of mice treated with anti-IL-33R antibody compared to those injected with control isotype. Accordingly, the proportion of ILCs secreting IL-13 and IL-5 was reduced in the MLNs but not in the PLNs of anti-IL-33R treated mice compared to those treated with control isotype (Fig. 5E and F). Altogether these observations show that the transient blockade of IL-33R signaling is sufficient to reduce the fraction of group 2 ILCs in the MLNs of T cell deficient mice.

T cells regulate IL-33 mRNA expression by MLNs CD45⁻ cells

IL-33 is expressed by stressed epithelial cells, adipocytes, and specialized subsets of stromal cells. Histological analysis of secondary lymphoid tissues isolated from mice in which LacZ reports endogenous IL-33 expression showed that IL-33 promoter exhibits constitutive activity in mouse lymphoid organs. Furthermore, immuno-staining showed that IL-33 is detected in follicular reticular cells of mouse lymph nodes at the steady state²⁴. In order to address whether T cells could participate in the regulation of IL-33 mRNA expression by MLN stromal cells, CD45⁻ cells were isolated and sorted from the MLNs of T cell deficient mice grafted with T cells and aged matched T cell

deficient and control littermates and IL-33 mRNA expression was measured in each of these experimental conditions. Consistently with what was observed in the whole tissue (Fig. 5B), IL-33 mRNA expression was significantly increased in MLNs CD45⁻ cells isolated from T cell deficient mice compared to control littermates (Fig. 5E). In accordance with the significant reduction in the fraction of type 2 ILCs that is observed in the MLNs of T cell deficient mice grafted with T cell (Fig. 5G), T cell engraftment resulted in a significant reduction in IL-33 mRNA expression in MLNs CD45⁻ cells (Fig. 5H). These observations suggest that T cells may directly or indirectly regulate the expression of IL-33 by MLN stromal cells through mechanisms that remain to be elucidated.

Discussion

Recent reports have described how ILCs can promote and modulate adaptive T cell responses and T cell homeostasis²⁵. The deregulation of ILC populations in lymphopenic hosts such as RAG and T cell deficient mice suggest that adaptive immunity participates in the homeostasis of ILC at the steady state^{26,9,10}. However the mechanisms through which such regulation is achieved remain to be elucidated. We observed that T cell deficiency results in the expansion and activation of type 3 ILCs in the small intestine lamina propria while type 2 ILCs predominate in mucosal draining lymph nodes (Fig. 1B and C). The dichotomy between the mucosal barrier and its associated lymphoid organs strongly suggests that T cell mediated regulation of ILC homeostasis relies on tissue specific environmental factors. We showed that antagonizing post-natal colonization by commensal bacteria through antibiotics treatment from birth strongly reduced the activity of small intestine lamina propria ILCs of T cell deficient mice with a significant impact on the frequency of NKp46⁺ ILC3 (Fig. 2E). The same reduction was observed upon adoptive transfer of T cells, CD4⁺ T cells or purified Tregs (Fig. 3E) suggesting that T cells indirectly suppress gut resident ILC through their capacity to contain and select commensal bacterial communities as recently reported by Germain and Belkaid¹¹. However, the observation that adoptively transferred natural Tregs were able to efficiently reduce the fraction of NKp46⁺ ILC3 in the gut was somehow puzzling since nTregs are known to be poor producers of IL-17A and IL-22. One possible explanation is the ability for nTregs to generate Tfh that are required to induce germinal center reaction in recipient's Peyer's Patches. Class switch recombination and somatic hyper-mutations would thereby increase the diversity and the affinity of gut microbiota specific IgAs and promote the diversification of commensal bacterial species as shown by Fagrasan et al²⁷. This is consistent with the observation that adoptively transferred Tregs were unable to achieve efficient regulation in RAG deficient recipients that are lacking both T and B cells¹⁰ (our data not shown).

We observed that the frequency of each ILC subset is increased in the peripheral lymph nodes while type 2 ILC are specifically induced at the expense of CCR6⁺ ILC3 in the mesenteric lymph nodes of T cell deficient mice. Stromal and dendritic cells derived from the mesenteric lymph nodes of immuno-competent mice were shown to promote the differentiation of induced Tregs and the induction of CCR9 and $\alpha 4\beta 7$ expression by activated T cells²⁸. Moreover, CCR6⁺ ILC3 are located in the inter-follicular space of mesenteric lymph nodes creating a unique environment for antigen presentation and T activation⁹. These observations strongly suggest that tissue specific interactions are taking place between ILCs and lymph node stromal cells within mucosal draining lymph nodes. It is unclear to which extent constitutive T cell deficiency affects the non-hematopoietic microenvironment of ILCs within these lymphoid tissues. We did not observe significant alterations of the location of type 3 ILCs within MLNs of T cell deficient mice compared to control littermates nor did we detect significant alterations in the composition of MLNs and PLNs stromal cell subsets in the absence of T cells (SFig 4 and 5). However when measuring the expression of IL-33 in whole lymphoid tissues we could detect a specific induction of IL-33 mRNA expression in the mesenteric but not in the peripheral lymph nodes of T cell deficient mice. Neutralizing IL-33 in vivo efficiently reduced the fraction of type 2 ILCs in the mesenteric but not in the peripheral LNs of T cell deficient mice, confirming a role for this alarmin in the local induction of these cells. The same could be observed upon adoptive transfer of T cells regardless of the composition of the inoculum. Finally we observed that IL-33 gene expression was down-regulated in MLNs CD45⁻ cells upon T cell reconstitution suggesting that T cells may indirectly control IL-33 gene expression by MLNs stromal cells.

Finally we showed that interactions between the TCR and its cognate antigen are necessary to suppress lymphoid tissue resident ILCs. Indeed, adoptively transferred T cells specific for a peptide derived from Ovalbumin (RAG2^{-/-} OTII) were able to efficiently suppress the production of type 2 cytokines in MLNs resident ILCs of T cell deficient recipients in the presence of antigen (OVA). Furthermore, T cell activation resulted in a reduction of the fraction of type 2 ILCs in MLNs and in a decrease in the frequency of Type 3 ILCs in peripheral lymph nodes regardless of the TCR repertoire diversity. Activated adoptively transferred T cells that were shown to rapidly expand in conditions of lymphopenia²⁹ may therefore outcompete tissue resident ILCs for limited amounts of survival factors such as IL-2 and IL-7^{30,31}.

Overall, our investigations are among the first to dissect the diversity of mechanisms through which adaptive immunity shapes the composition, the abundance and the function of innate lymphoid cells in lymphoid and non-lymphoid tissues at the steady state. In doing so, we described a new functional interaction between T cells and stromal cells controlling ILC homeostasis in mucosal draining lymph nodes. This may pave the way for future investigations on the mechanisms underlying the cross-talk

between T cells and lymphoid tissue stromal cells at the steady state and during inflammation.

Materials and Methods

Mice

CD45.1 CD3 $\epsilon^{-/-}$ mice³² were obtained from Benedita Rocha (INEM institute) and crossed with *Rorc*(γ t)-*Gfp*^{TG} reporter mice³³ in order to generate CD3 $\epsilon^{+/-}$ and CD3 $\epsilon^{-/-}$ *Rorc*(γ t)-*Gfp*^{TG} littermates. CD45.1 CD3 $\epsilon^{-/-}$ mice were maintained homozygous and used as recipients for T cell adoptive transfers. BAC-transgenic *Rorc*(γ t)-*Gfp*^{TG} were provided by Gerard Eberl (Pasteur Institute). RAG2 $^{-/-}$ OTII were provided by Nadine Cerf Bensussan (Imagine Institute) and Foxp3EGFP³⁴ mice were provided by David Gross (INEM Institute). All mice were maintained under specific pathogen free conditions (SPF) in LEAT (Laboratoire d'expérimentation animale et de transgénèse) of the SFR (Structure Fédérative de Recherche). All experimental procedures using animals were approved by the "Comité d'éthique en experimentation animale" of the Paris Descartes University and the French Ministry of Research, Innovation and Education.

Ex vivo analysis of ILC composition and function

Multi-parametric flow cytometry analysis was performed on cell suspensions obtained from peripheral, mesenteric lymph nodes and small intestine lamina propria (SILP) as previously described¹³. ILCs were identified as Lin $^{-}$ CD45 $^{+}$ CD127 $^{+}$ cells among live lymphocytes with Lin including the following markers (CD3 ϵ , TCR β , TCR $\gamma\delta$, CD19, B220, CD11b, CD11c, GR-1, Ter119). Among Lin $^{-}$ CD45 $^{+}$ CD127 $^{+}$ cells, ILC1 were defined as NKp46 $^{+}$ ROR γ t $^{-}$ GATA3 $^{-}$ and ILC2 as NKp46 $^{-}$ ROR γ t $^{-}$ GATA3 hi . ILC3 were defined as ROR γ t $^{+}$ GATA3 lo and further divided into NKp46 $^{+}$, CCR6 $^{+}$ and NKp46 $^{-}$ CCR6 $^{-}$ (DN) subsets. Quiescence and proliferation were determined by intracellular staining for Ki67 with Ki67 $^{+}$ cells considered as actively proliferating cells. Transcription factors and Ki67 were detected using the Foxp3 detection kit from eBiosciences. Cytokine production (IL-5, IL-13, IL-17A and IL-22) was assessed after *ex-vivo* re-stimulation in complete culture medium for 3h in the presence of 100ng/ml of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), 1 μ g/ml of Ionomycin and 10 μ g/ml of Brefeldine A. When IL-22 secretion was assessed, re-stimulation was performed in the presence of 40ng/mL rIL-23 (Immuno Tools). Cells were stained first for cell surface markers and then fixed with PBS Paraformaldehyde 2% washed and permeabilized in MACS buffer 0,5% saponin for intracellular cytokine staining. Data were acquired using FACS Canto II and LSR Fortessa SORP (BD) and analyzed using the FlowJo software (Tristar).

Antibodies for flow cytometry analysis

Live/Dead Fixable Aqua (Invitrogen) was used for live/dead cell discrimination. Antibodies specific for lineage markers were purchased from eBioscience and Sony Biotechnology. FITC, PE or Biotin-conjugated antibodies were used for the detection

of lineage markers: CD3 ϵ (145-2C11), TCR β (H57-597), TRC $\gamma\delta$ (GL3), CD19 (6D5), B220 (RA3-6B2), CD11b (M1/70), CD11c (HL3), Gr-1 (RB6-8C5), Ter-119 (TER-119). The following antibodies were used for the detection and the identification of ILCs: APC-eF780 anti CD45.1 (A20), PerCP-Cy5.5 anti CD45.2 (104), PE-Cy7 anti CD127 (A7R34), Biotin anti NKp46 (29A1.4), BV605 anti CCR6 (29A1.4), BV786 anti Ki67 (B56), APC anti ROR α t (AFKJS-9), PE anti GATA-3 (TWAJ), APC anti IL-5 (TRFK5), PE anti IL-13 (ebio13A), APC anti IL-17A (ebio17B7), PE anti IL-22 (1H8PWSR).

Antibiotics treatment from birth

Pregnant mice were isolated around two weeks post coitum and treated with a cocktail of wide spectrum antibiotics (Ampicillin 0,5g/L; Streptomycin 1g/L; Metronidazol 0,5g/L) in the drinking water. After birth, mothers and pups were treated with the same cocktail of antibiotics in their drinking water. Pups were weaned around four weeks of age and treated until euthanized for tissue collection at 8 weeks of age. When grafted with T cells, recipients remained under antibiotic treatment until euthanized for tissue collection and flow cytometry analysis.

Thymic lobe graft

Thymic lobes were isolated from C57BL/6J or *Rorc*(γ t)-*Gfp*^{TG} neonates and grafted under the kidney capsule of 8 weeks old CD45.1 CD3 ϵ ^{-/-} recipient mice as previously described³⁵. Control recipients were injected with PBS. Mice were sacrificed for tissue collection and multi-parametric flow cytometry analysis 8, 12 and 16 weeks later.

Adoptive transfers of T cells

Donor T cells were isolated from the peripheral lymph nodes and spleen of C57BL/6J mice and sorted using a FACSaria III (BD). Bulk CD4⁺ and CD8⁺ T cells were separated and a combination of 1,5.10⁶ cells of each CD4⁺ and CD8⁺ T cells or 3.10⁶ CD4⁺ T cells were injected intravenously into CD45.1 CD3 ϵ ^{-/-} mice. Foxp3⁺ CD4⁺ T cells were isolated from Foxp3EGFP mice³⁴ and 1,5.10⁶ cells were injected into CD45.1 CD3 ϵ ^{-/-} mice. CD4⁺ T cells were isolated from the spleen and lymph nodes of RAG2^{-/-} OTII TCR transgenic mice and 1,5.10⁶ cells were injected intravenously into CD45.1 CD3 ϵ ^{-/-} mice. When specified, Ovalbumin (1,5%) and glucose (0,5%) were given in the drinking water of recipient mice for the whole duration of the procedure. Control recipients were injected with PBS. Adoptively transferred mice and control mice injected with PBS were sacrificed for tissue collection and multi-parametric flow cytometry analysis 12 weeks later.

RT-qPCR analysis

Freshly collected mesenteric lymph nodes, peripheral lymph nodes, and distal ileum from 8 weeks old CD3 ϵ ^{-/-} and CD3 ϵ ^{+/-} mice were snap frozen in RNAlater (Ambion). Total RNA was extracted using the RNeasy mini Kit from Qiagen. cDNA was synthesized using the MuLV Reverse transcriptase (Thermofisher) according to the manufacturer's instructions. For qPCR analysis, specific primers for IL-33, IL-25, TSLP, and HPRT were purchased from Qiagen. Gene detection and Gene quantification were performed using the SYBRGreen master mix from Qiagen and the

ABI 7900HT real-time PCR system. Lymph node stromal cells were sorted from the mesenteric lymph nodes after enzymatic digestion and depletion of CD45⁺ cells. Total RNA was extracted using the RNeasy micro Kit from Qiagen. Linear amplification of total RNA was performed using the message Booster kit (Ambion). cDNA was synthesized using SuperScript Reverse Transcriptase (Invitrogen) and qPCR analysis was performed as described above.

Treatment with neutralizing anti ST2/IL-33R

8 weeks old CD3 ϵ ^{-/-} mice were injected once intra-peritoneally with 200 μ g anti-ST2/IL-33R (clone 245707, R&D systems) or control isotype and sacrificed 24 hours later for tissue collection and flow cytometry analysis.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the Prism software (GraphPad) and statistical significance was determined using Two-way Anova or unpaired Mann Whitney statistical tests as indicated in the figure legends.

Acknowledgements:

We thank Gerard Eberl for kindly providing *Rorc*(γ t)-*Gfp*^{TG} mice and scientific advice. We thank Jerome M \acute{e} gret and Corinne Cordier from the SFR (Structure F \acute{e} d \acute{e} rative de Recherche) Cell sorting Facility for technical help and support. We thank Rachid Zoubairi, Thomas Ferr \acute{e} and Nadia Elganfound from the animal facility for handling mice and managing mouse breeding. Priscillia Bresler was supported by a fellowship from the French Ministry of Higher Education, Research and Innovation. Marie Cherrier received financial support from "Association Fran \c ois Aupetit" a non-profit association dedicated to help and support patients suffering from Inflammatory Bowel Diseases.

Authors contribution:

Priscillia Bresler performed and designed the experiments and participated in the preparation of the manuscript. Emmanuel Tejerina and Agnes Legrand performed the experiments and Emmanuel Tejerina handled mouse experimental procedures. Sophie Ezine performed thymic lobes graft under the kidney capsule. Lucie Peduto, Jean Marie Jacob and Marie Cherrier designed the experiments on lymph nodes stromal cells and Jean Marie Jacob performed those experiments. Marie Cherrier designed and performed the experiments and wrote the manuscript.

References:

1. Bordon, Y. Mucosal immunology: ILCs broker peace deals in the gut. *Nat Rev Immunol* **13**, 473–473 (2013).
2. Ebbo, M., Crinier, A., Vély, F. & Vivier, E. Innate lymphoid cells: major players in inflammatory diseases. *Nature Reviews Immunology* **17**, 665 (2017).
3. Song, C. *et al.* Unique and redundant functions of NKp46+ ILC3s in models of intestinal inflammation. *J Exp Med* **212**, 1869–1882 (2015).
4. Rankin, L. C. *et al.* Complementarity and redundancy of IL-22-producing innate lymphoid cells. *Nat Immunol* **17**, 179–186 (2016).
5. Vély, F. *et al.* Evidence of innate lymphoid cell redundancy in humans. *Nature Immunology* **17**, 1291 (2016).
6. von Burg, N., Turchinovich, G. & Finke, D. Maintenance of Immune Homeostasis through ILC/T Cell Interactions. *Frontiers in Immunology* **6**, 416 (2015).
7. Hepworth, M. R. *et al.* Innate lymphoid cells regulate CD4+ T-cell responses to intestinal commensal bacteria. *Nature* **498**, 113–117 (2013).
8. Hepworth, M. R. *et al.* Group 3 innate lymphoid cells mediate intestinal selection of commensal bacteria-specific CD4+ T cells. *Science* **348**, 1031–1035 (2015).
9. Mackley, E. C. *et al.* CCR7-dependent trafficking of RORgamma(+) ILCs creates a unique microenvironment within mucosal draining lymph nodes. *Nat Commun* **6**, (2015).
10. Korn, L. L. *et al.* Conventional CD4+ T cells regulate IL-22 producing intestinal innate lymphoid cells. *Mucosal immunology* **7**, 1045–1057 (2014).
11. Mao, K. *et al.* Innate and adaptive lymphocytes sequentially shape the gut microbiota and lipid metabolism. *Nature* **554**, 255 (2018).
12. Tsuji, M. *et al.* Requirement for lymphoid tissue-inducer cells in isolated follicle formation and T cell-independent immunoglobulin A generation in the gut. *Immunity* **29**, 261–271 (2008).
13. Sawa, S. *et al.* Lineage relationship analysis of RORgammat+ innate lymphoid cells. *Science* **330**, 665–9 (2010).
14. Lee, J. S. *et al.* AHR drives the development of gut ILC22 cells and postnatal lymphoid tissues via pathways dependent on and independent of Notch. *Nature Immunology* **13**, ni.2187 (2011).
15. Parigi, S. M., Eldh, M., Larssen, P., Gabrielsson, S. & Villablanca, E. J. Breast Milk and Solid Food Shaping Intestinal Immunity. *Front Immunol* **6**, 415 (2015).
16. Rogier, E. W. *et al.* Secretory antibodies in breast milk promote long-term intestinal homeostasis by regulating the gut microbiota and host gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 3074–3079 (2014).
17. Mao, K. *et al.* Innate and adaptive lymphocytes sequentially shape the gut microbiota and lipid metabolism. *Nature* **554**, 255–259 (2018).
18. Ohnmacht, C. *et al.* MUCOSAL IMMUNOLOGY. The microbiota regulates type 2 immunity through RORγt+ T cells. *Science* **349**, 989–993 (2015).
19. Duarte João H., Zelenay Santiago, Bergman Marie-Louise, Martins Ana C. & Demengeot Jocelyne. Natural Treg cells spontaneously differentiate into pathogenic helper cells in lymphopenic conditions. *European Journal of Immunology* **39**, 948–955 (2009).
20. Dummer, W. *et al.* T cell homeostatic proliferation elicits effective antitumor autoimmunity. *J Clin Invest* **110**, 185–192 (2002).

21. Min, B., Yamane, H., Hu-Li, J. & Paul, W. E. Spontaneous and Homeostatic Proliferation of CD4 T Cells Are Regulated by Different Mechanisms. *The Journal of Immunology* **174**, 6039–6044 (2005).
22. Feng, T., Wang, L., Schoeb, T. R., Elson, C. O. & Cong, Y. Microbiota innate stimulation is a prerequisite for T cell spontaneous proliferation and induction of experimental colitis. *Journal of Experimental Medicine* **207**, 1321–1332 (2010).
23. Sawa, S. *et al.* ROR γ t⁺ innate lymphoid cells regulate intestinal homeostasis by integrating negative signals from the symbiotic microbiota. *Nat. Immunol.* **12**, 320–326 (2011).
24. Pichery, M. *et al.* 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**, 3488–3495 (2012).
25. Withers, D. R. Innate lymphoid cell regulation of adaptive immunity. *Immunology* **149**, 123–130 (2016).
26. Sawa, S. *et al.* ROR γ mat(+) innate lymphoid cells regulate intestinal homeostasis by integrating negative signals from the symbiotic microbiota. *Nat. Immunol.* **12**, 320–6 (2011).
27. Kawamoto, S. *et al.* Foxp3⁺ T Cells Regulate Immunoglobulin A Selection and Facilitate Diversification of Bacterial Species Responsible for Immune Homeostasis. *Immunity* **41**, 152–165 (2014).
28. Iwata, M. *et al.* Retinoic Acid Imprints Gut-Homing Specificity on T Cells. *Immunity* **21**, 527–538 (2004).
29. Kieper, W. C. *et al.* Recent immune status determines the source of antigens that drive homeostatic T cell expansion. *J Immunol* **174**, 3158–3163 (2005).
30. Schmutz, S. *et al.* Cutting edge: IL-7 regulates the peripheral pool of adult ROR γ t⁺ lymphoid tissue inducer cells. *J Immunol* **183**, 2217–2221 (2009).
31. Martin, C. E. *et al.* Interleukin-7 Availability Is Maintained by a Hematopoietic Cytokine Sink Comprising Innate Lymphoid Cells and T Cells. *Immunity* **47**, 171–182.e4
32. Malissen, M. *et al.* Altered T cell development in mice with a targeted mutation of the CD3-epsilon gene. *EMBO J* **14**, 4641–4653 (1995).
33. Lochner, M. *et al.* In vivo equilibrium of proinflammatory IL-17⁺ and regulatory IL-10⁺ Foxp3⁺ ROR γ t⁺ T cells. *J. Exp. Med.* **205**, 1381–93 (2008).
34. Wang, Y. *et al.* Th2 lymphoproliferative disorder of LatY136F mutant mice unfolds independently of TCR-MHC engagement and is insensitive to the action of Foxp3⁺ regulatory T cells. *J. Immunol.* **180**, 1565–1575 (2008).
35. Berzins, S. P., Boyd, R. L. & Miller, J. F. A. P. The Role of the Thymus and Recent Thymic Migrants in the Maintenance of the Adult Peripheral Lymphocyte Pool. *J Exp Med* **187**, 1839 (1998).

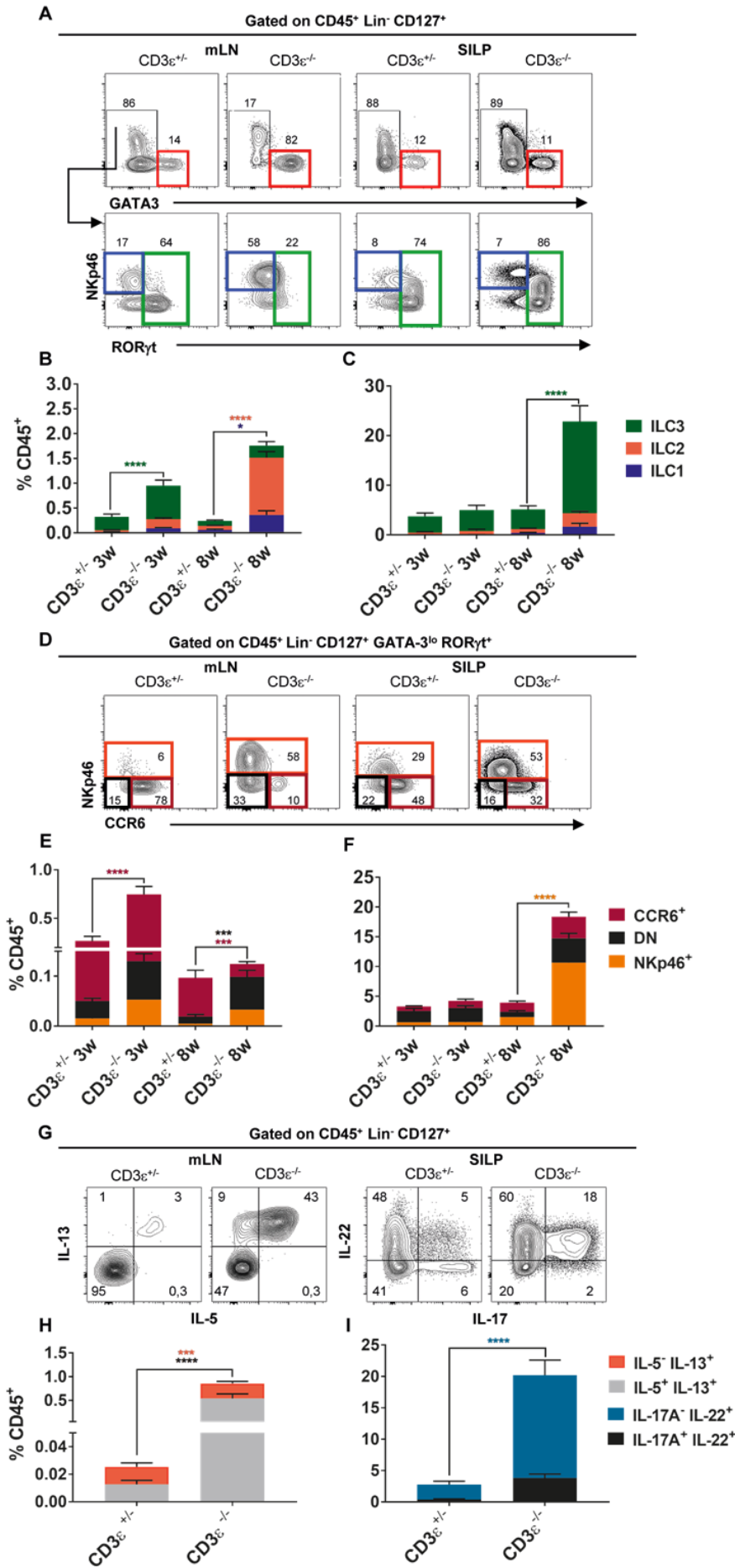


Figure 1. T cells regulate ILC homeostasis through distinct mechanisms depending on the ILC subtype and tissue microenvironment. (A) Flow cytometry analysis of ILCs from the mesenteric lymph nodes (MLN) and small intestine *lamina propria* (SILP) of 8 weeks mice old T cell deficient ($CD3\epsilon^{-/-}$) and control littermates ($CD3\epsilon^{+/+}$). **(B)** Histograms showing the percentage of each ILC subset among $CD45^{+}$ cells in the MLNs and SILP **(C)** of T cell deficient mice and control littermates before (3 weeks old $CD3\epsilon^{-/-}$ n=8 and $CD3\epsilon^{+/+}$ n=6) and after weaning (8 weeks old $CD3\epsilon^{-/-}$ n=13 and $CD3\epsilon^{+/+}$ n=9). **(D)** Group 3 ILCs were subdivided in 3 subsets according to the expression of NKp46 and CCR6: NKp46⁺ (orange), CCR6⁺ (purple) and NKp46⁻ CCR6⁻ (DN) black. **(E and F)** Histograms showing the percentage of each ILC3 subset among $CD45^{+}$ cells in MLNs and SILP of T cell deficient mice and control littermates before (3 weeks old $CD3\epsilon^{-/-}$ n=8 and $CD3\epsilon^{+/+}$ n=6) and after weaning (8 weeks old $CD3\epsilon^{-/-}$ n=14 and $CD3\epsilon^{+/+}$ n=12). **(G)** Flow cytometry analysis of type 2 cytokine production by ILCs in the MLNs and of IL-17 and IL-22 production by ILCs in the SILP of 8 weeks old mice T cell deficient mice $CD3\epsilon^{-/-}$ and control littermates $CD3\epsilon^{+/+}$. **(H)** Histogram showing the percentage of ILCs secreting IL-13 alone or IL-5 in combination with IL-13 among $CD45^{+}$ cells in the MLNs of 8 weeks old T cell deficient mice $CD3\epsilon^{-/-}$ (n=16) and control littermates $CD3\epsilon^{+/+}$ (n=15). **(I)** Histogram showing the percentage of ILCs secreting IL-22 alone or IL-22 in combination with IL-17 among $CD45^{+}$ cells in the SILP of 8 weeks old T cell deficient mice ($CD3\epsilon^{-/-}$ n=14) and control littermates ($CD3\epsilon^{+/+}$ n=10). Statistical analysis was performed using the 2 Way ANOVA method and Bonferroni's multiple comparison test, with alpha = 0.05. ****P<0.0001, ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05. Error Bars show SEM. Data are pooled from at least 3 independent experiments.

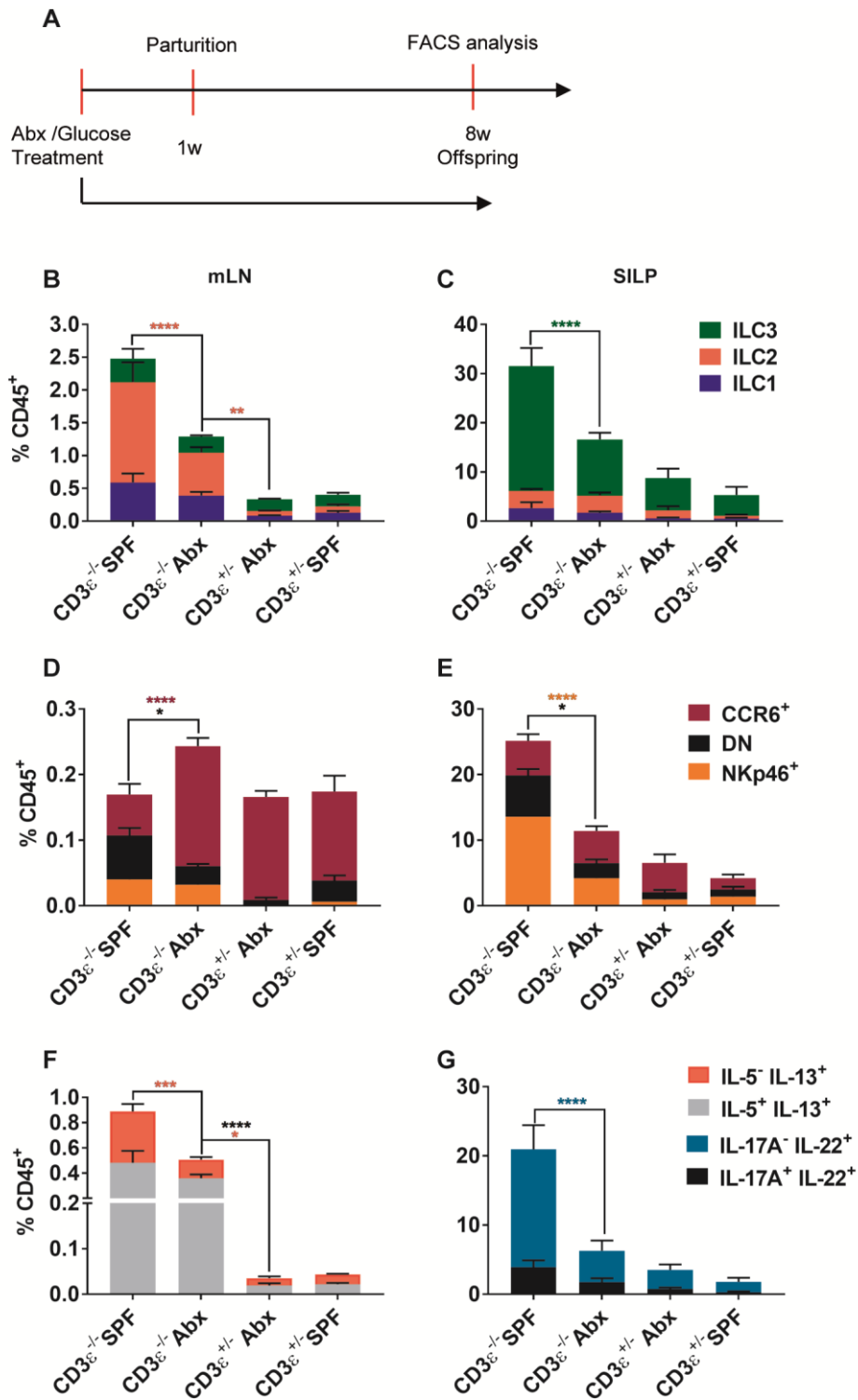


Figure 2: Commensal bacteria play a dominant role in the regulation of ILC3 homeostasis in the MLNs and SILP of T cell deficient mice. (A) Experimental procedure: T cell deficient mice ($CD3\epsilon^{-/-}$) and control littermates ($CD3\epsilon^{+/+}$) were treated with a cocktail of wide spectrum antibiotics (Abx) from birth in the drinking water (see material and methods). (B and C) Histograms showing the percentage of each ILC and ILC3 (D and E) subset among $CD45^{+}$ cells in MLNs and SILP of 8 weeks old T cell deficient mice and control littermates treated with a cocktail of wide spectrum antibiotics ($CD3\epsilon^{-/-}$ Abx n=9 and $CD3\epsilon^{+/+}$ Abx n=7) with 2% glucose or with 2% glucose only in the drinking water ($CD3\epsilon^{-/-}$ SPF n=8 and $CD3\epsilon^{+/+}$ SPF n=5). (F) Histogram showing the percentage of ILCs secreting IL-13 alone or IL-5 in combination with IL-13 among $CD45^{+}$ cells in the MLNs of 8 weeks old T cell deficient mice and control littermate treated with a cocktail of wide spectrum antibiotics ($CD3\epsilon^{-/-}$ Abx n=9 and $CD3\epsilon^{+/+}$ Abx n=8) or with glucose in the drinking water ($CD3\epsilon^{-/-}$ SPF n=8 and $CD3\epsilon^{+/+}$ SPF n=6). (G) Histogram showing the percentage of ILCs secreting IL-22 alone or IL-22 in combination with IL-17 among $CD45^{+}$ cells in the SILP of 8 weeks old T cell deficient mice and control littermates treated with a cocktail of wide spectrum antibiotics ($CD3\epsilon^{-/-}$ Abx n=8 and $CD3\epsilon^{+/+}$ Abx n=9) or with glucose only in the drinking water ($CD3\epsilon^{-/-}$ SPF n=8 and $CD3\epsilon^{+/+}$ SPF n=5). Statistical analysis was performed using the 2 Way ANOVA method with alpha = 0.05. ****P<0.0001, ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05. Error Bars show SEM. Data are pooled from at least 3 independent experiments.

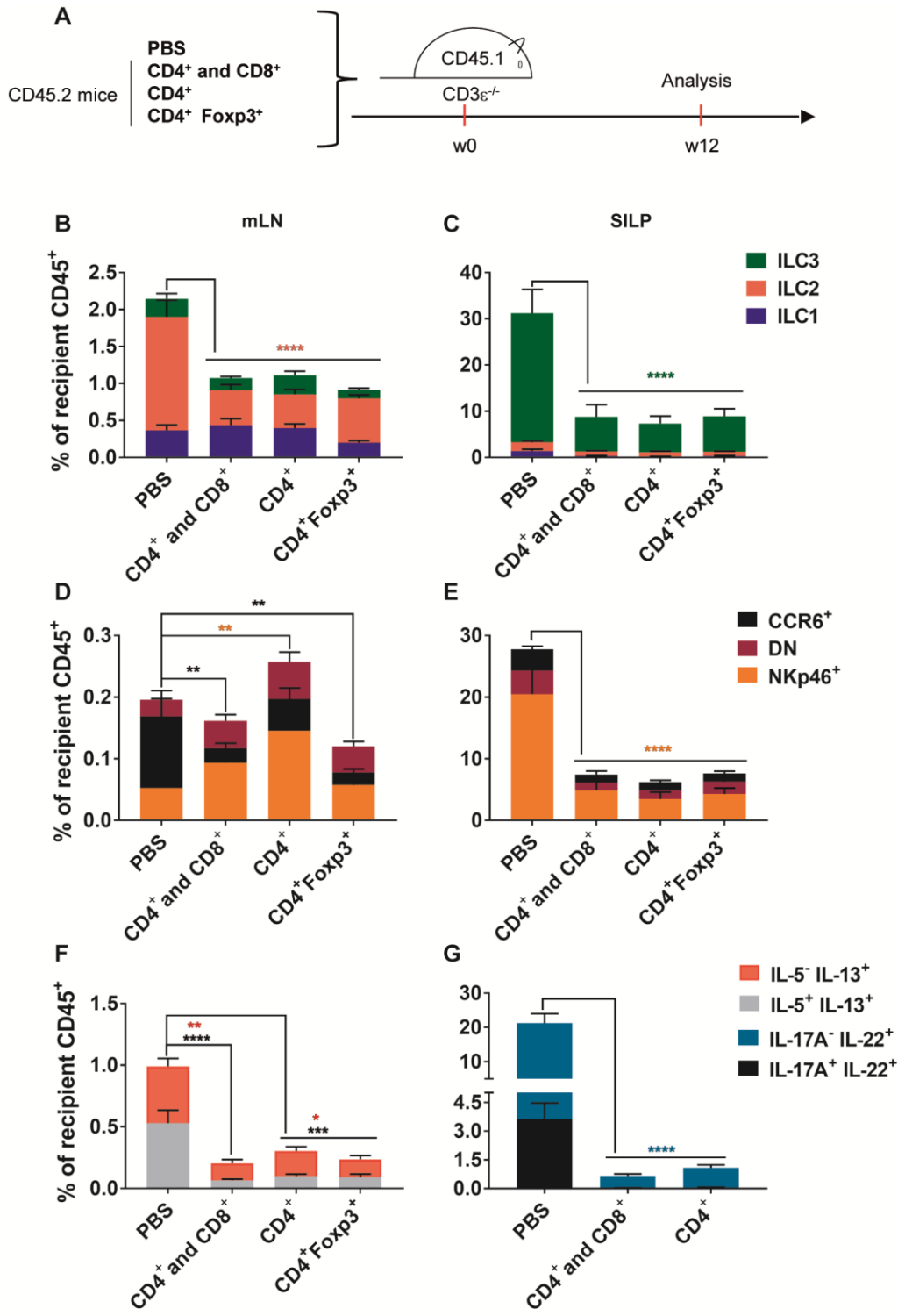


Figure 3: T cell reconstitution suppresses the expansion and the activity of ILCs in small intestine *lamina propria* and mesenteric lymph nodes. (A) Experimental procedure: T cell deficient mice (CD45.1 CD3 $\epsilon^{-/-}$) received a mix of 1,5. 10⁶ CD4⁺ and 1,5. 10⁶ CD8⁺ T cells or 3. 10⁶ CD4⁺ T cells or 1,5. 10⁶ CD4⁺ Foxp3⁺ T cells isolated from the peripheral lymph nodes and spleen of CD45.2 B6 mice or CD45.2 Foxp3EGFP reporter mice. Control mice were injected with PBS alone. Mice were sacrificed 12 weeks later at which point flow cytometry analysis was performed. (B and C) Histograms showing the percentage of each ILC and ILC3 subset (D and E) among CD45⁺ cells in MLNs and SILP of T cell deficient mice injected with PBS (n=9), CD4⁺ and CD8⁺ T cells (n=6), CD4⁺ T cells (n=7), Foxp3⁺ CD4⁺ T cells (n=8) 12 weeks after the injection. (F) Histogram showing the percentage of ILCs secreting IL-13 alone or IL-5 in combination with IL-13 among CD45⁺ cells in the MLNs of T cell deficient mice injected with PBS (n=12), CD4⁺ and CD8⁺ T cells (n=9), CD4⁺ T cells (n=11) or Foxp3⁺ CD4⁺ T cells (n=7) 12 weeks after the injection. (G) Histogram showing the percentage of ILCs secreting IL-22 alone or IL-22 in combination with IL-17 among CD45⁺ cells in the SILP of T cell deficient mice injected with PBS (n=11), CD4⁺ and CD8⁺ T cells (n=4) or CD4⁺ T cells (n=4) 12 weeks after the injection. Statistical analysis was performed using 2 Way ANOVA method with alpha = 0.05. **** P<0.0001, *** P<0.001, ** P<0.01, * P<0.05. Error Bars show SEM. Data are pooled from at least 3 independent experiments.

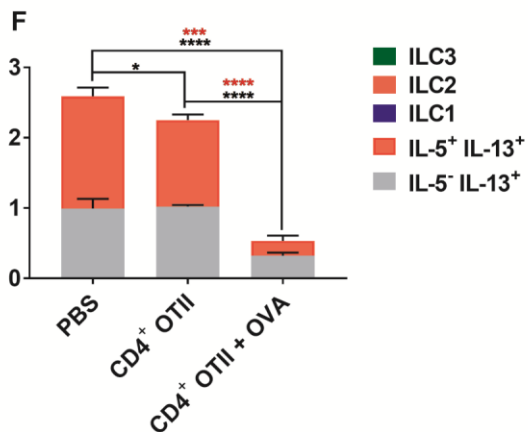
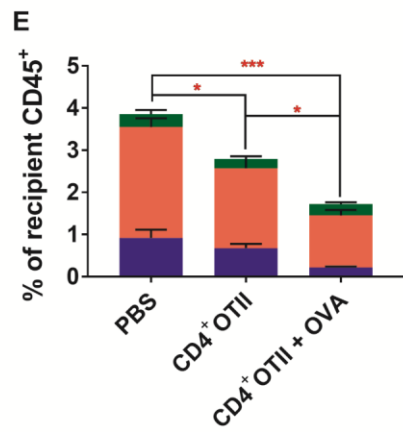
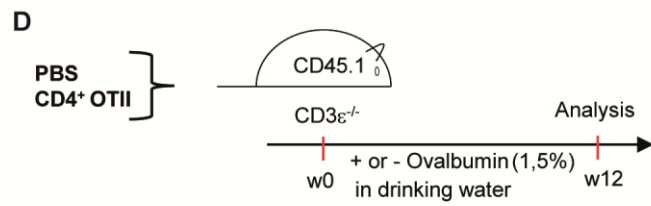
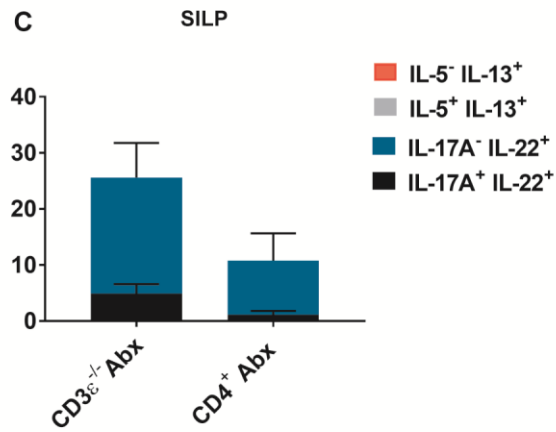
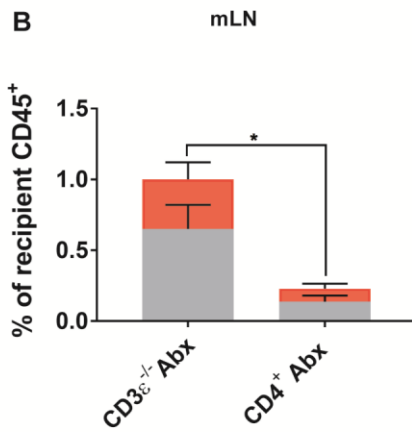
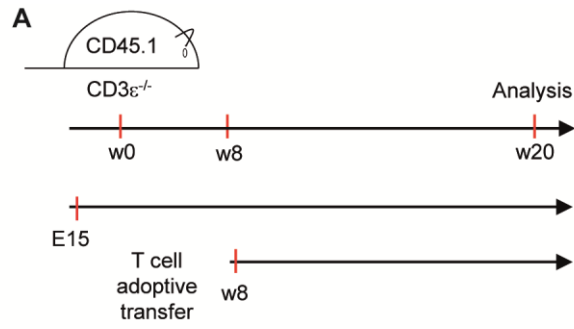


Figure 4: Microbiota dependent T cell activation is not required for the suppression of MLNs type 2 ILCs in the context of T cell reconstitution. (A) Experimental procedure: T cell deficient mice (CD45.1 CD3 $\epsilon^{-/-}$) were treated with a cocktail of wide spectrum antibiotics (Ampicillin 0,5g/L; Streptomycin 1g/L; Metronidazol 0,5g/L) in the drinking water and received 1,5 10⁶ CD4⁺ cells or PBS at 8 weeks of age. Antibiotics treatment was maintained for 12 more weeks at which point flow cytometry analysis was performed. **(B)** Histogram showing the percentage of ILCs secreting IL-13 alone or IL-5 in combination with IL-13 among CD45⁺ cells in the MLNs of antibiotics treated T cell deficient mice injected with PBS (n=4) or CD4⁺ T cells (n=4). **(C)** Histogram showing the percentage of ILCs secreting IL-22 alone or IL-22 in combination with IL-17 among CD45⁺ cells in the SILP of T cell deficient mice injected with PBS (n=4) or CD4⁺ T cells (n=4). **(D)** Experimental procedure: T cell deficient mice (CD45.1 CD3 $\epsilon^{-/-}$) received 1,5 10⁶ CD4⁺ T cells isolated from the peripheral lymph nodes and the spleen of CD45.2 RAG2^{-/-} OTII TCR transgenic mice or PBS alone. When specified, Ovalbumin was added at 1,5% in the drinking water throughout the whole duration of the procedure. All mice were sacrificed 12 weeks later at which point flow cytometry analysis was performed. **(F and G)** Histograms showing the percentage of each ILC subset among CD45⁺ cells in MLNs of T cell deficient mice injected with PBS (n=3) or OTII CD4⁺ T cells and treated with (CD4⁺ OTII + OVA, n=3) or without ovalbumin (CD4⁺ OTII, n=6). Statistical analysis was performed using 2 Way ANOVA method with alpha = 0.05. **** P<0.0001, *** P<0.001, ** P<0.01, * P<0.05. Error bars show SEM. Data are from one representative experiment out of two.

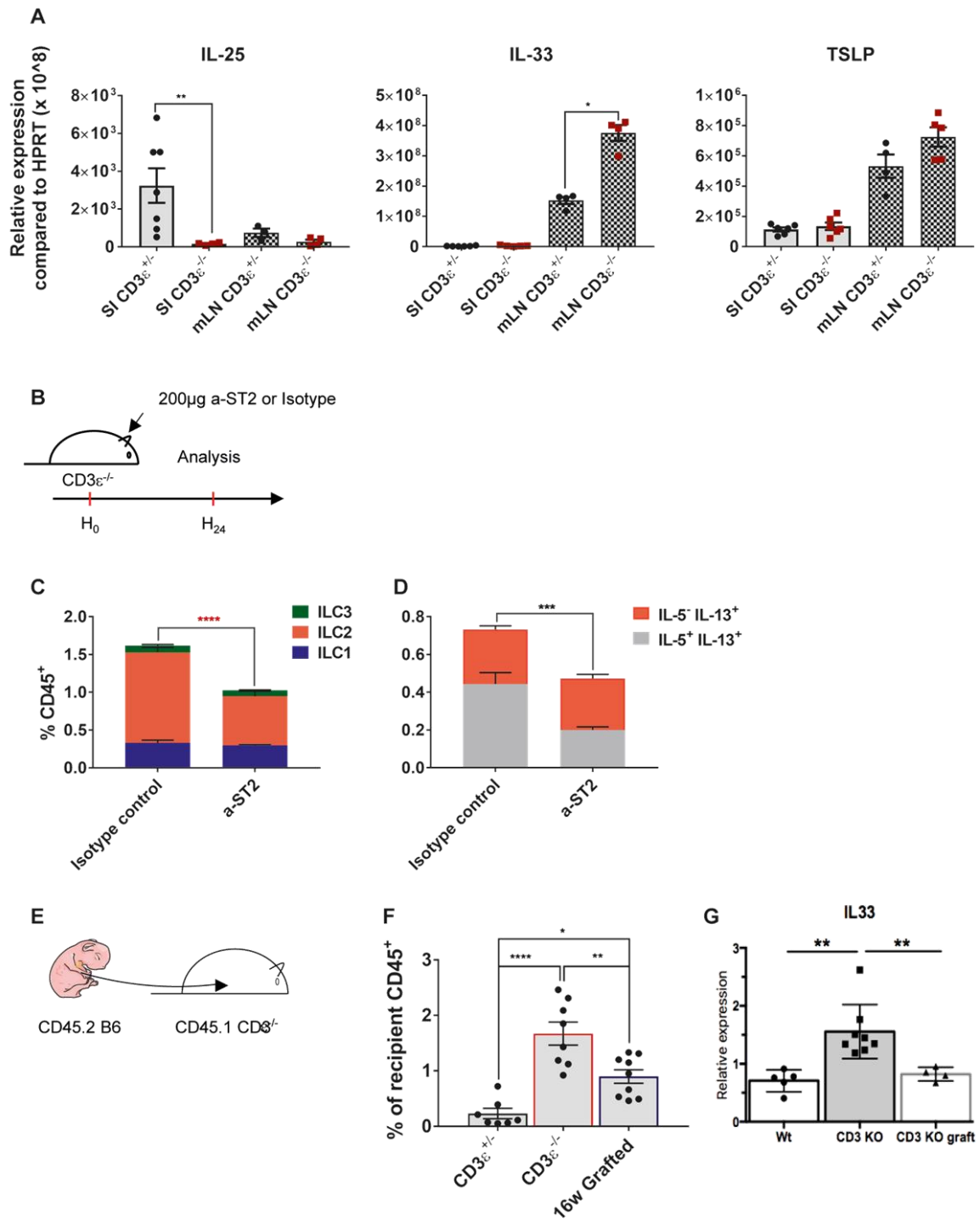
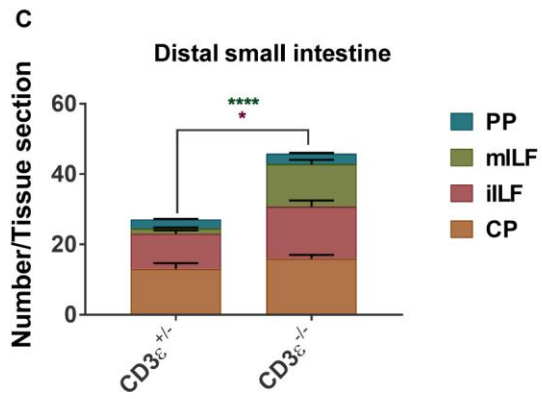
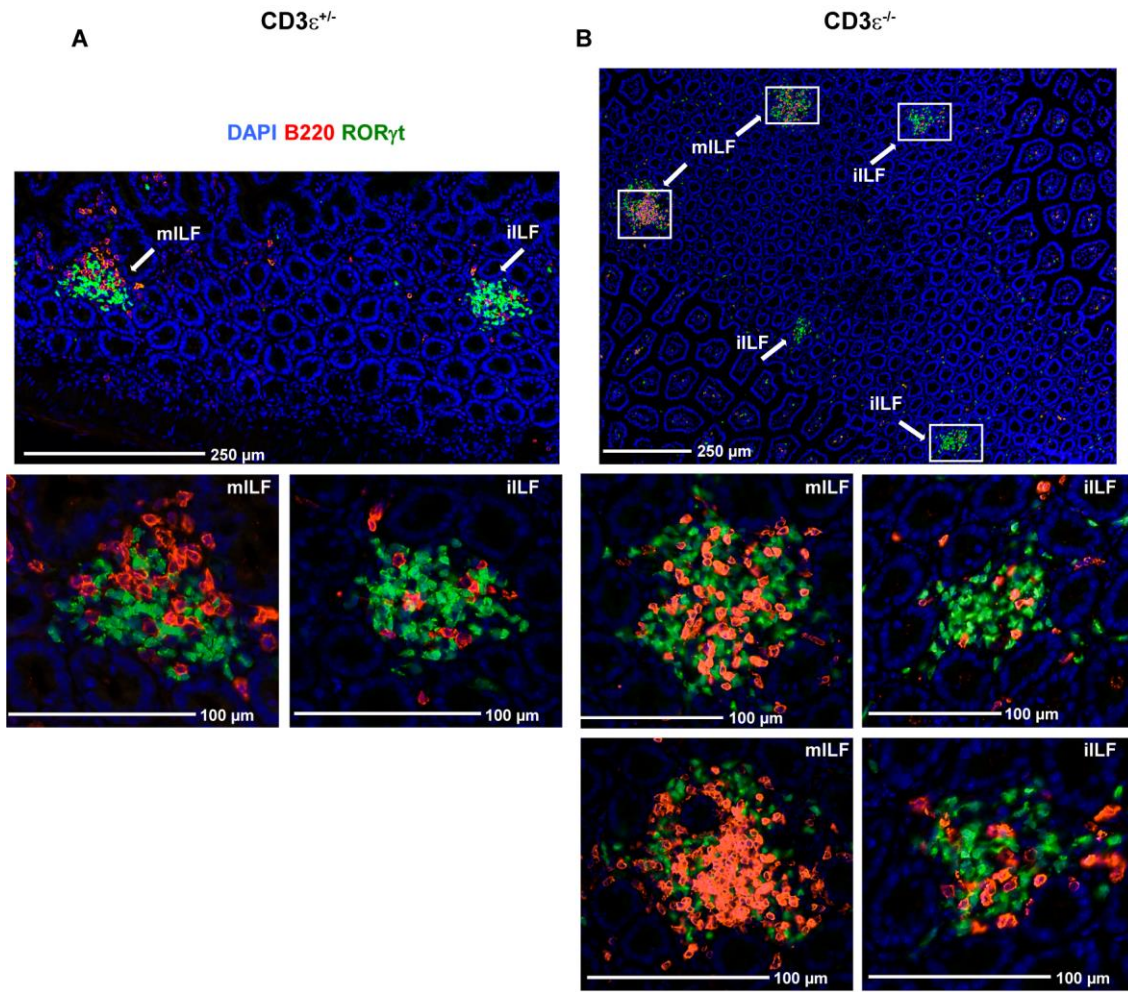


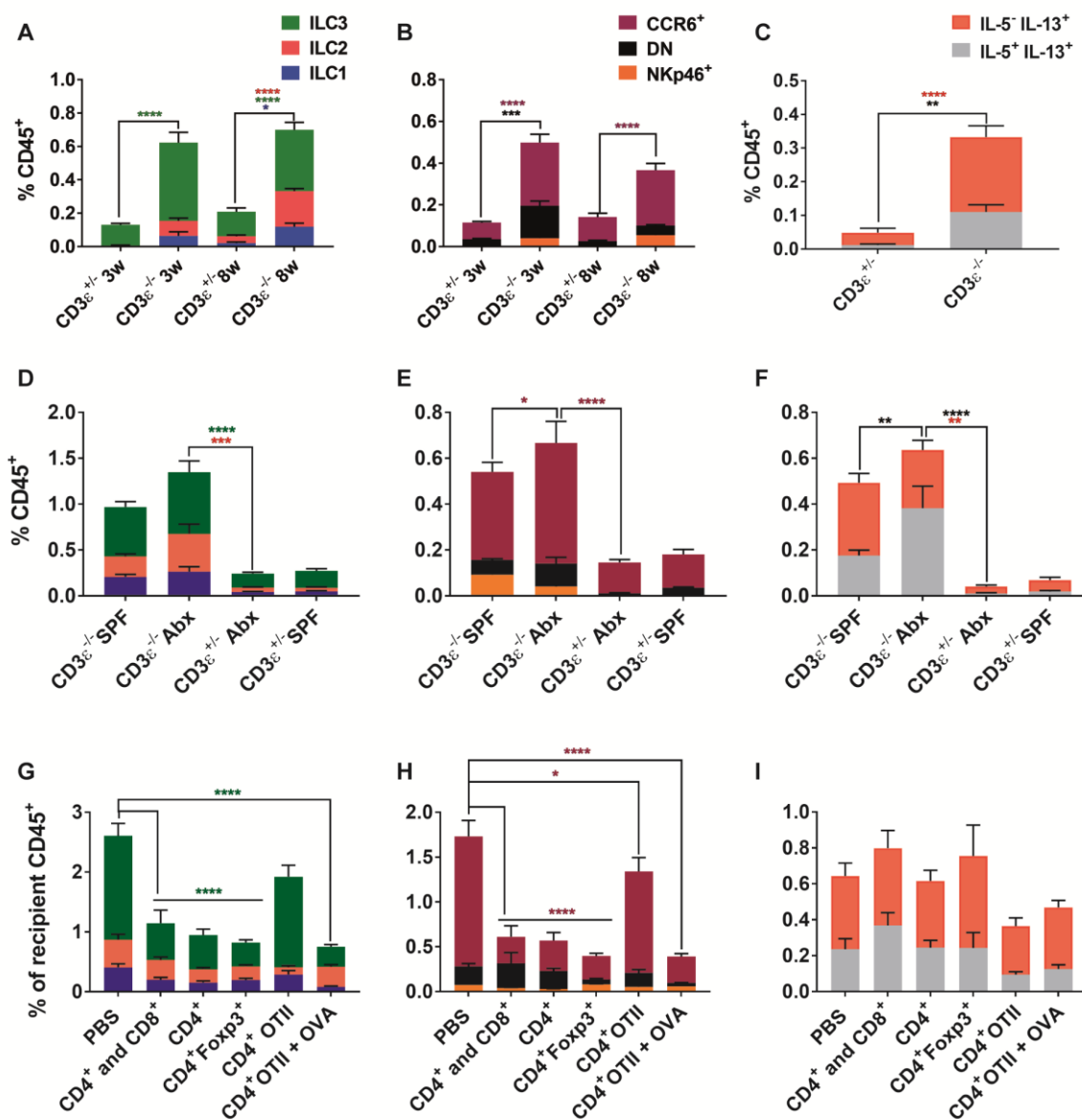
Figure 5: IL-33 participates in the regulation of MLN resident ILC2 by T cells. **(A)** Histograms showing the relative expression of genes coding for IL-25, IL-33 and TSLP in the MLNs and SILP of 8 weeks old T cell deficient mice (n=4) and control littermates (n=4). Error Bars show SEM. Statistical analysis was performed using the T-test method and Mann-Whitney comparison test, with alpha = 0.05. **** P<0.0001, *** P<0.001, ** P<0.01, * P<0.05. **(B)** Experimental procedure: CD3 $\epsilon^{-/-}$ mice were treated with (200 μ g) of anti ST2/IL-33R monoclonal antibody or control isotype and sacrificed 24h later for flow cytometry analysis. **(C and D)** Histograms showing the percentage of each ILC subset and the fraction of ILCs producing IL-13 alone or IL-5 in combination with IL-13 in the MLNs of T cell deficient mice treated with anti ST2/IL-33R (n=4) and control isotype (n=4). Error bars show SEM. Data are from one representative experiment out of two. **(E)** Experimental procedure: thymic lobes from CD45.2 B6 neonates were grafted under the kidney capsule of 8 weeks old CD45.1 CD3 $\epsilon^{-/-}$ mice and recipients were sacrificed 16 weeks later. Flow cytometry analysis was performed on MLNs CD45 $^{+}$ cells **(F)** and CD45 $^{-}$ cells were isolated and sorted for qPCR analysis **(G)**. **(F)** Histogram showing the percentage of each ILC subset among CD45 $^{+}$ cells in the MLNs of T cell deficient mice grafted with neonatal thymic lobes from CD45.2 B6 mice (n=8), aged matched T cell deficient mice (n=8) and control littermates (n=7). Statistical analysis was performed using 2 Way ANOVA method with alpha = 0.05. Data are pooled from 3 independent experiments. **(G)** Relative IL-33 mRNA expression in CD45 $^{-}$ cells isolated and sorted from the mLNs of T cell deficient mice grafted with neonatal thymic lobes (n=4) and aged matched T cell deficient mice (n=8) and control littermates (n=8). Statistical analysis was performed using the T-test method and Mann-Whitney comparison test, with alpha = 0.05. **** P<0.0001, *** P<0.001, ** P<0.01, * P<0.05.

Il faut augmenter la taille des lettres dans cette figure, le faire dans Prism si nécessaire.

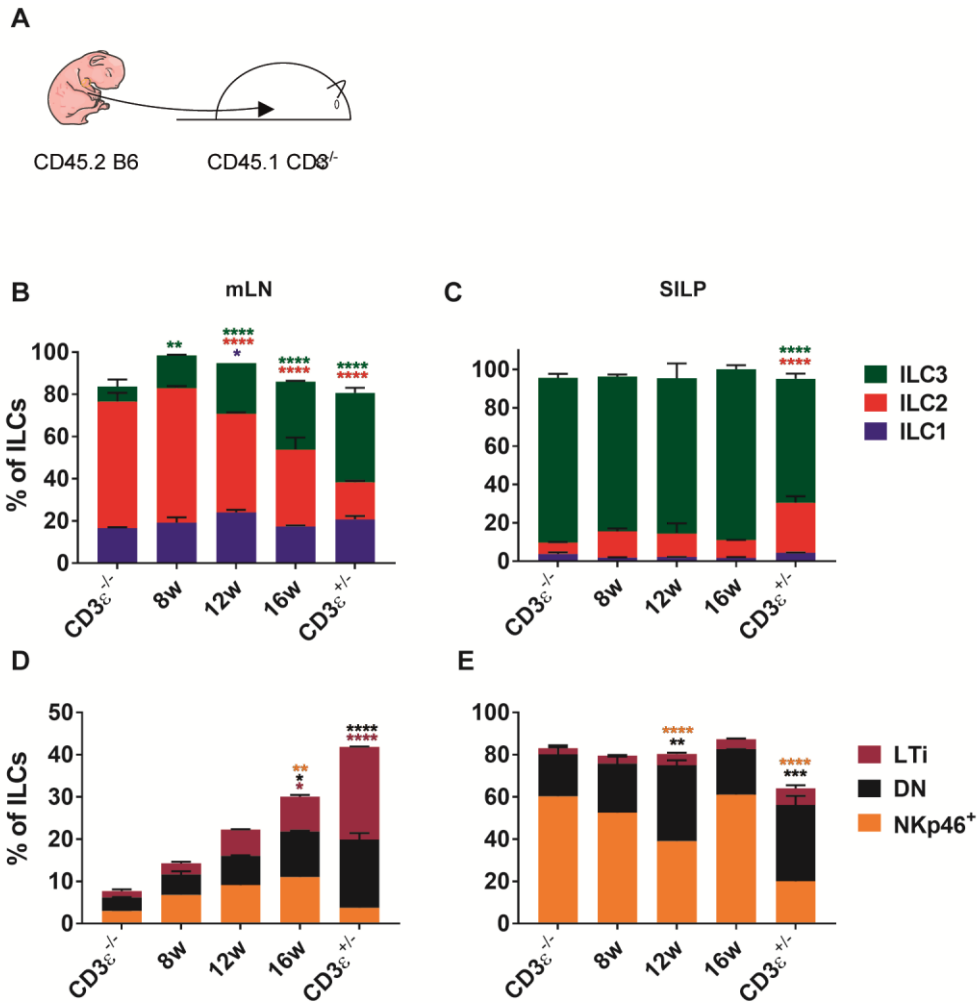
Distal ileum



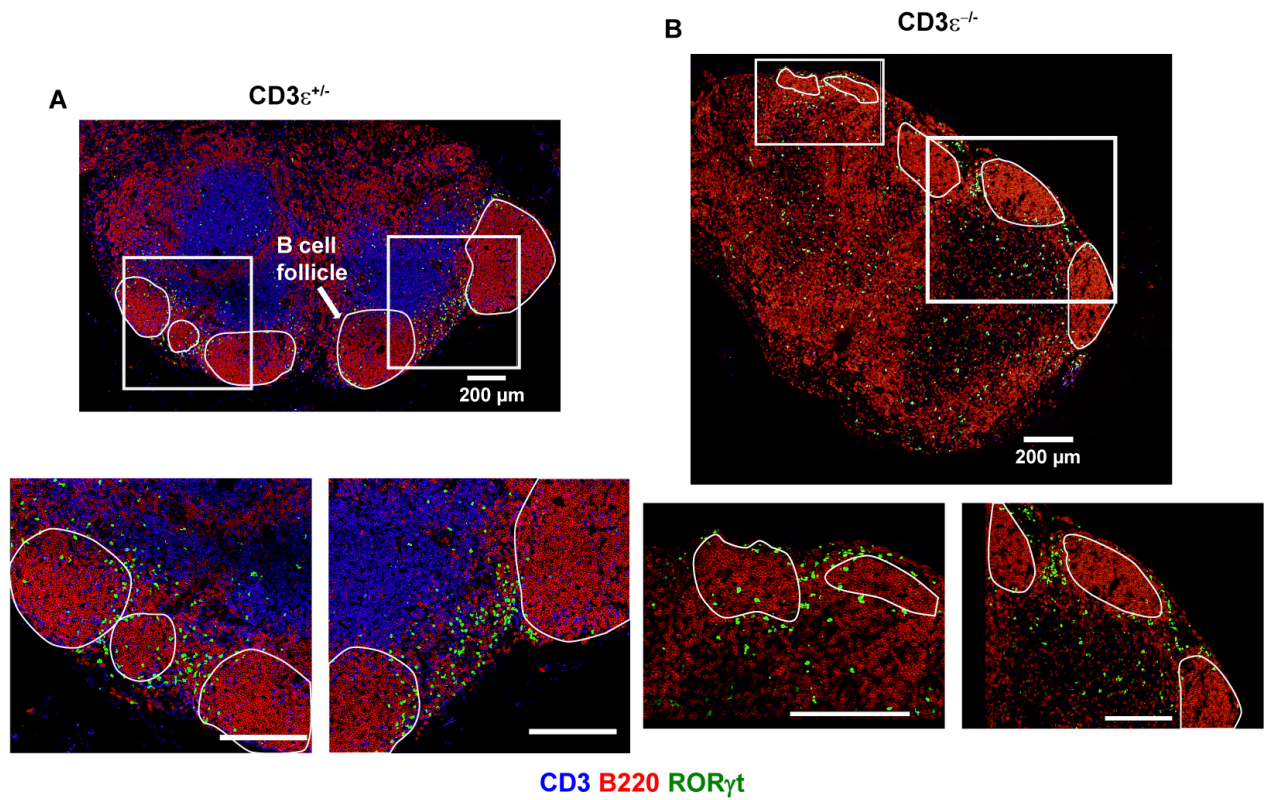
Supplementary Figure 1: The number of mature isolated lymphoid follicles is increased in the distal ileum of T cell deficient mice. Tissue sections from the distal part of the small intestine of 8 weeks old $CD3\epsilon^{+/-}$ (n=10) (**A** and **C**) and $CD3\epsilon^{-/-}$ mice (n=10) (**B** and **D**) stained with DAPI (Blue), anti-B220 (Red), anti-ROR γ t (Green) and showing how cryptopatches (CP), immature isolated lymphoid follicles (iLFs) and mature isolated lymphoid follicles (mILFs) were identified for counting (**E**) using the Hamamatsu Nanozoomer 2.0. Objective 20x. Statistical analysis was performed using the 2 Way ANOVA method with $\alpha = 0.05$. **** $P < 0.0001$, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$. Error Bars show SEM.



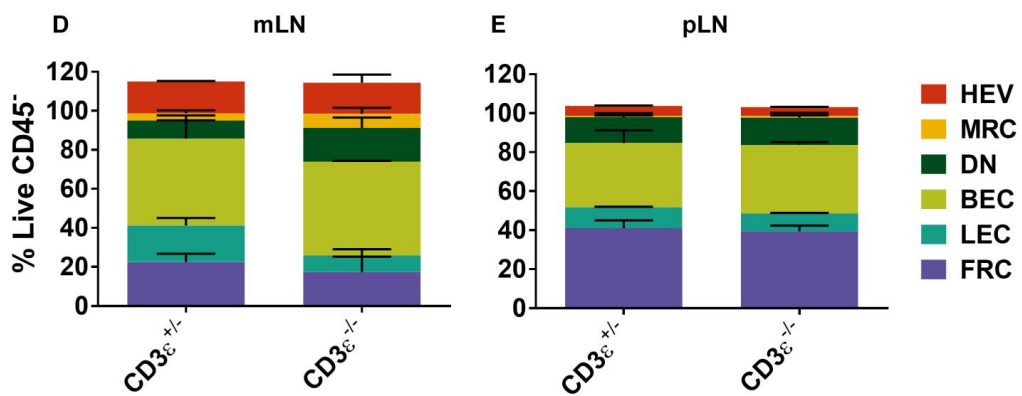
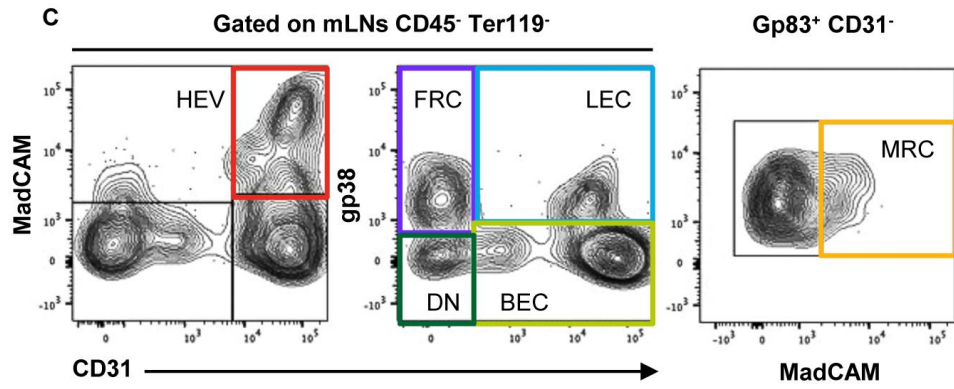
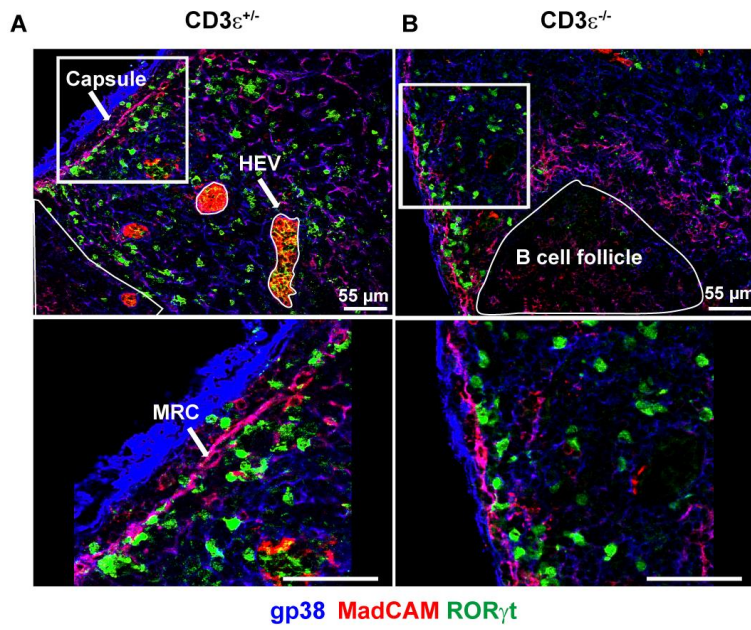
Supplementary Figure 2: Regulation of ILCs by T cells and commensal bacteria in the peripheral lymph nodes. Histograms showing the percentage of each ILC subset **(A)** and each ILC3 subset **(B)** among CD45⁺ cells in the peripheral lymph nodes (PLNs) of T cell deficient mice and control littermates before (3 weeks old CD3 ϵ ^{-/-} n=7 and CD3 ϵ ^{+/-} n=8) and after weaning (8 weeks old CD3 ϵ ^{-/-} n=19 and CD3 ϵ ^{+/-} n=14). **(C)** Histogram showing the percentage of ILCs secreting IL-13 alone or IL-5 in combination with IL-13 among CD45⁺ cells in the PLNs of 8 weeks old T cell deficient mice CD3 ϵ ^{-/-} (n=17) and control littermates CD3 ϵ ^{+/-} (n=15). **(D and E)** Histograms showing the percentage of each ILC and each ILC3 subset among CD45⁺ cells in PLNs of 8 weeks old T cell deficient mice and control littermate treated with a cocktail of wide spectrum antibiotics (CD3 ϵ ^{-/-} Abx n=9 and CD3 ϵ ^{+/-} Abx n=7) or with glucose in the drinking water (CD3 ϵ ^{-/-} SPF n=8 and CD3 ϵ ^{+/-} SPF n=5). **(F)** Histogram showing the percentage of ILCs secreting IL-13 alone or IL-5 in combination with IL-13 among CD45⁺ cells in the PLNs of 8 weeks old T cell deficient mice and control littermate treated with a cocktail of wide spectrum antibiotics (CD3 ϵ ^{-/-} Abx n=9 and CD3 ϵ ^{+/-} Abx n=7) or with glucose in the drinking water (CD3 ϵ ^{-/-} SPF n=8 and CD3 ϵ ^{+/-} SPF n=5). **(G and H)** Histograms showing the percentage of each ILC and each ILC3 subset among CD45⁺ cells in PLNs of T cell deficient mice injected with PBS (n=9), CD4⁺ and CD8⁺ T cells (n=6), CD4⁺ T cells (n=7), Foxp3⁺ CD4⁺ T cells (n=8), OTII CD4⁺ T cells (n=9) or OTII CD4⁺ T⁺ cells in combination with OVA 1% in the drinking water (n=3), all mice were analyzed 12 weeks after the injection. **(I)** Histogram showing the percentage of ILCs secreting IL-13 alone or IL-5 in combination with IL-13 among CD45⁺ cells in the PLNs of T cell deficient mice in each experimental condition described above. Statistical analysis was performed using the 2 Way ANOVA method with alpha = 0.05. **** P<0.0001, *** P<0.001, ** P<0.01, * P<0.05. Error Bars show SEM. Data are pooled from at least 3 independent experiments.



Supplementary Figure 3: Effect of T cell reconstitution on the composition of ILCs in the mLN and SILP over time. Thymic lobes from B6 CD45.2 neonates were grafted under the kidney capsule of CD45.1 CD3 $\epsilon^{-/-}$ recipient mice and the frequency of each ILC subset (**B** and **C**) and of each ILC3 subset (**D** and **E**) among recipient CD45⁺ Lin⁻ CD127⁺ cells was analyzed in the mesenteric lymph nodes (mLNs) (**B** and **D**) and small intestine *lamina propria* (SILP) (**C** and **E**) 8 (n=2), 12 (n=2) and 16 (n=2) weeks after the graft. Statistical analysis was performed using the 2 Way ANOVA method with CD3 $\epsilon^{-/-}$ mice as reference. Alpha = 0.05. **** P<0.0001, *** P<0.001, ** P<0.01, * P<0.05. Error Bars show SEM. Data are pooled from at least 3 independent experiments.



Supplementary Figure 4: T cell deficiency does not impact ILC3 localization in mesenteric lymph nodes. Tissue sections from the mesenteric lymph nodes of 8 weeks old $CD3^{\epsilon+/-}$ (**A**) and $CD3^{\epsilon-/-}$ (**B**) mice stained with anti-CD3 (Blue), anti-B220 (Red), anti-ROR γ t (Green). ZEISS ApoTome 2 Structured Illumination Microscope, objective 20x.



Supplementary Figure 5: T cell deficiency does not impact the association of ILC3 with lymph nodes stromal cells. Tissue sections from the mesenteric lymph nodes of 8 weeks old CD3 $\epsilon^{+/}$ (A) and CD3 $\epsilon^{-/}$ mice (B) stained with anti-gp38 (blue), anti-MadCAM (red), anti-ROR γ t (green). MRC (Marginal Reticular cells). ZEISS ApoTome 2 Structured Illumination Microscope, objective 20x. (C) Gating strategy for the detection and the identification of mesenteric lymph nodes stromal cells by flow cytometry. (D, E) Histograms showing the frequency of stromal cell subsets among live CD45⁺ Ter119⁻ cells in the mesenteric and the peripheral lymph nodes of CD3 $\epsilon^{-/}$ (n=3) and CD3 $\epsilon^{+/}$ mice (n=3). High Endothelial Venule (HEV), Fibroblastic Reticular Cells (FRC), Lymphatic Endothelial Cells (LEC), Blood Endothelial Cells (BEC), DN (Double Negative). Statistical analysis was performed using the 2 Way ANOVA method with alpha = 0.05. Error Bars show SEM.

VI. DISCUSSION

- a. La déficience en lymphocytes T induit une altération de la composition et de la fonction des ILC en fonction de leur localisation tissulaire.

i. Résultats et conclusions

Nos résultats révèlent que la composition et l'activité des ILC sont affectées après le sevrage de façon tissu-spécifique en absence de lymphocytes T (Figure 1 de l'article en préparation). Une augmentation significative de la fréquence d'ILC2 et de la production de cytokines de type 2 (IL-5 et IL-13) sont observées dans les mLN au dépend des LTi (ILC3 CCR6⁺). En parallèle, la fréquence des ILC3 NKp46⁺ et la fraction des ILC productrices d'IL-22 sont augmentées dans la *lamina propria* de l'intestin. Ces observations suggèrent que les lymphocytes T participent à la régulation de la composition et de la fonction des ILC dans les mLN et la *lamina propria* de l'intestin (Figure 35).

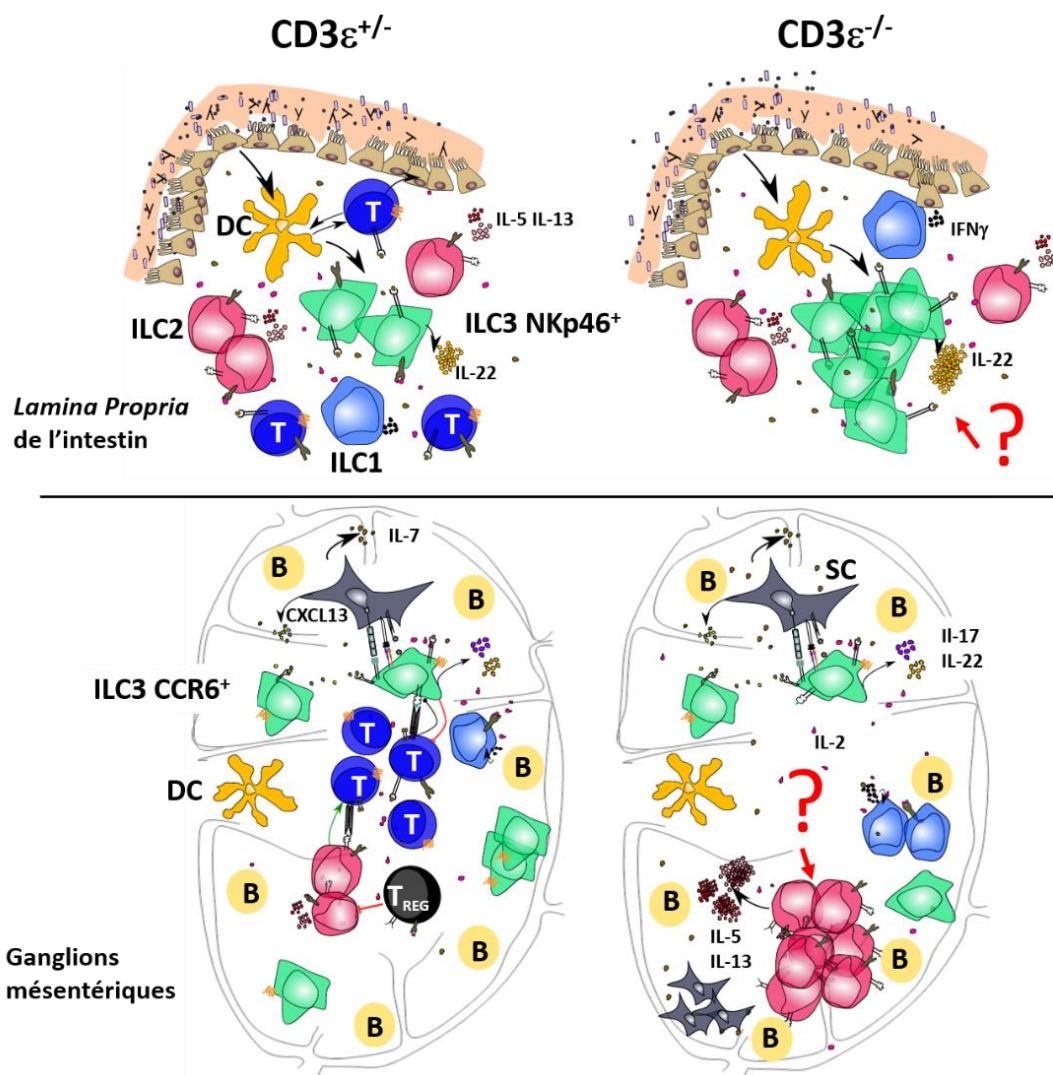


Figure 35 : Description de l'altération de la composition des ILC dans un hôte déficient en lymphocytes T (CD3 $\epsilon^{-/-}$) : **(Haut)** La déficience en lymphocytes T induit une augmentation de la proportion des ILC3 NKp46⁺ et des ILC productrices d'IL-22 dans la *lamina propria* de l'intestin. **(Bas)** Dans les ganglions mésentériques, une augmentation significative de la fréquence des ILC2 et de la fraction d'ILC productrices d'IL-13 et d'IL-5 est observée, alors que la fréquence des LTi est fortement réduite.

ii. Discussion

L'ensemble des altérations observées au sein des souris CD3 $\epsilon^{-/-}$ interviennent après le sevrage suggérant que les modifications dans la composition du microbiote associées au changement d'alimentation conditionneraient ce déséquilibre. L'augmentation du nombre d'ILF matures dans la *lamina propria* de l'intestin des souris CD3 $\epsilon^{-/-}$ par rapport aux contrôles immunocompétents serait également synonyme d'une activation accrue des populations immunes présentes dans ces structures (D, ILC et lymphocytes B) par le microbiote intestinal (cf figure supp1 de l'article et chapitre III). Ainsi la « pression immune » exercée par le microbiote sur les ILC résidentes de la *lamina propria* se trouverait renforcée par un défaut de la réponse adaptative après le sevrage.

L'équipe de S. Fagarasan a précédemment observé que la diversité et l'affinité des IgA sécrétées dans la lumière intestinale jouent un rôle essentiel dans la variété et l'abondance de certaines espèces bactériennes commensales du microbiote intestinal (Kawamoto et al., 2014). Ainsi en absence de centres germinatifs (dépendants des cellules T) dans les plaques de Peyer, le répertoire restreint et l'affinité réduite des IgA produites dans les ILF appauvrit la diversité des espèces qui colonisent le tractus intestinal. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que l'absence de lymphocytes T impacte l'activité des ILC3 résidentes de l'intestin du fait de modifications importantes dans la composition et la diversité des espèces bactériennes commensales. Cependant, cette hypothèse n'est pas entièrement transposable aux tissus lymphoïdes. En effet, l'augmentation de la fréquence de l'ensemble des ILC (ILC1, ILC2 et ILC3) au sein des ganglions périphériques suggère plutôt une disponibilité accrue des cytokines homéostatiques (IL-2, IL-7 et IL-15) en absence de cellules T.

L'augmentation de la proportion des ILC2 dans les mLN après le sevrage suggère également un rôle du microbiote. Cependant le lien entre microbiote et ILC2 reste peu abordé et peu

décrit dans la littérature. Bien que nous ne puissions pas l'exclure, il est possible que ce lien soit très indirect ou qu'il repose sur des régulations métaboliques encore inconnues.

b. Le microbiote intestinal régule l'homéostasie des ILC3 dans les mLN et dans la *lamina propria* de l'intestin en absence de lymphocytes T

i. Résultats et conclusions

Le traitement par les antibiotiques de souris $CD3\epsilon^{+/-}$ et $CD3\epsilon^{-/-}$ a été effectué afin d'évaluer le rôle du microbiote intestinal dans la régulation de l'homéostasie des ILC dans les ganglions mésentériques et la *lamina propria* de l'intestin. La réduction drastique de la charge microbienne suite au traitement par des antibiotiques dès la naissance induit une diminution de la fréquence des ILC3 NKp46⁺ dans la *lamina propria* de l'intestin et l'augmentation de celle des LTi-like dans les mLN, atteignant des niveaux similaires à ceux des souris immunocompétentes traitées ou non aux antibiotiques (Figure 2 de l'article en préparation). D'autre part, le traitement aux antibiotiques n'a permis de réguler que partiellement l'abondance et l'activité des ILC2. En effet, la fréquence des ILC2 et des ILC sécrétrices de cytokines de type 2 issues des souris $CD3\epsilon^{-/-}$ traitées aux antibiotiques restent significativement plus élevées que celles des souris immunocompétentes traitées ou non aux antibiotiques. En outre, ces diminutions sont spécifiques des mLN car elles ne sont pas observées dans la *lamina propria* de l'intestin ni dans les ganglions périphériques. Par ailleurs nous n'observons que peu d'effet du traitement sur les ILC chez les hôtes immunocompétents. Cela suggère d'une part que le confinement du microbiote intestinal (probablement induit par les lymphocytes T) contribue significativement à la régulation de l'homéostasie des ILC3 de l'intestin et d'autre part que des mécanismes additionnels et distincts sont nécessaires à la régulation des ILC2 par les lymphocytes T dans les mLN.

ii. Discussion

Nous avons choisi de traiter les souris $CD3\epsilon^{-/-}$ et $CD3\epsilon^{+/-}$ dès la naissance afin de réduire au maximum la charge bactérienne et d'englober la période de développement des ILC et du sevrage. Nous avons donc mimé de manière drastique le confinement du microbiote intestinal

induit par les cellules T. La diminution de la charge microbienne et le changement de la composition du microbiote qui en découle pourraient:

- Diminuer l'activation des cellules épithéliales et myéloïdes par les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) et la production de cytokines telles que l'IL-1 β , l'IL-6 et l'IL-23 (Buonocore et al., 2010; Cella et al., 2009; Longman et al., 2014; Monticelli et al., 2011; Powell et al., 2015; Satoh-Takayama et al., 2008b)
- Modifier l'abondance de certains métabolites impliqués dans la régulation des ILC (vitamine A, flavinoïdes, polyphénols, indoles, acides gras à chaîne courte) (Goverse et al., 2016; Monticelli et al., 2016)
- Induire la production d'IL-25 par les « tuft cells » et la suppression de la production d'IL-23 par les cellules dendritiques qui en découle (Sawa et al., 2011)

Par ailleurs, le traitement par des antibiotiques induit une diminution partielle de la fraction des ILC2 dans les mLN des souris déficientes en lymphocytes T mais pas chez les contrôles immunocompétents. Cela suggère que la régulation exercée par les lymphocytes T sur l'homéostasie des ILC2 pourrait en partie reposer sur leur capacité à participer au confinement du microbiote et/ou à la régulation de sa composition. Cependant, cette régulation partielle suggère que des mécanismes additionnels et distincts contribuent à la régulation des ILC2 par les lymphocytes T dans les mLN.

c. L'activation des lymphocytes T dépendante du microbiote intestinal n'est pas nécessaire à la régulation de l'homéostasie des ILC2 dans les ganglions mésentériques (mLN)

i. Résultats et conclusions

L'effet de la reconstitution du compartiment T sur la composition et l'activité des ILC a été évalué grâce à des greffes de lobe thymique de souris néonatales sauvages sous la capsule rénale de souris adultes CD3 $\epsilon^{-/-}$. Ces expériences ont permis de mettre en évidence une régulation partielle des ILC dans les mLN mais pas dans la *lamina propria* de l'intestin (Figure supplémentaire 3 de l'article en préparation). Le rôle des différentes sous-populations de

lymphocytes T a été abordé à l'aide de transferts adoptifs de populations triées (CD4⁺ et CD8⁺, CD4⁺, CD4⁺ Foxp3⁺). Dans chacune de ces conditions, nous avons observé une diminution significative de la fraction des ILC3 NKp46⁺ dans la *lamina propria* de l'intestin et des ILC2 dans les mLN (Figure 3 de l'article en préparation).

D'autre part, le rôle de l'activation des lymphocytes T dans la régulation de l'homéostasie des ILC a été évalué en utilisant une lignée porteuse d'un seul TCR spécifique d'un peptide spécifique de l'ovalbumine dans le contexte des molécules du CMH de classe II (Rag^{-/-} OTII) (Figure 4 de l'article en préparation). Le rationnel étant que le transfert adoptif des lymphocytes T CD4⁺ issus de ces souris n'induirait pas leur activation au sein des souris receveuses en absence d'antigène. Le traitement des souris par l'ovalbumine a permis de diminuer la fréquence des ILC2 et la sécrétion de cytokines de type 2 par les ILC dans les mLN par comparaison aux souris contrôles injectées mais non traitées par l'ovalbumine. Cependant, le traitement des souris par l'ovalbumine n'a pas d'effet sur la fréquence des ILC3 par comparaison aux souris contrôles injectées mais non traitées. D'autre part, les souris non traitées par l'ovalbumine montrent une légère diminution dans l'activation des ILC2 et la fréquence des ILC3 par comparaison aux souris contrôles CD3ε^{-/-}, synonyme d'une activation et prolifération homéostasique des lymphocytes T dépendante de l'IL-7. En somme, le transfert adoptif de lymphocytes T polyclonaux et l'activation qui en découle sembleraient nécessaires dans la régulation de la composition et l'activité des ILC dans les mLN.

Par ailleurs, nous avons tenté d'évaluer le rôle du microbiote intestinal dans l'activation des lymphocytes T, elle-même nécessaire à la régulation des ILC dans les ganglions mésentériques et les intestins (Figure 4 de l'article en préparation). Nous avons analysé l'activité des ILC des mLN et des intestins de souris CD3ε^{-/-} reconstitué avec des lymphocytes T CD4⁺ et traitées dès la naissance par des antibiotiques. Nos résultats préliminaires montrent que le transfert adoptif de lymphocytes T n'a pas d'effet additionnel sur la sécrétion d'IL-22 par les ILC3 ni la fréquence des ILC3 NKp46⁺ par rapport au traitement antibiotique. Ceci confirme donc que l'essentiel du rôle joué par les T sur l'abondance et l'activité des ILC3 intestinales passe par le confinement des bactéries commensales. En revanche, dans les ganglions mésentériques, le transfert adoptif a un effet régulateur qui complète celui des antibiotiques sur la fréquence des ILC2. Ces observations suggèrent donc que l'activation des lymphocytes T par les

antigènes du microbiote n'est pas nécessaire à la régulation de l'homéostasie des ILC2 dans les ganglions mésentériques.

ii. Discussion

L'IL-7 est une cytokine homéostatique dont l'abondance régule le nombre de lymphocytes dans les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes (Fry and Mackall, 2001). En situation de lymphopénie constitutive ou induite, la disponibilité de l'IL-7 se trouve augmentée favorisant ainsi la prolifération lente des lymphocytes T suite à un transfert adoptif (Martin et al., 2017). Cette prolifération homéostatique progressive et dépendante de l'IL-7 est néanmoins minoritaire dans le cas de transferts adoptifs de populations T polyclonales chez des hôtes hébergés en condition conventionnelles ou SPF (Specific Pathogen Free) (Bell et al., 1987; Ernst et al., 1999; Feng et al., 2010; Rocha et al., 1989). Dans ce cas, les antigènes du microbiote induisent une prolifération spontanée indépendante de l'IL-7 (Min et al., 2004; Tan et al., 2001) (Feng et al., 2010).

Ainsi, au cours des transferts adoptifs effectués lors de nos expériences, les lymphocytes T CD4⁺ polyclonaux s'activent et prolifèrent rapidement de façon dépendante du microbiote conduisant à la régulation de l'homéostasie des ILC dans les mLN et les intestins. En revanche, les lymphocytes T issus des souris donneuses Rag^{-/-} OTII restent en grande partie quiescents, ne prolifèrent que très lentement de façon dépendante de l'IL-7 et n'ont qu'un léger effet sur la régulation de l'homéostasie des ILC. Cependant, le traitement par l'ovalbumine conduit à une diminution de l'abondance et de l'activité des ILC2 résidentes des ganglions mésentériques suggérant que la régulation de l'homéostasie des ILC dépendante de l'activation des lymphocytes par le microbiote intestinal ne constitue pas le seul mécanisme de régulation. De plus, malgré l'absence d'effet du traitement par l'ovalbumine sur la fréquence des ILC3 dans les intestins, aucune différence significative n'est observée entre les souris reconstituées par les lymphocytes T CD4⁺ polyclonaux et les lymphocytes T CD4⁺ OTII et traitées par l'ovalbumine (données non communiquées) remettant en cause le rôle unique du microbiote intestinal dans la régulation de ces cellules. En effet, le traitement des souris CD3ε^{-/-} par les antibiotiques régule significativement la fréquence et l'activité des ILC3 NKp46⁺ dans

la *lamina propria* de l'intestin de manière comparable aux souris CD3 ϵ ^{-/-} SPF reconstituées avec des lymphocytes T CD4⁺. Aussi, le transfert adoptif de lymphocytes T CD4⁺ au sein de souris CD3 ϵ ^{-/-} traitées aux antibiotiques n'a pas d'effet additionnel sur la régulation de l'abondance et de l'activité des ILC3 NKp46⁺ localisées dans la *lamina propria* de l'intestin, tandis que la fréquence et l'activité des ILC2 par les lymphocytes T est régulée même en absence de microbiote intestinal. Ces différences en terme d'activation et de prolifération sont de ce fait corrélées à des effets très différents sur les ILC résidentes des tissus lymphoïdes et de la *lamina propria* des souris receveuses. Nous faisons donc l'hypothèse que l'activation des lymphocytes T CD4⁺ polyclonaux par le microbiote intestinal dans le contexte d'une reconstitution participe majoritairement au confinement du microbiote intestinal. Ce dernier étant suffisant à la régulation des ILC3 des mLN et de la *lamina propria* de l'intestin.

d. La régulation de l'expression de l'IL-33 par les lymphocytes T conditionne l'homéostasie des ILC2 dans les mLN

i. Résultats et conclusions

Le traitement des souris CD3 ϵ ^{-/-} par des antibiotiques dès la naissance ne suffit pas à restaurer l'homéostasie des ILC2 dans les mLN (Figure 2 de l'article en préparation) et l'activation indépendante des lymphocytes T par le microbiote intestinal est suffisant à réguler l'activité des ILC2 dans les mLN (Figure 4 de l'article en préparation). Cette régulation partielle suggère que des mécanismes complémentaires strictement dépendants des lymphocytes T sont en jeu. Les ILC2 répondent à un environnement inflammatoire riche en alarmine via la sécrétion de cytokines de type 2. L'analyse par qPCR de l'expression des alarmines IL-25, IL-33 et TSLP dans les mLN de souris CD3 ϵ ^{-/-} et CD3 ϵ ^{+/-} suggère que l'expression de l'IL-33 est fortement augmentée en absence de lymphocytes T. Nous avons observé que la neutralisation systémique de l'IL-33 par un anticorps monoclonal résulte en une réduction significative de la fraction d'ILC2 et de la fréquence des ILC sécrétrices de cytokines de type 2 dans les mLN des souris traitées. Ces résultats indiquent que l'IL-33 participe à l'accumulation des ILC2 dans ce tissu en absence de cellules T. Par ailleurs, la collaboration avec l'équipe de Lucie Peduto spécialiste des cellules stromales à l'Institut Pasteur de Paris a permis de constater d'une part

que les cellules stromales sont la source de l'hypersécrétion d'IL-33 et d'autre part qu'une greffe de lobe thymique permet de réguler la sécrétion de l'IL-33 par ces cellules. En somme, ces résultats suggèrent que les lymphocytes T régulent directement ou indirectement l'expression de l'IL-33 par les cellules stromales et par conséquent l'abondance des ILC2 dans les mLN.

ii. Discussion

A l'état d'équilibre et dans un hôte immunocompétent les ILC2 sont en proportion minoritaire dans les mLN. En revanche ces cellules s'accumulent dans les mLN des souris déficientes en cellules T après le sevrage. Cette accumulation pourrait s'expliquer par un environnement inflammatoire dans ces ganglions se traduisant par une expression excessive d'IL-33 par les cellules stromales. Outre l'IL-33, il pourrait également y avoir une augmentation de la disponibilité de facteurs de survie tels que l'IL-2 (cf [Figure 40](#) des résultats complémentaires et perspectives) et l'IL-7 normalement consommés par les lymphocytes T (Martin et al., 2017). Par ailleurs, les lymphocytes Tregs exprimant le récepteur à l'IL-33 ST2 pourraient également entrer en compétition avec les ILC2 pour la consommation de l'alarmine. D'autre part, les Tregs peuvent supprimer l'activité des ILC2 de manière dépendante de la voie ICOS-ICOSL (Rigas et al., 2017). Nous avons observé que le transfert adoptif de lymphocytes T CD4⁺ Foxp3⁺ résulte en une réduction significative de la fréquence des ILC2 dans les mLN des receveuses posant la question de leur rôle dans la régulation des ILC2. Enfin, bien que nos expériences aient permis de faire un lien entre les lymphocytes T et l'expression de l'alarmine IL-33 dans les mLN, nous n'avons pas décrit le mécanisme (direct ou indirect) par lequel ils interagissent avec les cellules stromales pour réguler la production d'IL-33 dans cet organe.

VII. RESULTATS COMPLEMENTAIRES ET PERSPECTIVES

a. Etude de l'impact des lymphocytes T sur la migration des ILC

Il a récemment été rapporté que la capacité des ILC1 et des ILC3 à migrer vers les intestins reposerait sur la perte de l'expression de CCR7 et sur l'acquisition de l'expression CCR9 dans les mLN et ce, de façon dépendante de l'acide rétinoïque (Kim et al. 2015). Des modifications dans le profil d'expression de ces deux récepteurs de chimiokines pourraient rendre compte des altérations observées dans la composition des ILC au sein des mLN et de la *lamina propria* l'intestin des souris déficientes en cellules T (Figure 36). Ainsi, nous avons tenté de détecter et de mesurer l'expression de ces récepteurs de chimiokines par cytométrie en flux afin de les corrélérer avec les modifications dans la composition des ILC au sein des mLN et de la *lamina propria* des souris déficientes en cellules T (Figure 36). Nous n'avons pas détecté l'expression de CCR7 par les ILC quel que soit le compartiment ou le phénotype des animaux analysés. Par ailleurs l'expression de CCR9 n'a été détectée qu'au sein des ILC NKp46⁻ ROR γ t⁻ (composées à 90% d'ILC2 KLRG1⁺ et KLRG1⁻) des mLN des souris déficientes en lymphocytes T. Cependant, une seconde analyse de l'expression de CCR9 au sein des ILC2 KLRG1⁺ a été effectuée dans les mLN des souris CD3 ϵ ^{-/-} et CD3 ϵ ^{+/-} et n'a démontrée aucune différence dans l'expression de ce récepteur (données non transmises dans ce mémoire de thèse). Par conséquent, ces observations suggèrent que les modifications dans la composition des ILC observées chez les souris immunodéficientes sembleraient reposer sur des mécanismes indépendants de l'expression de CCR7 et CCR9.

Par ailleurs, lors de l'initiation du développement des organes lymphoïdes (au stade embryonnaire), les cellules stromales résidentes des ébauches ganglionnaires sécrètent les chimiokines CCL19/CCL21 et CXCL13 induisant le recrutement des LTi CCR7⁺ CXCR5⁺ (cf chapitre 3) (Ohl et al., 2003). D'autre part, il existe également chez l'adulte plusieurs populations très hétérogènes de cellules stromales résidentes des ganglions lymphatiques telles que les TRC (*T cell zone Reticular Cells*) et les MRC (*Marginal Reticular Cells*) exprimant les chimiokines CCL19/CCL21 et CXCL13, respectivement. C'est pourquoi, l'étude de l'expression relative des gènes codants pour ces chimiokines par les cellules stromales des mLN de souris lymphopéniques CD3 ϵ ^{-/-} ou Rag2^{-/-} permettrait de mettre en évidence le rôle

indirect des cellules du système immunitaire adaptatif dans le recrutement et la rétention des ILC au sein des mLN.

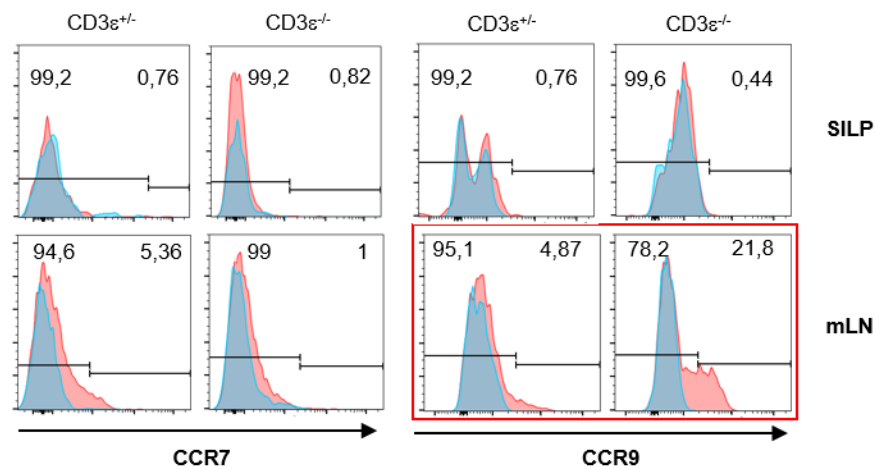


Figure 36 : La déficience en lymphocytes T n'impacte pas l'expression des récepteurs CCR7 et CCR9 par les ILC résidentes des ganglions mésentériques et de la lamina propria de l'intestin. Analyse de l'expression des récepteurs aux chimiokines CCL19/CCL21 (CCR7) et CCL25 (CCR9) par les ILC totales résidentes de la lamina propria de l'intestin (haut) et des ganglions mésentériques (bas) de souris CD3 $\epsilon^{-/-}$ et CD3 $\epsilon^{+/-}$. Bleu isotype contrôle pour l'expression de CCR7 ou CCR9.

b. Analyse du rôle du compartiment stromal dans la régulation indirecte de l'homéostasie des ILC par les lymphocytes T

D'après l'étude de Mackley et al, les cellules lymphoïdes innées sont localisées au sein de la zone interfolliculaire B des ganglions mésentériques et inguinaux de souris sauvages adultes, plus précisément à proximité des cellules stromales MRC (Marginal Reticular Cells) (Mackley et al., 2015). Nous avons émis l'hypothèse que ces dernières pourraient participer au recrutement et au maintien des ILC dans les ganglions mésentériques. Nous nous sommes alors questionné sur l'impacte de la déficience en lymphocytes sur la localisation des ILC3 dans les ganglions mésentériques. L'analyse histologique des ganglions mésentériques issus de souris CD3 $\epsilon^{-/-}$ et CD3 $\epsilon^{+/-}$ montre que la localisation des ILC3 et leur association avec les MRC sont maintenues en absence de cellules T (Figures supplémentaires 4 et 5 de l'article en préparation). D'autre part, l'analyse de la composition des cellules stromales par cytométrie en flux n'a révélé aucune différence significative dans la fréquence des différentes sous

populations de cellules stromales résidentes des ganglions (Figure supplémentaire 5 de l'article en préparation).

Cependant, un déficit constitutif en lymphocytes T pourrait avoir d'autres conséquences fonctionnelles sur les cellules stromales des ganglions. Les données obtenues en collaboration avec l'équipe de Lucie Peduto à l'Institut Pasteur montrent que l'expression du gène codant pour l'alarmine IL-33 est augmentée dans les cellules stromales issues des ganglions mésentériques des souris $CD3\epsilon^{-/-}$ par comparaison aux souris hétérozygotes contrôles (cf article en préparation). Ces observations suggèrent que les cellules stromales pourraient jouer le rôle de relais dans la régulation des ILC par les lymphocytes T. L'analyse de l'expression d'autres gènes impliqués dans la fonction et l'activation des cellules stromales des tissus lymphoïdes en présence ou en absence de lymphocytes T (RNAseq ou qPCRArray en multiplex) permettraient d'identifier d'autres facteurs impliqués dans la régulation directe ou indirecte du compartiment stromal par les lymphocytes T. Ces analyses devront cependant être confirmées par des approches expérimentales complémentaires visant à invalider génétiquement ou à neutraliser temporairement certains de ces facteurs.

c. Evaluation du rôle du microbiote intestinal dans la régulation de l'homéostasie des ILC

i. Perspective sur le rôle des lymphocytes T dans la diversification du microbiote intestinal et la régulation de l'homéostasie des ILC3

Nous avons montré que le sevrage joue un rôle prépondérant dans l'induction de certaines populations d'ILC chez les souris déficientes en lymphocytes T et nous avons mis en évidence le rôle du microbiote intestinal dans la régulation de l'abondance et de l'activité des ILC3 grâce à des traitements antibiotiques effectués dès la naissance. Par ailleurs les rôles joués par les lymphocytes T sur la composition du microbiote et le métabolisme de l'hôte impactent significativement l'activité des ILC3 des les premières semaines après la naissance (Mao et al., 2018). Ainsi, le transfert adoptif de lymphocytes T $CD4^+$ au sein de souriceaux $CD3\epsilon^{-/-}$ permettrait de déterminer si la reconstitution du compartiment T avant le sevrage

impacte l'homéostasie des ILC de la même manière que lorsque les transferts sont effectués chez l'adulte (cf schémas expérimental, [figure 39](#)).

De plus, dans l'objectif d'évaluer le rôle de la diversité du microbiote intestinal sur la régulation des ILC3 dans la *lamina propria* de l'intestin (Kawamoto et al., 2014), l'analyse de la composition et de la fonction des ILC dans les mLN et les intestins de souris $CD3\epsilon^{-/-}$ axéniques « gavées » avec le microbiote intestinal de souris $CD3\epsilon^{-/-}$, $CD3\epsilon^{+/-}$ ou $CD3\epsilon^{-/-}$ reconstituées avec des lymphocytes T $CD4^{+}$ polyclonaux ou Tregs $CD4^{+}$ Foxp3⁺ pourrait être effectuée (cf schémas expérimental, [figure 39](#)).

ii. Perspectives sur le rôle des cellules dendritiques (DC) dans la régulation des ILC3 NKp46⁺

L'équipe de Gérard Eberl a proposé que la sécrétion d'IL-25 par les cellules épithéliales de l'intestin stimulées par la flore microbienne pourrait induire l'inhibition de la production d'IL-23 par les DC qui contrôlent indirectement l'activation des ILC3 NKp46⁺ en réponse aux bactéries commensales ou entéro-pathogènes (Sawa et al., 2011). Une analyse préliminaire menée par notre équipe révèle une diminution significative de l'expression du gène codant l'IL-25 dans l'iléon distal des intestins de souris déficientes en lymphocytes T par comparaison aux hôtes immuno-compétents. Cette diminution pourrait correspondre à une levée de l'inhibition des DC par l'IL-25 et à une augmentation significative de l'expression de l'IL-23. Le traitement des hôtes immuno-déficientes par des antibiotiques dès la naissance ou le transfert adoptif de cellules T $CD4^{+}$ pourraient à l'inverse induire une suppression de la production de cette cytokine par les DC. L'analyse par qPCR des transcrits codants l'IL-23 par les cellules dendritiques résidentes de la *lamina propria* de l'intestin de souris $CD3\epsilon^{-/-}$ et $CD3\epsilon^{+/-}$ traitées ou non par les antibiotiques et de souris $CD3\epsilon^{-/-}$ reconstituées avec des lymphocytes T $CD4^{+}$ polyclonaux ou $CD4^{+}$ OTII (cf schémas expérimental, [figure 37](#)) permettrait de tester ces hypothèses.

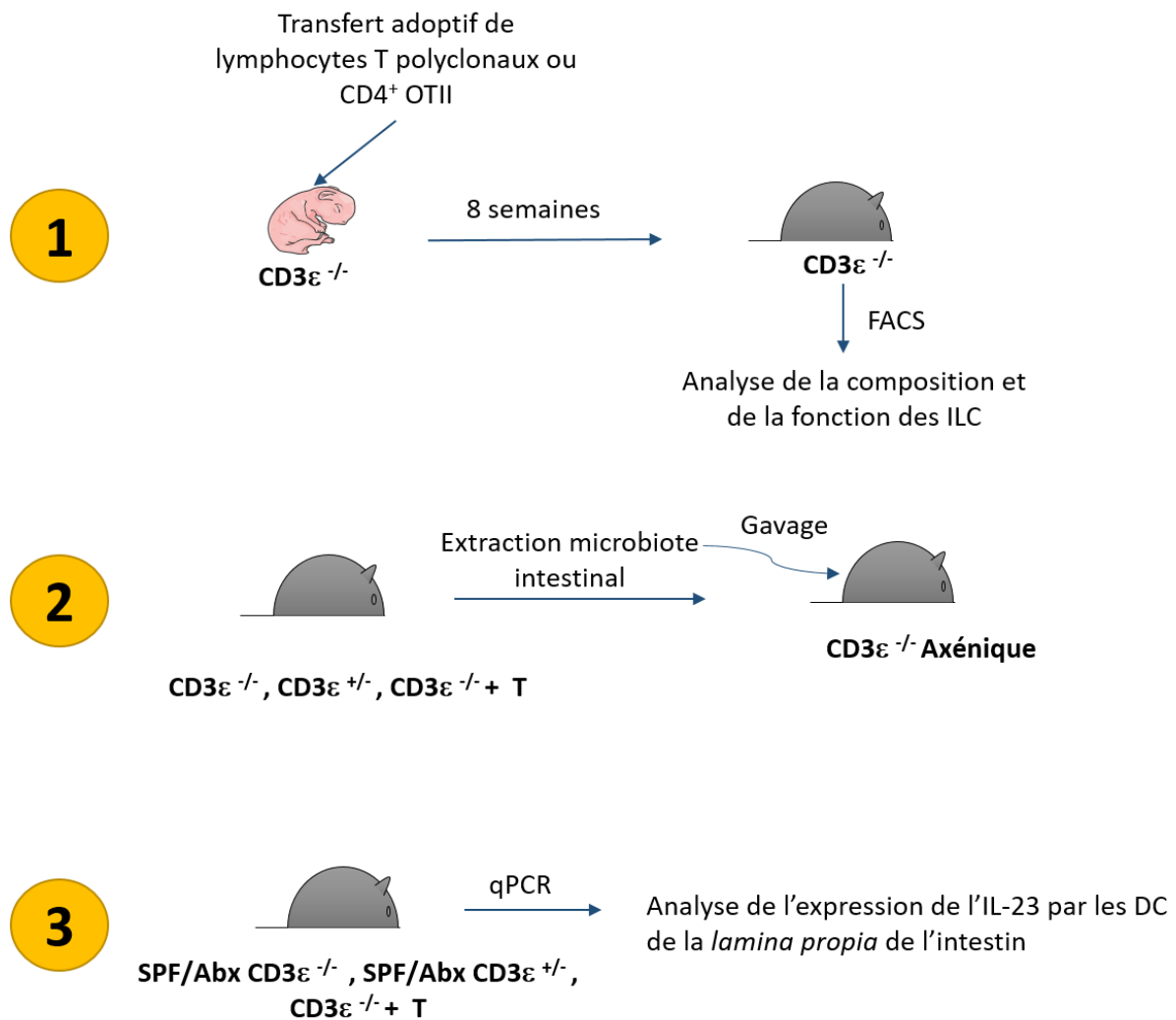


Figure 37 : Stratégie expérimentale des perspectives de recherches axées sur le rôle du microbiote intestinal dans la régulation de l'homéostasie des ILC : **1)** Transfert adoptif de lymphocytes T polyclonaux, CD4⁺ OTII au sein de souriceaux de 1-2 jours afin d'évaluer leur rôle sur l'homéostasie des ILC à ce stade de développement de la souris. **2)** Gavage de souris CD3ε^{-/-} axéniques avec le microbiote intestinal de souris CD3ε^{+/-}, CD3ε^{-/-}, ou CD3ε^{-/-} reconstituées par les lymphocytes T afin d'évaluer le rôle de la diversité du microbiote intestinal dans la régulation de l'homéostasie des ILC. **3)** Analyse par qPCR de l'expression relative du gène codant pour l'IL-23 au sein des cellules dendritiques (DC) résidentes de la *lamina propria* de l'intestin de souris CD3ε^{+/-} et CD3ε^{-/-} non traitées ou traitées par les antibiotiques ainsi que les souris CD3ε^{-/-} reconstituées par les lymphocytes T dans l'objectif d'évaluer le rôle de ces cellules dans l'activation des ILC3 NKp46⁺.

d. Etude du rôle des lymphocytes B dans la régulation de l'homéostasie des ILC

En vue de l'altération de l'activité et de la composition des ILC au sein des souris Rag2^{-/-} et CD3ε^{-/-} nous avons entrepris d'étudier le rôle de la coopération entre les lymphocytes B et T dans la régulation de l'homéostasie des ILC dans les mLN et la *lamina propria* de l'intestin. Le transfert adoptif de 6 millions de lymphocytes T au sein de souris Rag2^{-/-} induit une diminution significative de la fréquence d'ILC sécrétrices d'IL-22 dans la *lamina propria* de l'intestin. Cependant, ces dernières ne suffisent pas à réguler la sécrétion de cytokines de type 2 par les ILC résidentes des mLN (Figure 38). Ces résultats suggèrent que la régulation des ILC3 par les lymphocytes T CD4⁺ s'effectue indépendamment des lymphocytes B. En revanche, les lymphocytes B pourraient contribuer à la régulation des ILC2 des mLN.

Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées concernant les mécanismes par lesquels les lymphocytes B participent 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 et induction de la tolérance orale via la production d'IgA (voir Introduction).

D'autre part, le transfert adoptif d'1 million de lymphocytes T régulateurs au sein de souris Rag2^{-/-} ne permet pas de diminuer la sécrétion de cytokines de type 2 par les ILC2 localisées dans les mLN ou d'IL-22 par les ILC3 résidentes de la *lamina propria* de l'intestin. Ces observations pourraient se traduire par la faible stabilité du phénotype de ces cellules (transdifférenciation en T effectrices ou Tfh). Ainsi, les investigations suivantes pourraient être effectuées afin de caractériser le rôle des cellules B dans la régulation de l'homéostasie des ILC.

- L'analyse du phénotype des ILC dans les mLN et les intestins de souris μMT^{-/-}, déficientes en lymphocytes B
- Le transfert adoptif de splénocytes totaux, de lymphocytes B sauvages, issues de souris sauvages ou Aicda^{-/-} au sein de souris Rag2^{-/-} et comparés à leur contrôles hétérozygotes Rag2^{+/-} (Wei et al., 2011).

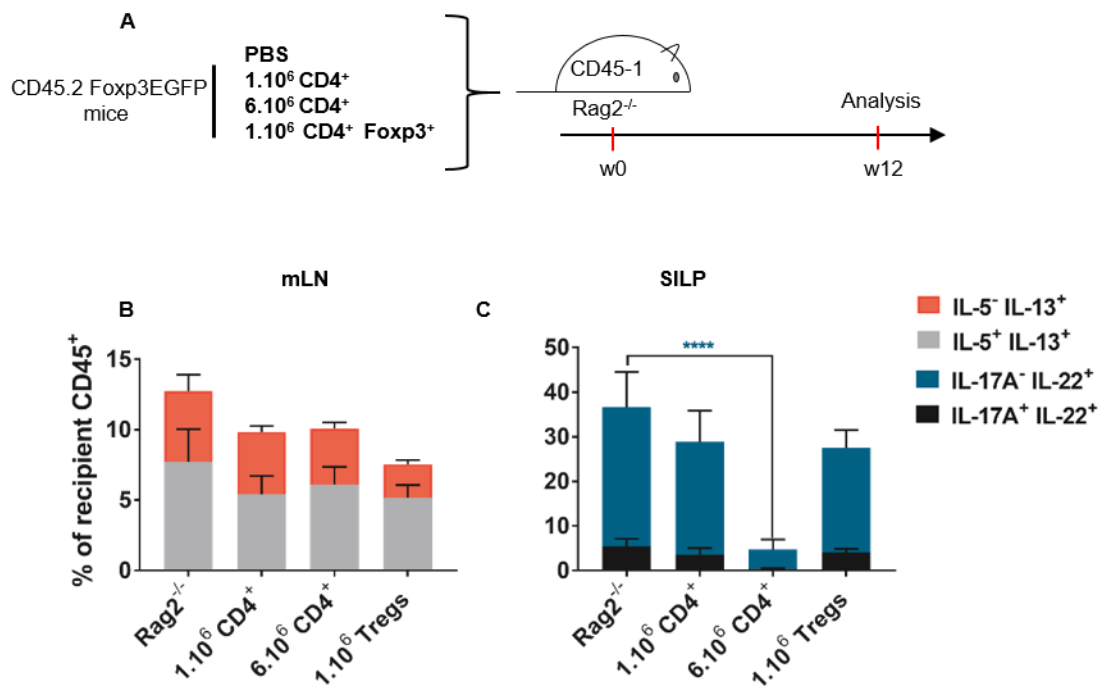


Figure 38 : coopération B-T pourrait participer à la régulation de l'homéostasie des ILC2 résidentes des ganglions méésentériques. **A)** Procédure expérimentale : Les souris immunodéficientes Rag2^{-/-}, ont été injectées avec du PBS (n=4) avec 1.10⁶ (n=3) ou 6.10⁶ (n=4) lymphocytes T CD4⁺ ou 1.10⁶ lymphocytes T CD4⁺ Foxp3⁺ (Tregs) (n=6) isolés à partir des ganglions périphériques et de la rate des souris CD45-2 Foxp3EGFP. Les souris contrôles et reconstituées ont été analysées 12 semaines après injection. **B,C)** Histogrammes montrant le pourcentage d'ILC sécrétrices d'IL-13 et/ou d'IL-5 dans les ganglions méésentériques (mLN) ou d'ILC sécrétrices d'IL-22 et/ou d'IL-17 dans la *lamina propria* de l'intestin (SILP). L'analyse statistique a été effectuée en utilisant la méthode de l'Anova à deux voies, avec alpha = 0.05. ****P<0.0001, ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05.

e. Etude du rôle des Tregs dans la régulation de l'homéostasie des ILC2

Le deuxième volet de l'article traite des mécanismes de régulation de la fréquence et de l'activité des ILC2 par les lymphocytes T. Le transfert adoptif de Tregs a permis de réguler la fréquence et l'activité des ILC2 dans les mLN, au même titre que les lymphocytes T CD4⁺. Toutefois, une partie des Tregs perd l'expression du facteur de transcription Foxp3 et certains peuvent se différencier en Tfh ou en T effecteurs (Fagarasan).

Afin de distinguer le rôle joué par les Treg sur l'homéostasie des ILC de celle des Tfh, nous pourrions stabiliser le phénotype Foxp3⁺ des Treg injectées avec un complexe anti-IL-2-IL-2 (Mao et al., 2018).

Afin de mettre en évidence un rôle direct des Tregs dans la suppression des ILC2, des ILC2 isolés à partir des mLN de souris $CD3\epsilon^{-/-}$ ont été mis en présence de Tregs à un ratio 2/1 en présence d'IL-2 et de l'IL-7 pendant 48h (Figure 39) (Rigas et al., 2017). L'analyse par cytométrie en flux après 48 heures a révélé que la co-culture des ILC2 avec les Tregs augmente significativement la mortalité des ILC2, rendant difficile l'analyse de la sécrétion de cytokines de type 2 par les ILC totales. Cette diminution de la survie des ILC2 pourrait être attribuée à la consommation de l'IL-2 d'origine endogène et exogène par les Tregs ou à une compétition pour les nutriments du milieu.

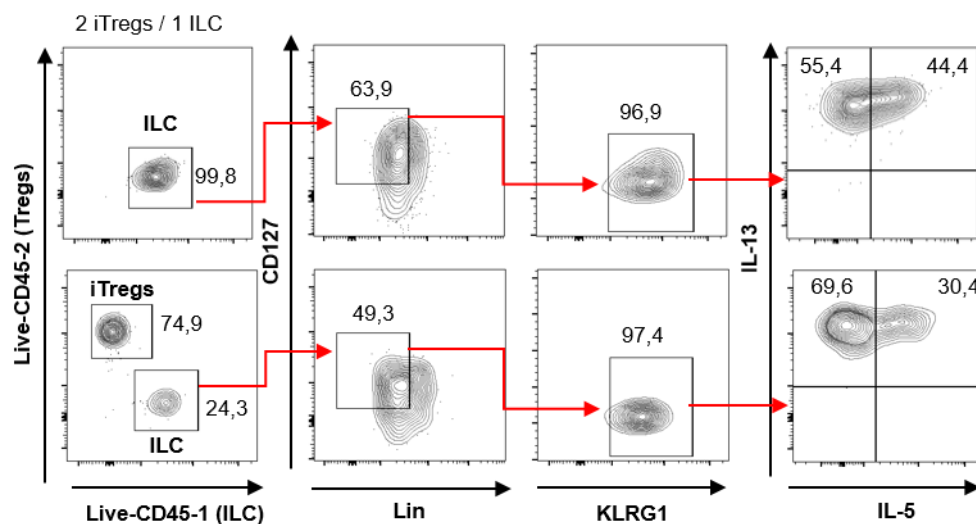


Figure 39 : Etude de l'activité suppressive des iTregs sur les ILC2 *in vitro*. Les ILC2 ont été isolées et triées à partir des ganglions mésentériques de souris $CD3\epsilon^{-/-}$ $CD45.1$ puis mises en culture avec des lymphocytes T $CD4^+$ $Foxp3^+$ issus de la rate et des ganglions de souris $Foxp3EGFP$. 20000 Tregs ont été mises en cultures avec 10000 ILC2. L'analyse de la sécrétion des cytokines de type 2 par les ILC2 $CD127^+$ Lin^- $KLRG1^+$ a été effectuée par cytométrie en flux 48 heures après co-culture. L'analyse du pourcentage de cellules vivantes $CD45.1$ et $CD45.2$ a également été effectuée en parallèle en utilisant un marqueur de viabilité.

f. La régulation de l'homéostasie des ILC2 des mLN par les lymphocytes T

i. Perspectives sur le rôle des lymphocytes T dans la régulation de la sécrétion d'IL-2 par les ILC

Les ILC répondent fortement au microenvironnement tissulaire local et partagent la consommation de divers facteurs de survie tels que l'IL-2, l'IL-33 et l'IL-7 avec les lymphocytes

T occupant une place dominante au sein des ganglions lymphatiques (Figure 8 du mémoire). Nous avons tenté d'expliquer l'augmentation de la fréquence des ILC2 dans les ganglions mésentériques (Figure 1 de l'article en préparation) par une augmentation de la disponibilité de l'IL-2 due à la déficience en lymphocytes T. En effet, les ILC2 expriment la chaîne de haute affinité pour l'IL-2 (CD25), elles seraient donc sensibles aux fluctuations de la disponibilité de l'IL-2 dans leur microenvironnement. Ainsi, nous avons analysé la fraction d'ILC sécrétrices d'IL-2 à l'état d'équilibre dans les mLN et les pLN des souris $CD3\epsilon^{+/-}$ et $CD3\epsilon^{-/-}$ ainsi que dans le contexte d'un transfert adoptif de lymphocytes T. Nos résultats montrent que la fréquence d'ILC sécrétrices d'IL-2 augmente dans les mLN et non dans les pLN des souris déficientes en lymphocytes T, alors que la reconstitution du compartiment lymphocytaire T a tendance à la diminuer dans les deux compartiments (Figure 40). En somme, ces observations suggèrent que les lymphocytes T contrôleraient directement ou indirectement l'abondance des ILC résidentes des ganglions lymphatiques via la consommation d'IL-2. S'ajoute à ces résultats le rôle des lymphocytes T dans la régulation directe ou indirecte de la sécrétion d'IL-33 par les cellules stromales des mLN (Figure 5 de l'article en préparation).

Dans l'objectif de déterminer si ces facteurs participent et/ou coopèrent dans l'activation des ILC2 en absence de lymphocytes T, la neutralisation *in vivo* de l'IL-2 et /ou de l'IL-33 au sein des souris $CD3\epsilon^{-/-}$ serait à effectuer. De plus, il reste à identifier le/les mécanisme(s) (direct ou indirect) par le(s)quel(s) les lymphocytes T agissent sur la régulation des ILC via l'expression de ces facteurs.

Enfin, il a été montré que dans le contexte d'une infection par *NB*, la sécrétion autocrine d'IL-9 par les ILC2 pulmonaires promeut l'accumulation et la survie de ces cellules en induisant l'expression de molécules anti-apoptotiques (Turner et al., 2013). Afin d'identifier un éventuel rôle de l'IL-9 dans l'accumulation des ILC2 en absence de lymphocytes T, l'analyse de la sécrétion de l'IL-9 par les ILC2 résidentes des mLN au sein des souris $CD3\epsilon^{-/-}$ ou reconstituées pourrait être effectuée.

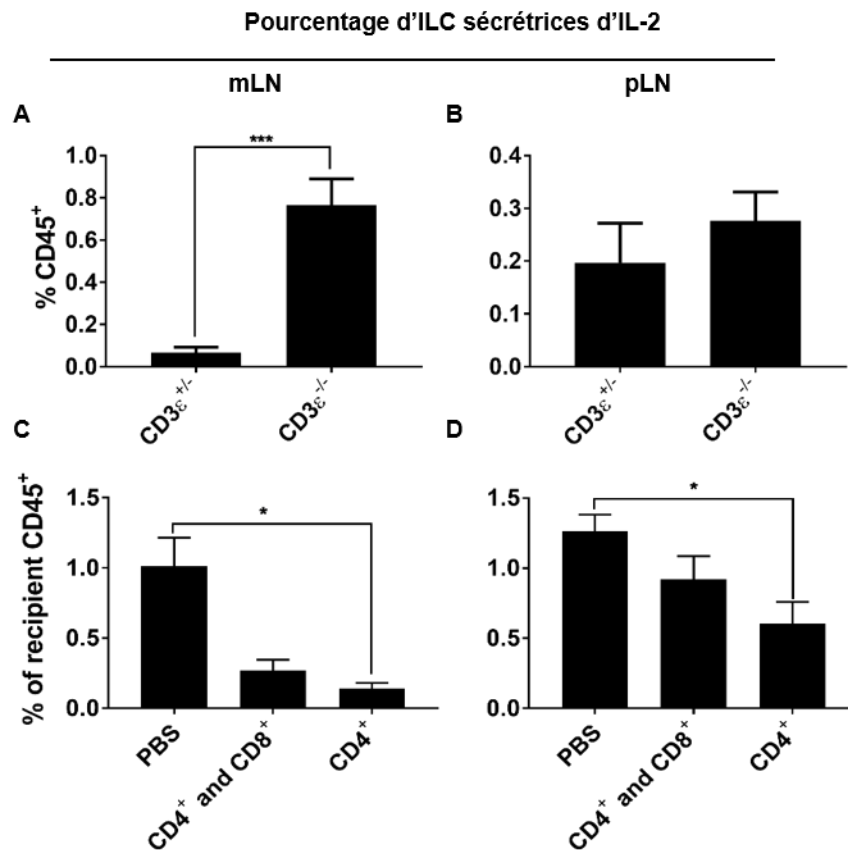


Figure 40 : La déficience en lymphocytes T conduit à une augmentation de la sécrétion d'IL-2 par les ILC résidentes des ganglions mésentériques. A, B) Histogrammes montrant le pourcentage d'ILC sécrétrices d'IL-2 parmi les cellules CD45⁺ dans les ganglions mésentériques (mLN) et périphériques (pLN). **C, D)** Les souris CD3 $\epsilon^{-/-}$ ont été reconstituées avec 1,5.10⁶ cellules d'un mélange de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ (n=4), des lymphocytes T CD4⁺ seuls (n=5) ou des lymphocytes T CD4⁺ isolés à partir de souris RAG^{-/-} OTII (n=5) ou injectées avec du PBS (n=5). L'analyse du pourcentage d'ILC sécrétrices d'IL-2 a été effectuée dans les ganglions mésentériques (mLN) et périphériques (pLN) des souris receveuses 12 semaines après injection. L'analyse statistique a été effectuée en utilisant la méthode de l'Anova à une voie, avec alpha = 0.05. ****P<0.0001, ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05.

ii. Perspective sur le rôle des Interactions lymphocytes T- cellules stromales dans la régulation de l'homéostasie des ILC2 localisées dans les mLN

Nos résultats montrent que l'augmentation de l'expression de l'IL-33 par les cellules stromales des mLN des souris CD3 $\epsilon^{-/-}$ serait en partie responsable de l'augmentation de l'abondance et de l'activité des ILC2 dans les mLN. De plus, la reconstitution du compartiment T chez ces souris CD3 $\epsilon^{-/-}$ réduit l'expression de cette alarmine par les cellules stromales,

confirmant le rôle direct ou indirect dans la régulation de l'homéostasie des ILC2 des mLN (Figure 5). Nous émettons l'hypothèse que la coopération entre les lymphocytes T activés exprimant la lymphotoxine $\alpha\beta$ avec les cellules stromales exprimant le récepteur à la lymphotoxine pourrait constituer un mécanisme de régulation négative de la sécrétion de l'alarmine IL-33 par ces dernières. L'analyse de la composition et de la fonction des ILC dans les mLN des souris $CD3\epsilon^{-/-}$ reconstituées avec des lymphocytes T provenant de souris $LT\alpha\beta^{-/-}$ pourrait alors être effectuée.

VIII. CONCLUSION GENERALE

L'altération de la composition et de la fonction des ILC résidentes des mLN et des intestins observée chez les souris RAG^{-/-} a conduit à nous interroger sur le rôle des cellules du système immunitaire adaptatif dans la régulation de l'homéostasie des ILC, cet aspect étant très peu abordé dans la littérature (Korn et al., 2014; Mackley et al., 2015). Nous avons montré que les lymphocytes T participent à la régulation des ILC2 et des ILC3 CCR6⁺ dans les mLN et des ILC3 NKp46⁺ dans la *lamina propria* de l'intestin spécifiquement après le sevrage.

Puis, nous avons pu démontrer grâce au traitement par les antibiotiques de souris sauvages et déficientes en lymphocytes T que le confinement du microbiote intestinal induit par les lymphocytes T est suffisant pour réguler la composition, la fréquence et l'activité des ILC3 NKp46⁺ dans la *lamina propria* de l'intestin et des LTi-Like des mLN. Ces résultats concordent avec l'étude récemment publiée de Mao et al., rapportant que les lymphocytes T CD4⁺ jouent un rôle dans la régulation de l'activité des ILC3 en induisant le confinement de certaines espèces bactériennes telles que SFB (Mao et al., 2018). Par ailleurs, ce traitement a permis de réduire l'activité des ILC2 résidentes des mLN, bien que celle-ci demeure significativement plus élevée que chez des souris immunocompétentes.

De surcroît, nous avons également observé que, dans le contexte d'un transfert adoptif, l'activation des lymphocytes T est nécessaire pour induire la régulation des ILC dans les mLN et les intestins des souris CD3 ϵ ^{-/-}. Cependant, bien que ces résultats soient transposables au souris Rag^{-/-} dans le cas des ILC3 de la *lamina propria*, la fréquence des ILC2 reste anormalement élevée dans les mLN de ces souris après transfert adoptif de lymphocytes T CD4⁺.

Nous avons mis en évidence que l'expression relative du gène codant pour l'alarmine IL-33 est augmentée dans les ganglions mésentériques des souris déficientes en lymphocytes T par rapport aux hôtes immunocompétents. Puis, nous avons confirmé que l'IL-33 participe à l'accumulation et à l'activation des ILC2 dans les mLN des souris CD3 ϵ ^{-/-} en neutralisant cette alarmine *in vivo*. Ainsi, l'alarmine IL-33 pourrait faire partie des facteurs qui sont régulés directement ou indirectement par les lymphocytes T. Par ailleurs, la collaboration avec l'équipe de Lucie Peduto à l'Institut Pasteur de Paris a permis de déterminer que les cellules stromales des ganglions pourraient constituer une source d'IL-33. Ces observations concordent avec celles qui ont été faites dans le mésentère et les ganglions lymphatiques chez

la souris (Koga et al., 2018; Pichery et al., 2012). En effet, l'expression relative du gène codant pour l'IL-33 par les cellules stromales des mLN varie de la même manière que dans le tissu en absence de cellules T et diminue significativement après reconstitution des souris CD3 $\epsilon^{-/-}$. Ainsi, nous avons mis en évidence une régulation par les lymphocytes T de l'expression des transcrits codant l'IL-33 et exprimés par les cellules stromales.

En somme, ce travail de thèse a permis de mettre en évidence certains mécanismes n'ayant jamais été décrits dans la littérature (Figure 41):

- Le déficit en lymphocyte T impact l'abondance et l'activité des ILC résidentes des mLN et de la *lamina propria* de l'intestin après le sevrage.
- La régulation des ILC2 et des ILC3 par les lymphocytes T s'effectue par des mécanismes spécifiques de l'environnement tissulaire
- A l'état d'équilibre, le microbiote intestinal participe partiellement à l'homéostasie des ILC2 résidentes des mLN
- La diversité du répertoire des TCR et/ou l'activation des lymphocytes T sont nécessaires à la régulation des ILC dans le contexte de la reconstitution du compartiment T chez l'adulte.
- Les lymphocytes T régulent l'homéostasie des ILC2 résidentes des mLN en limitant la production d'IL-33 par les cellules stromales

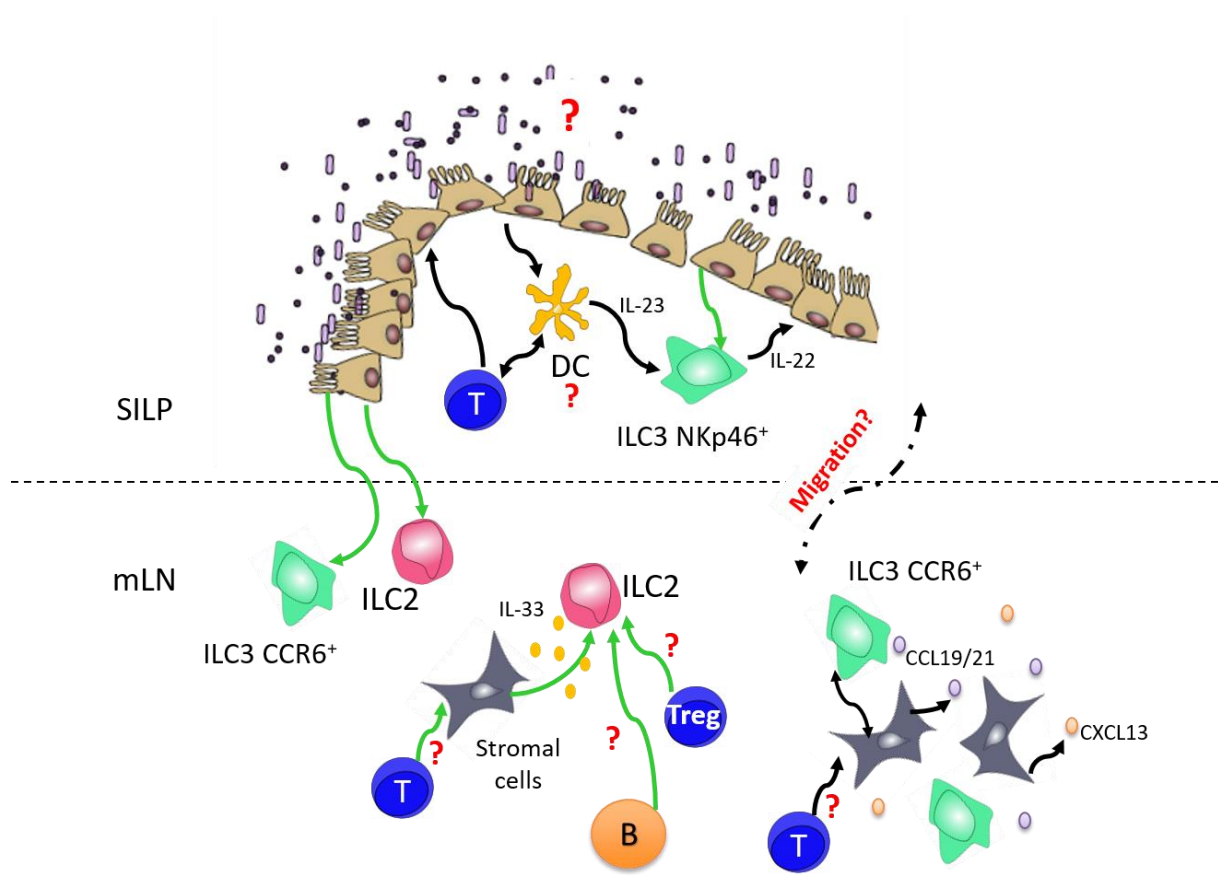


Figure 41 : Conclusion générale et perspectives. Schéma détaillant les mécanismes mis en évidence lors de ce travail de thèse (flèches vertes), les perspectives de recherches (points d'interrogation rouges) et une partie des éléments connus dans la littérature (flèches noires). SILP = *lamina propria* de l'intestin, mLN= ganglions mésentériques, T= lymphocytes T, B= lymphocytes B, Treg= lymphocytes T régulateurs, DC= cellules dendritiques, ILC= cellules lymphoïdes innées.

Références bibliographiques

- Abt, M.C., Lewis, B.B., Caballero, S., Xiong, H., Carter, R.A., Sušac, B., Ling, L., Leiner, I., and Pamer, E.G. (2015). Innate Immune Defenses Mediated by Two ILC Subsets Are Critical for Protection against Acute *Clostridium difficile* Infection. *Cell Host Microbe* 18, 27–37.
- Adachi, S., Yoshida, H., Kataoka, H., and Nishikawa, S. (1997). Three distinctive steps in Peyer's patch formation of murine embryo. *Int. Immunol.* 9, 507–514.
- Adachi, S., Yoshida, H., Honda, K., Maki, K., Saijo, K., Ikuta, K., Saito, T., and Nishikawa, S.I. (1998). Essential role of IL-7 receptor alpha in the formation of Peyer's patch anlage. *Int. Immunol.* 10, 1–6.
- Afzali, B., Lombardi, G., Lechler, R.I., and Lord, G.M. (2007). The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin. Exp. Immunol.* 148, 32–46.
- Allen, C.D., Okada, T., and Cyster, J.G. (2007). Germinal Center Organization and Cellular Dynamics. *Immunity* 27, 190–202.
- Aparicio-Domingo, P., Romera-Hernandez, M., Karrich, J.J., Cornelissen, F., Papazian, N., Lindenbergh-Kortleve, D.J., Butler, J.A., Boon, L., Coles, M.C., Samsom, J.N., et al. (2015). Type 3 innate lymphoid cells maintain intestinal epithelial stem cells after tissue damage. *J. Exp. Med.* 212, 1783–1791.
- Artis, D., and Spits, H. (2015). The biology of innate lymphoid cells. *Nature* 517, nature14189.
- Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., Cheng, G., Yamasaki, S., Saito, T., Ohba, Y., et al. (2011). Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science* 331, 337–341.
- Aujla, S.J., Chan, Y.R., Zheng, M., Fei, M., Askew, D.J., Pociask, D.A., Reinhart, T.A., McAllister, F., Edeal, J., Gaus, K., et al. (2008). IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat. Med.* 14, 275–281.

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 β , IL-4 and IL-12 control the fate of group 2 innate lymphoid cells in human airway inflammation in the lungs. *Nat. Immunol.*

Ballantyne, S.J., Barlow, J.L., Jolin, H.E., Nath, P., Williams, A.S., Chung, K.F., Sturton, G., Wong, S.H., and McKenzie, A.N.J. (2007). Blocking IL-25 prevents airway hyperresponsiveness in allergic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* *120*, 1324–1331.

Bar-Ephraïm, Y.E., and Mebius, R.E. (2016). Innate lymphoid cells in secondary lymphoid organs. *Immunol. Rev.* *271*, 185–199.

Barlow, J.L., Bellosi, A., Hardman, C.S., Drynan, L.F., Wong, S.H., Cruickshank, J.P., and McKenzie, A.N.J. (2012). Innate IL-13-producing nuocytes arise during allergic lung inflammation and contribute to airways hyperreactivity. *J. Allergy Clin. Immunol.* *129*, 191-198.e1-4.

Barnie, P.A., Lin, X., Liu, Y., Xu, H., and Su, Z. (2015). IL-17 producing innate lymphoid cells 3 (ILC3) but not Th17 cells might be the potential danger factor for preeclampsia and other pregnancy associated diseases. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* *8*, 11100–11107.

Barnig, C., Cernadas, M., Dutilleul, S., Liu, X., Perrella, M.A., Kazani, S., Wechsler, M.E., Israel, E., and Levy, B.D. (2013). Lipoxin A4 regulates natural killer cell and type 2 innate lymphoid cell activation in asthma. *Sci. Transl. Med.* *5*, 174ra26.

Bartemes, K.R., Iijima, K., Kobayashi, T., Kephart, G.M., McKenzie, A.N., and Kita, H. (2012). IL-33-responsive lineage- CD25⁺ CD44(hi) lymphoid cells mediate innate type 2 immunity and allergic inflammation in the lungs. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *188*, 1503–1513.

Bauer, H., Horowitz, R.E., Levenson, S.M., and Popper, H. (1963). The response of the lymphatic tissue to the microbial flora. Studies on germfree mice. *Am. J. Pathol.* *42*, 471–483.

Beatty, G.L., and Paterson, Y. (2001). IFN- γ -Dependent Inhibition of Tumor Angiogenesis by Tumor-Infiltrating CD4⁺ T Cells Requires Tumor Responsiveness to IFN- γ . *J. Immunol.* *166*, 2276–2282.

- Becattini, S., Taur, Y., and Pamer, E.G. (2016). Antibiotic-Induced Changes in the Intestinal Microbiota and Disease. *Trends Mol. Med.* 22, 458–478.
- Bell, E.B., Sparshott, S.M., Drayson, M.T., and Ford, W.L. (1987). The stable and permanent expansion of functional T lymphocytes in athymic nude rats after a single injection of mature T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 139, 1379–1384.
- Bénézech, C., White, A., Mader, E., Serre, K., Parnell, S., Pfeffer, K., Ware, C.F., Anderson, G., and Caamaño, J.H. (2010). Ontogeny of stromal organizer cells during lymph node development. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 184, 4521–4530.
- Bergqvist, P., Gärdby, E., Stensson, A., Bemark, M., and Lycke, N.Y. (2006). Gut IgA class switch recombination in the absence of CD40 does not occur in the lamina propria and is independent of germinal centers. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 177, 7772–7783.
- Bermon, S., Petriz, B., Kajėnienė, A., Prestes, J., Castell, L., and Franco, O.L. (2015). The microbiota: an exercise immunology perspective. *Exerc. Immunol. Rev.* 21, 70–79.
- Bernink, J.H., Peters, C.P., Munneke, M., te Velde, A.A., Meijer, S.L., Weijer, K., Hreggvidsdottir, H.S., Heinsbroek, S.E., Legrand, N., Buskens, C.J., et al. (2013). Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues. *Nat. Immunol.* 14, 221–229.
- Bernink, J.H., Krabbendam, L., Germar, K., de Jong, E., Gronke, K., Kofoed-Nielsen, M., Munneke, J.M., Hazenberg, M.D., Villaudy, J., Buskens, C.J., et al. (2015). Interleukin-12 and -23 Control Plasticity of CD127(+) Group 1 and Group 3 Innate Lymphoid Cells in the Intestinal Lamina Propria. *Immunity* 43, 146–160.
- Bernink, J.H., Mjösberg, J., and Spits, H. (2017). Human ILC1: To Be or Not to Be. *Immunity* 46, 756–757.
- Björklund, Å.K., Forkel, M., Picelli, S., Konya, V., Theorell, J., Friberg, D., Sandberg, R., and Mjösberg, J. (2016). Corrigendum: The heterogeneity of human CD127(+) innate lymphoid cells revealed by single-cell RNA sequencing. *Nat. Immunol.* 17, 740.
- Blazar, B.R., Murphy, W.J., and Abedi, M. (2012). Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 443–458.

Blom, B., and Spits, H. (2006). Development of human lymphoid cells. *Annu. Rev. Immunol.* *24*, 287–320.

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.

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

Bradley, L.M., Dalton, D.K., and Croft, M. (1996). A direct role for IFN-gamma in regulation of Th1 cell development. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *157*, 1350–1358.

Brestoff, J.R., Kim, B.S., Saenz, S.A., Stine, R.R., Monticelli, L.A., Sonnenberg, G.F., Thome, J.J., Farber, D.L., Lutfy, K., Seale, P., et al. (2015). Group 2 innate lymphoid cells promote beiging of white adipose tissue and limit obesity. *Nature* *519*, 242–246.

Britanova, L., and Diefenbach, A. (2017). Interplay of innate lymphoid cells and the microbiota. *Immunol. Rev.* *279*, 36–51.

Brown, M.A., and Russi, A.E. (2017). (T)Betting on innate lymphoid cells in CNS inflammatory disease. *Nat. Immunol.* *18*, 1063–1064.

Buettner, M., and Lochner, M. (2016). Development and Function of Secondary and Tertiary Lymphoid Organs in the Small Intestine and the Colon. *Front. Immunol.* *7*.

Bunker, J.J., Flynn, T.M., Koval, J.C., Shaw, D.G., Meisel, M., McDonald, B.D., Ishizuka, I.E., Dent, A.L., Wilson, P.C., Jabri, B., et al. (2015). Innate and Adaptive Humoral Responses Coat Distinct Commensal Bacteria with Immunoglobulin A. *Immunity* *43*, 541–553.

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

von Burg, N., Turchinovich, G., and Finke, D. (2015). Maintenance of Immune Homeostasis through ILC/T Cell Interactions. *Front. Immunol.* *6*.

Califano, D., Cho, J.J., Uddin, M.N., Lorentsen, K.J., Yang, Q., Bhandoola, A., Li, H., and Avram, D. (2015). Transcription Factor Bcl11b Controls Identity and Function of Mature Type 2 Innate Lymphoid Cells. *Immunity* 43, 354–368.

Carrega, P., Loiacono, F., Carlo, E.D., Scaramuccia, A., Mora, M., Conte, R., Benelli, R., Spaggiari, G.M., Cantoni, C., Campana, S., et al. (2015). NCR⁺ILC3 concentrate in human lung cancer and associate with intratumoral lymphoid structures. *Nat. Commun.* 6, 8280.

Carrega, P., Campana, S., Bonaccorsi, I., and Ferlazzo, G. (2016). The Yin and Yang of Innate Lymphoid Cells in Cancer. *Immunol. Lett.*

Caruso, R.A., Parisi, A., Quattrocchi, E., Scardigno, M., Branca, G., Parisi, C., Lucianò, R., Paparo, D., and Fedele, F. (2011). Ultrastructural Descriptions of Heterotypic Aggregation between Eosinophils and Tumor Cells in Human Gastric Carcinomas. *Ultrastruct. Pathol.* 35, 145–149.

Cella, M., Fuchs, A., Vermi, W., Facchetti, F., Otero, K., Lennerz, J.K.M., Doherty, J.M., Mills, J.C., and Colonna, M. (2009). A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature* 457, 722–725.

Chang, Y.-J., Kim, H.Y., Albacker, L.A., Baumgarth, N., McKenzie, A.N.J., Smith, D.E., Dekruyff, R.H., and Umetsu, D.T. (2011). Innate lymphoid cells mediate influenza-induced airway hyper-reactivity independently of adaptive immunity. *Nat. Immunol.* 12, 631–638.

Chanmee, T., Ontong, P., Konno, K., and Itano, N. (2014). Tumor-Associated Macrophages as Major Players in the Tumor Microenvironment. *Cancers* 6, 1670–1690.

Chappaz, S., Gärtner, C., Rodewald, H.-R., and Finke, D. (2010). Kit ligand and Il7 differentially regulate Peyer's patch and lymph node development. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 185, 3514–3519.

Chawla-Sarkar, M., Lindner, D.J., Liu, Y.-F., Williams, B.R., Sen, G.C., Silverman, R.H., and Borden, E.C. (2003). Apoptosis and interferons: Role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis* 8, 237–249.

Chea, S., Perchet, T., Petit, M., Verrier, T., Guy-Grand, D., Banchi, E.-G., Vosshenrich, C.A.J., Di Santo, J.P., Cumano, A., and Golub, R. (2016). Notch signaling in group 3 innate lymphoid cells modulates their plasticity. *Sci. Signal.* *9*, ra45.

Cherrier, M., and Eberl, G. (2012). The development of LTi cells. *Curr. Opin. Immunol.* *24*, 178–183.

Cherrier, M., Sawa, S., and Eberl, G. (2012). Notch, Id2, and ROR γ t sequentially orchestrate the fetal development of lymphoid tissue inducer cells. *J. Exp. Med.* *209*, 729–740.

Chin, Y.E., Kitagawa, M., Su, W.C., You, Z.H., Iwamoto, Y., and Fu, X.Y. (1996). Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1/CIP1 mediated by STAT1. *Science* *272*, 719–722.

Cochez, P.M., Michiels, C., Hendrickx, E., Van Belle, A.B., Lemaire, M.M., Dauguet, N., Warnier, G., de Heusch, M., Togbe, D., Ryffel, B., et al. (2016). AhR modulates the IL-22-producing cell proliferation/recruitment in imiquimod-induced psoriasis mouse model. *Eur. J. Immunol.* *46*, 1449–1459.

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.

Conti, H.R., and Gaffen, S.L. (2015). IL-17-mediated immunity to the opportunistic fungal pathogen *Candida albicans*. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *195*, 780–788.

Cording, S., Medvedovic, J., Aychek, T., and Eberl, G. (2016). Innate lymphoid cells in defense, immunopathology and immunotherapy. *Nat. Immunol.* *17*, 755–757.

Cortez, V.S., Fuchs, A., Cella, M., Gilfillan, S., and Colonna, M. (2014). Cutting edge: Salivary gland NK cells develop independently of Nfil3 in steady-state. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *192*, 4487–4491.

Cosmi, L., and Annunziato, F. (2017). Group 2 Innate Lymphoid Cells Are the Earliest Recruiters of Eosinophils in Lungs of Patients with Allergic Asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *196*, 666–668.

- Crellin, N.K., Trifari, S., Kaplan, C.D., Satoh-Takayama, N., Di Santo, J.P., and Spits, H. (2010). Regulation of Cytokine Secretion in Human CD127+ LTi-like Innate Lymphoid Cells by Toll-like Receptor 2. *Immunity* 33, 752–764.
- Croft, M., So, T., Duan, W., and Soroosh, P. (2009). The significance of OX40 and OX40L to T-cell biology and immune disease. *Immunol. Rev.* 229, 173–191.
- Cupedo, T., Crellin, N.K., Papazian, N., Rombouts, E.J., Weijer, K., Grogan, J.L., Fibbe, W.E., Cornelissen, J.J., and Spits, H. (2009). Human fetal lymphoid tissue-inducer cells are interleukin 17-producing precursors to RORC+ CD127+ natural killer-like cells. *Nat. Immunol.* 10, 66–74.
- Diefenbach, A., Colonna, M., and Koyasu, S. (2014). Development, differentiation and diversity of innate lymphoid cells. *Immunity* 41, 354–365.
- Drake, L.Y., Iijima, K., and Kita, H. (2014). Group 2 innate lymphoid cells and CD4+ T cells cooperate to mediate type 2 immune response in mice. *Allergy* 69, 1300–1307.
- Drake, L.Y., Iijima, K., Bartemes, K., and Kita, H. (2016). Group 2 Innate Lymphoid Cells Promote An Early Antibody Response To A Respiratory Antigen In Mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 197, 1335–1342.
- Dudakov, J.A., Hanash, A.M., Jenq, R.R., Young, L.F., Ghosh, A., Singer, N.V., West, M.L., Smith, O.M., Holland, A.M., Tsai, J.J., et al. (2012). Interleukin-22 drives endogenous thymic regeneration in mice. *Science* 336, 91–95.
- Dullaers, M., Li, D., Xue, Y., Ni, L., Gayet, I., Morita, R., Ueno, H., Palucka, K.A., Banchereau, J., and Oh, S. (2009). A T cell-dependent mechanism for the induction of human mucosal homing immunoglobulin A-secreting plasmablasts. *Immunity* 30, 120–129.
- Dyken, S.J.V., and Locksley, R.M. (2013). Interleukin-4- and Interleukin-13-Mediated Alternatively Activated Macrophages: Roles in Homeostasis and Disease. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 317–343.

Dyring-Andersen, B., Geisler, C., Agerbeck, C., Lauritsen, J.P.H., Gúdjonsdottir, S.D., Skov, L., and Bonfeld, C.M. (2014). Increased number and frequency of group 3 innate lymphoid cells in nonlesional psoriatic skin. *Br. J. Dermatol.* *170*, 609–616.

Eberl, G. (2005). Inducible lymphoid tissues in the adult gut: recapitulation of a fetal developmental pathway? *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 413–420.

Eberl, G. (2016). ROR γ t, a multitask nuclear receptor at mucosal surfaces. *Mucosal Immunol.*

Eberl, G., and Littman, D.R. (2004). Thymic Origin of Intestinal $\alpha\beta$ T Cells Revealed by Fate Mapping of ROR γ t⁺ Cells. *Science* *305*, 248–251.

Eberl, G., and Lochner, M. (2009). The development of intestinal lymphoid tissues at the interface of self and microbiota. *Mucosal Immunol.* *2*, 478.

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 γ t in the generation of fetal lymphoid tissue inducer cells. *Nat. Immunol.* *5*, 64–73.

Eberl, G., Colonna, M., Di Santo, J.P., and McKenzie, A.N.J. (2015). Innate Lymphoid Cells: a new paradigm in immunology. *Science* *348*, aaa6566.

Eken, A., and Donmez-Altuntas, H. (2017). Innate Lymphoid Cells (Non-NK ILCs).

Ermann, J., Staton, T., Glickman, J.N., de Waal Malefyt, R., and Glimcher, L.H. (2014). Nod/Ripk2 signaling in dendritic cells activates IL-17A-secreting innate lymphoid cells and drives colitis in T-bet^{-/-}.Rag2^{-/-} (TRUC) mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, E2559-2566.

Ernst, B., Lee, D.S., Chang, J.M., Sprent, J., and Surh, C.D. (1999). The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the periphery. *Immunity* *11*, 173–181.

Eyerich, K., Dimartino, V., and Cavani, A. (2017). IL-17 and IL-22 in immunity: Driving protection and pathology. *Eur. J. Immunol.* *47*, 607–614.

Fagarasan, S. (2008). Evolution, development, mechanism and function of IgA in the gut. *Curr. Opin. Immunol.* *20*, 170–177.

Fagarasan, S., Muramatsu, M., Suzuki, K., Nagaoka, H., Hiai, H., and Honjo, T. (2002). Critical roles of activation-induced cytidine deaminase in the homeostasis of gut flora. *Science* 298, 1424–1427.

Fagarasan, S., Kawamoto, S., Kanagawa, O., and Suzuki, K. (2010). Adaptive immune regulation in the gut: T cell-dependent and T cell-independent IgA synthesis. *Annu. Rev. Immunol.* 28, 243–273.

Fallon, P.G., Ballantyne, S.J., Mangan, N.E., Barlow, J.L., Dasvarma, A., Hewett, D.R., McIlgorm, A., Jolin, H.E., and McKenzie, A.N.J. (2006). Identification of an interleukin (IL)-25-dependent cell population that provides IL-4, IL-5, and IL-13 at the onset of helminth expulsion. *J. Exp. Med.* 203, 1105–1116.

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.

Forchielli, M.L., and Walker, W.A. (2005). The role of gut-associated lymphoid tissues and mucosal defence. *Br. J. Nutr.* 93 *Suppl 1*, S41-48.

Fort, M.M., Cheung, J., Yen, D., Li, J., Zurawski, S.M., Lo, S., Menon, S., Clifford, T., Hunte, B., Lesley, R., et al. (2001). IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity* 15, 985–995.

Fry, T.J., and Mackall, C.L. (2001). Interleukin-7: master regulator of peripheral T-cell homeostasis? *Trends Immunol.* 22, 564–571.

Fuchs, A. (2016). ILC1s in Tissue Inflammation and Infection. *Front. Immunol.* 7.

Fuchs, A., Vermi, W., Lee, J.S., Lonardi, S., Gilfillan, S., Newberry, R.D., Cella, M., and Colonna, M. (2013). Intraepithelial type 1 innate lymphoid cells are a unique subset of IL-12- and IL-15-responsive IFN- γ -producing cells. *Immunity* 38, 769–781.

Gaboriau-Routhiau, V., Rakotobe, S., Lécuyer, E., Mulder, I., Lan, A., Bridonneau, C., Rochet, V., Pisi, A., De Paepe, M., Brandi, G., et al. (2009). The key role of segmented filamentous

bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity* 31, 677–689.

Gabrielli, S., Sun, M., Bell, A., Zook, E.C., de Pooter, R.F., Zamai, L., and Kee, B.L. (2017). Murine thymic NK cells are distinct from ILC1s and have unique transcription factor requirements. *Eur. J. Immunol.* 47, 800–805.

Gabrilovich, D.I., and Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived-suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 162–174.

Ganal, S.C., Sanos, S.L., Kallfass, C., Oberle, K., Johner, C., Kirschning, C., Lienenklaus, S., Weiss, S., Staeheli, P., Aichele, P., et al. (2012). Priming of natural killer cells by nonmucosal mononuclear phagocytes requires instructive signals from commensal microbiota. *Immunity* 37, 171–186.

Gascoyne, D.M., Long, E., Veiga-Fernandes, H., de Boer, J., Williams, O., Seddon, B., Coles, M., Kioussis, D., and Brady, H.J.M. (2009). The basic leucine zipper transcription factor E4BP4 is essential for natural killer cell development. *Nat. Immunol.* 10, 1118–1124.

Gasteiger, G., Fan, X., Dikiy, S., Lee, S.Y., and Rudensky, A.Y. (2015). Tissue residency of innate lymphoid cells in lymphoid and non-lymphoid organs. *Science* aac9593.

Gebert, A., Rothkötter, H.J., and Pabst, R. (1996). M cells in Peyer's patches of the intestine. *Int. Rev. Cytol.* 167, 91–159.

Geiger, T.L., and Sun, J.C. (2016). Development and maturation of natural killer cells. *Curr. Opin. Immunol.* 39, 82–89.

Geiger, R., Rieckmann, J.C., Wolf, T., Basso, C., Feng, Y., Fuhrer, T., Kogadeeva, M., Picotti, P., Meissner, F., Mann, M., et al. (2016). L-Arginine Modulates T Cell Metabolism and Enhances Survival and Anti-tumor Activity. *Cell* 167, 829-842.e13.

Geremia, A., Arancibia-Cárcamo, C.V., Fleming, M.P.P., Rust, N., Singh, B., Mortensen, N.J., Travis, S.P.L., and Powrie, F. (2011). IL-23-responsive innate lymphoid cells are increased in inflammatory bowel disease. *J. Exp. Med.* 208, 1127–1133.

Gladiator, A., Wangler, N., Trautwein-Weidner, K., and LeibundGut-Landmann, S. (2013a). Cutting edge: IL-17-secreting innate lymphoid cells are essential for host defense against fungal infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *190*, 521–525.

Gladiator, A., Wangler, N., Trautwein-Weidner, K., and LeibundGut-Landmann, S. (2013b). Cutting edge: IL-17-secreting innate lymphoid cells are essential for host defense against fungal infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *190*, 521–525.

Goldenberg, M.M. (2012). Multiple Sclerosis Review. *Pharm. Ther.* *37*, 175–184.

Gomez de Agüero, M., Ganal-Vonarburg, S.C., Fuhrer, T., Rupp, S., Uchimura, Y., Li, H., Steinert, A., Heikenwalder, M., Hapfelmeier, S., Sauer, U., et al. (2016). The maternal microbiota drives early postnatal innate immune development. *Science* *351*, 1296–1302.

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

Goverse, G., Labao-Almeida, C., Ferreira, M., Molenaar, R., Wahlen, S., Konijn, T., Koning, J., Veiga-Fernandes, H., and Mebius, R.E. (2016). Vitamin A Controls the Presence of ROR γ ⁺ Innate Lymphoid Cells and Lymphoid Tissue in the Small Intestine. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*.

Gury-BenAri, M., Thaïss, C.A., Serafini, N., Winter, D.R., Giladi, A., Lara-Astiaso, D., Levy, M., Salame, T.M., Weiner, A., David, E., et al. The Spectrum and Regulatory Landscape of Intestinal Innate Lymphoid Cells Are Shaped by the Microbiome. *Cell*.

Hadis, U., Wahl, B., Schulz, O., Hardtke-Wolenski, M., Schippers, A., Wagner, N., Müller, W., Sparwasser, T., Förster, R., and Pabst, O. (2011). Intestinal Tolerance Requires Gut Homing and Expansion of FoxP3⁺ Regulatory T Cells in the Lamina Propria. *Immunity* *34*, 237–246.

Halim, T.Y.F., MacLaren, A., Romanish, M.T., Gold, M.J., McNagny, K.M., and Takei, F. (2012). Retinoic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor alpha is required for natural helper cell development and allergic inflammation. *Immunity* *37*, 463–474.

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.

Halim, T.Y.F., Hwang, Y.Y., Scanlon, S.T., Zaghouani, H., Garbi, N., Fallon, P.G., and McKenzie, A.N.J. (2015). Group 2 innate lymphoid cells license dendritic cells to potentiate memory TH2 cell responses. *Nat. Immunol. advance online publication*.

Hamada, H., Hiroi, T., Nishiyama, Y., Takahashi, H., Masunaga, Y., Hachimura, S., Kaminogawa, S., Takahashi-Iwanaga, H., Iwanaga, T., Kiyono, H., et al. (2002). Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 168, 57–64.

Hams, E., Armstrong, M.E., Barlow, J.L., Saunders, S.P., Schwartz, C., Cooke, G., Fahy, R.J., Crotty, T.B., Hirani, N., Flynn, R.J., et al. (2014). IL-25 and type 2 innate lymphoid cells induce pulmonary fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 367–372.

Hanash, A.M., Dudakov, J.A., Hua, G., O'Connor, M.H., Young, L.F., Singer, N.V., West, M.L., Jenq, R.R., Holland, A.M., Kappel, L.W., et al. (2012). Interleukin-22 protects intestinal stem cells from immune-mediated tissue damage and regulates sensitivity to graft versus host disease. *Immunity* 37, 339–350.

Hatfield, J.K., and Brown, M.A. (2015). Group 3 innate lymphoid cells accumulate and exhibit disease-induced activation in the meninges in EAE. *Cell. Immunol.* 297, 69–79.

Hazenberg, M.D., and Spits, H. (2014). Human innate lymphoid cells. *Blood* 124, 700–709.

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⁺ T cell responses to intestinal commensal bacteria. *Nature* 498, 113–117.

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. (2015a). Group 3 innate lymphoid cells mediate intestinal selection of commensal bacteria-specific CD4⁺ T cells. *Science* 348, 1031–1035.

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. (2015b). Group 3 innate lymphoid cells mediate intestinal selection of commensal bacteria-specific CD4⁺ T cells. *Science* *348*, 1031–1035.

Hooper, L.V. (2004). Bacterial contributions to mammalian gut development. *Trends Microbiol.* *12*, 129–134.

Hooper, L.V. (2011). You AhR What You Eat: Linking Diet and Immunity. *Cell* *147*, 489–491.

Hoorweg, K., and Cupedo, T. (2008). Development of human lymph nodes and Peyer's patches. *Semin. Immunol.* *20*, 164–170.

Hoyler, T., Klose, C.S.N., Souabni, A., Turqueti-Neves, A., Pfeifer, D., Rawlins, E.L., Voehringer, D., Busslinger, M., and Diefenbach, A. (2012). The transcription factor GATA3 controls cell fate and maintenance of type 2 innate lymphoid cells. *Immunity* *37*, 634–648.

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.

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.

Hue, S., Ahern, P., Buonocore, S., Kullberg, M.C., Cua, D.J., McKenzie, B.S., Powrie, F., and Maloy, K.J. (2006). Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* *203*, 2473–2483.

Hughes, T., Becknell, B., Freud, A.G., McClory, S., Briercheck, E., Yu, J., Mao, C., Giovenzana, C., Nuovo, G., Wei, L., et al. (2010). Interleukin-1beta selectively expands and sustains interleukin-22⁺ immature human natural killer cells in secondary lymphoid tissue. *Immunity* *32*, 803–814.

- Ikawa, T., Fujimoto, S., Kawamoto, H., Katsura, Y., and Yokota, Y. (2001). Commitment to natural killer cells requires the helix-loop-helix inhibitor Id2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 5164–5169.
- Ikutani, M., Yanagibashi, T., Ogasawara, M., Tsuneyama, K., Yamamoto, S., Hattori, Y., Kouro, T., Itakura, A., Nagai, Y., Takaki, S., et al. (2012). Identification of Innate IL-5–Producing Cells and Their Role in Lung Eosinophil Regulation and Antitumor Immunity. *J. Immunol.* *188*, 703–713.
- Imai, Y., Yasuda, K., Sakaguchi, Y., Haneda, T., Mizutani, H., Yoshimoto, T., Nakanishi, K., and Yamanishi, K. (2013). Skin-specific expression of IL-33 activates group 2 innate lymphoid cells and elicits atopic dermatitis-like inflammation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 13921–13926.
- Imbert, S., Bresler, P., Boissonnas, A., Gauthier, L., Souchet, L., Uzunov, M., Leblond, V., Mazier, D., Nguyen, S., and Fekkar, A. (2016). Calcineurin inhibitors impair neutrophil activity against *Aspergillus fumigatus* in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *J. Allergy Clin. Immunol.*
- Irshad, S., Flores-Borja, F., Lawler, K., Monypenny, J., Evans, R., Male, V., Gordon, P., Cheung, A., Gazinska, P., Noor, F., et al. (2017). ROR γ t⁺ innate lymphoid cells promote lymph node metastasis of breast cancers. *Cancer Res.*
- Ishizuka, I.E., Constantinides, M.G., Gudjonson, H., and Bendelac, A. (2016). The Innate Lymphoid Cell Precursor. *Annu. Rev. Immunol.* *34*, 299–316.
- Ivanov, I.I., McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J., and Littman, D.R. (2006). The Orphan Nuclear Receptor ROR γ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17⁺ T Helper Cells. *Cell* *126*, 1121–1133.
- Ivanov, I.I., Frutos, R. de L., Manel, N., Yoshinaga, K., Rifkin, D.B., Sartor, R.B., Finlay, B.B., and Littman, D.R. (2008). Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host Microbe* *4*, 337–349.

Ivanov, I.I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E.L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K.C., Santee, C.A., Lynch, S.V., et al. (2009). Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* 139, 485–498.

Iwata, M. (2009). Retinoic acid production by intestinal dendritic cells and its role in T-cell trafficking. *Semin. Immunol.* 21, 8–13.

Iwata, M., Hirakiyama, A., Eshima, Y., Kagechika, H., Kato, C., and Song, S.-Y. (2004). Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity* 21, 527–538.

Jia, Y., Fang, X., Zhu, X., Bai, C., Zhu, L., Jin, M., Wang, X., Hu, M., Tang, R., and Chen, Z. (2016). IL-13+ Type 2 Innate Lymphoid Cells Correlate with Asthma Control Status and Treatment Response. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 55, 675–683.

Jiao, Y., Huntington, N.D., Belz, G.T., and Seillet, C. (2016). Type 1 Innate Lymphoid Cell Biology: Lessons Learnt from Natural Killer Cells. *Front. Immunol.* 7, 426.

Johansen, F.-E., and Kaetzel, C. (2011). Regulation of the polymeric immunoglobulin receptor and IgA transport: New advances in environmental factors that stimulate pIgR expression and its role in mucosal immunity. *Mucosal Immunol.* 4, 598–602.

Jones, G.W., Hill, D.G., and Jones, S.A. (2016). Understanding Immune Cells in Tertiary Lymphoid Organ Development: It Is All Starting to Come Together. *Front. Immunol.* 7.

Jostins, L., Ripke, S., Weersma, R.K., Duerr, R.H., McGovern, D.P., Hui, K.Y., Lee, J.C., Schumm, L.P., Sharma, Y., Anderson, C.A., et al. (2012). Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* 491, 119–124.

Jovanovic, I.P., Pejnovic, N.N., Radosavljevic, G.D., Pantic, J.M., Milovanovic, M.Z., Arsenijevic, N.N., and Lukic, M.L. (2014). Interleukin-33/ST2 axis promotes breast cancer growth and metastases by facilitating intratumoral accumulation of immunosuppressive and innate lymphoid cells. *Int. J. Cancer* 134, 1669–1682.

Kamekura, R., Kojima, T., Takano, K., Go, M., Sawada, N., and Himi, T. (2012). The role of IL-33 and its receptor ST2 in human nasal epithelium with allergic rhinitis. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 42, 218–228.

Kamizono, S., Duncan, G.S., Seidel, M.G., Morimoto, A., Hamada, K., Grosveld, G., Akashi, K., Lind, E.F., Haight, J.P., Ohashi, P.S., et al. (2009). Nfil3/E4bp4 is required for the development and maturation of NK cells in vivo. *J. Exp. Med.* *206*, 2977–2986.

Kanamori, Y., Ishimaru, K., Nanno, M., Maki, K., Ikuta, K., Nariuchi, H., and Ishikawa, H. (1996). Identification of novel lymphoid tissues in murine intestinal mucosa where clusters of c-kit+ IL-7R+ Thy1+ lympho-hemopoietic progenitors develop. *J. Exp. Med.* *184*, 1449–1459.

Katakai, T., Suto, H., Sugai, M., Gonda, H., Togawa, A., Suematsu, S., Ebisuno, Y., Katagiri, K., Kinashi, T., and Shimizu, A. (2008). Organizer-Like Reticular Stromal Cell Layer Common to Adult Secondary Lymphoid Organs. *J. Immunol.* *181*, 6189–6200.

Katz, J.B., Muller, A.J., and Prendergast, G.C. (2008). Indoleamine 2,3-dioxygenase in T-cell tolerance and tumoral immune escape. *Immunol. Rev.* *222*, 206–221.

Kawamoto, S., Tran, T.H., Maruya, M., Suzuki, K., Doi, Y., Tsutsui, Y., Kato, L.M., and Fagarasan, S. (2012). The inhibitory receptor PD-1 regulates IgA selection and bacterial composition in the gut. *Science* *336*, 485–489.

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(+) T cells regulate immunoglobulin a selection and facilitate diversification of bacterial species responsible for immune homeostasis. *Immunity* *41*, 152–165.

Kayama, H., and Takeda, K. (2016). Functions of innate immune cells and commensal bacteria in gut homeostasis. *J. Biochem. (Tokyo)* *159*, 141–149.

Kaye, J., Seehus, C.R., Kadavallore, A., Torre, B. de la, Yeckes, A., Wang, Y., and Tang, J. (2017). Characterization of an alternatively activated IL-10 producing innate lymphoid type-2 effector cell population. *J. Immunol.* *198*, 208.13-208.13.

Kiessling, R., Klein, E., Pross, H., and Wigzell, H. (1975). „Natural” killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur. J. Immunol.* *5*, 117–121.

Kim, B.S. (2015). Innate Lymphoid Cells in the Skin. *J. Invest. Dermatol.* *135*, 673–678.

Kim, B.S., Siracusa, M.C., Saenz, S.A., Noti, M., Monticelli, L.A., Sonnenberg, G.F., Hepworth, M.R., Van Voorhees, A.S., Comeau, M.R., and Artis, D. (2013). TSLP elicits IL-33-independent innate lymphoid cell responses to promote skin inflammation. *Sci. Transl. Med.* *5*, 170ra16.

Kim, H.Y., Chang, Y.-J., Subramanian, S., Lee, H.-H., Albacker, L.A., Matangkasombut, P., Savage, P.B., McKenzie, A.N.J., Smith, D.E., Rottman, J.B., et al. (2012). Innate lymphoid cells responding to IL-33 mediate airway hyperreactivity independently of adaptive immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* *129*, 216-227.e1-6.

Kim, H.Y., Lee, H.J., Chang, Y.-J., Pichavant, M., Shore, S.A., Fitzgerald, K.A., Iwakura, Y., Israel, E., Bolger, K., Faul, J., et al. (2014). Interleukin-17-producing innate lymphoid cells and the NLRP3 inflammasome facilitate obesity-associated airway hyperreactivity. *Nat. Med.* *20*, 54–61.

Kim, K.S., Hong, S.-W., Han, D., Yi, J., Jung, J., Yang, B.-G., Lee, J.Y., Lee, M., and Surh, C.D. (2016). Dietary antigens limit mucosal immunity by inducing regulatory T cells in the small intestine. *Science* *351*, 858–863.

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.

Kiss, E.A., Vonarbourg, C., Kopfmann, S., Hobeika, E., Finke, D., Esser, C., and Diefenbach, A. (2011). Natural aryl hydrocarbon receptor ligands control organogenesis of intestinal lymphoid follicles. *Science* *334*, 1561–1565.

Kita, H. (2015). ILC2s and fungal allergy. *Allergol. Int. Off. J. Jpn. Soc. Allergol.* *64*, 219–226.

Klein Wolterink, R.G.J., Kleinjan, A., van Nimwegen, M., Bergen, I., de Bruijn, M., Levani, Y., and Hendriks, R.W. (2012). Pulmonary innate lymphoid cells are major producers of IL-5 and IL-13 in murine models of allergic asthma. *Eur. J. Immunol.* *42*, 1106–1116.

Klose, C.S.N., and Artis, D. (2016). Innate lymphoid cells as regulators of immunity, inflammation and tissue homeostasis. *Nat. Immunol.* *17*, 765–774.

Klose, C.S.N., Kiss, E.A., Schwierzeck, V., Ebert, K., Hoyler, T., d'Hargues, Y., Göppert, N., Croxford, A.L., Waisman, A., Tanriver, Y., et al. (2013a). A T-bet gradient controls the fate and function of CCR6-ROR γ t⁺ innate lymphoid cells. *Nature* 494, 261–265.

Klose, C.S.N., Kiss, E.A., Schwierzeck, V., Ebert, K., Hoyler, T., d'Hargues, Y., Göppert, N., Croxford, A.L., Waisman, A., Tanriver, Y., et al. (2013b). A T-bet gradient controls the fate and function of CCR6-ROR γ t⁺ innate lymphoid cells. *Nature* 494, 261–265.

Klose, C.S.N., Flach, M., Möhle, L., Rogell, L., Hoyler, T., Ebert, K., Fabiunke, C., Pfeifer, D., Sexl, V., Fonseca-Pereira, D., et al. (2014). Differentiation of Type 1 ILCs from a Common Progenitor to All Helper-like Innate Lymphoid Cell Lineages. *Cell* 157, 340–356.

Kløverpris, H.N., Kazer, S.W., Mjösberg, J., Mabuka, J.M., Wellmann, A., Ndhlovu, Z., Yadon, M.C., Nhamoyebonde, S., Muenchhoff, M., Simoni, Y., et al. (2016). Innate Lymphoid Cells Are Depleted Irreversibly during Acute HIV-1 Infection in the Absence of Viral Suppression. *Immunity* 44, 391–405.

Knutson, K.L., and Disis, M.L. (2005). Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 54, 721–728.

Koga, S., Hozumi, K., Hirano, K.-I., Yazawa, M., Terooatea, T., Minoda, A., Nagasawa, T., Koyasu, S., and Moro, K. (2018). Peripheral PDGFR α +gp38⁺ mesenchymal cells support the differentiation of fetal liver-derived ILC2. *J. Exp. Med.*

Koning, J.J., and Mebius, R.E. (2012). Interdependence of stromal and immune cells for lymph node function. *Trends Immunol.* 33, 264–270.

Konya, V., and Mjösberg, J. (2015). Innate Lymphoid Cells in Graft-Versus-Host Disease. *Am. J. Transplant.* 15, 2795–2801.

Korn, L.L., Thomas, H.L., Hubbeling, H.G., Spencer, S.P., Sinha, R., Simkins, H.M., Salzman, N.H., Bushman, F.D., and Laufer, T.M. (2014). Conventional CD4⁺ T cells regulate IL-22-producing intestinal innate lymphoid cells. *Mucosal Immunol.* 7, 1045–1057.

Kucia, M., Jankowski, K., Reza, R., Wysoczynski, M., Bandura, L., Allendorf, D.J., Zhang, J., Ratajczak, J., and Ratajczak, M.Z. (2004). CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion. *J. Mol. Histol.* *35*, 233–245.

Kwong, B., Rua, R., Gao, Y., Flickinger, J., Wang, Y., Kruhlak, M.J., Zhu, J., Vivier, E., McGavern, D.B., and Lazarevic, V. (2017). T-bet-dependent NKp46+innate lymphoid cells regulate the onset of TH17-induced neuroinflammation. *Nat. Immunol.* *18*, 1117–1127.

Lambrecht, B.N., and Galli, S.J. (2015). SnapShot: Integrated Type 2 Immune Responses. *Immunity* *43*, 408-408.e1.

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

Lanier, L.L., Phillips, J.H., Hackett, J., Tutt, M., and Kumar, V. (1986). Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *137*, 2735–2739.

Lee, A.Y.S., and Körner, H. (2017). CCR6/CCL20 chemokine axis in human immunodeficiency virus immunity and pathogenesis. *J. Gen. Virol.* *98*, 338–344.

Lee, J.S., Cella, M., McDonald, K.G., Garlanda, C., Kennedy, G.D., Nukaya, M., Mantovani, A., Kopan, R., Bradfield, C.A., Newberry, R.D., et al. (2011). AHR drives the development of gut ILC22 cells and postnatal lymphoid tissues via pathways dependent on and independent of Notch. *Nat. Immunol.* *13*, ni.2187.

Lee, M.-W., Odegaard, J.I., Mukundan, L., Qiu, Y., Molofsky, A.B., Nussbaum, J.C., Yun, K., Locksley, R.M., and Chawla, A. (2015). Activated type 2 innate lymphoid cells regulate beige fat biogenesis. *Cell* *160*, 74–87.

Liew, F.Y., Girard, J.-P., and Turnquist, H.R. (2016). Interleukin-33 in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.*

Lim, A.I., Menegatti, S., Bustamante, J., Le Bourhis, L., Allez, M., Rogge, L., Casanova, J.-L., Yssel, H., and Di Santo, J.P. (2016). IL-12 drives functional plasticity of human group 2 innate lymphoid cells. *J. Exp. Med.* *213*, 569–583.

Lim, A.I., Verrier, T., Vosshenrich, C.A., and Di Santo, J.P. (2017). Developmental options and functional plasticity of innate lymphoid cells. *Curr. Opin. Immunol.* *44*, 61–68.

Lindemans, C.A., Calafiore, M., Mertelsmann, A.M., O'Connor, M.H., Dudakov, J.A., Jenq, R.R., Velardi, E., Young, L.F., Smith, O.M., Lawrence, G., et al. (2015). Interleukin-22 promotes intestinal-stem-cell-mediated epithelial regeneration. *Nature* *528*, 560–564.

Liu, M., and Zhang, C. (2017). The Role of Innate Lymphoid Cells in Immune-Mediated Liver Diseases. *Front. Immunol.* *8*, 695.

Liu, X., Li, M., Wu, Y., Zhou, Y., Zeng, L., and Huang, T. (2009). Anti-IL-33 antibody treatment inhibits airway inflammation in a murine model of allergic asthma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *386*, 181–185.

Lochner, M., Ohnmacht, C., Presley, L., Bruhns, P., Si-Tahar, M., Sawa, S., and Eberl, G. (2011). Microbiota-induced tertiary lymphoid tissues aggravate inflammatory disease in the absence of ROR γ t and LTi cells. *J. Exp. Med.* *208*, 125–134.

Lodoen, M.B., and Lanier, L.L. (2006). Natural killer cells as an initial defense against pathogens. *Curr. Opin. Immunol.* *18*, 391–398.

Long, E.O., Kim, H.S., Liu, D., Peterson, M.E., and Rajagopalan, S. (2013). Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. *Annu. Rev. Immunol.* *31*, 227–258.

Longman, R.S., Diehl, G.E., Victorio, D.A., Huh, J.R., Galan, C., Miraldi, E.R., Swaminath, A., Bonneau, R., Scherl, E.J., and Littman, D.R. (2014). CX3CR1⁺ mononuclear phagocytes support colitis-associated innate lymphoid cell production of IL-22. *J. Exp. Med.* *211*, 1571–1583.

Lorenz, R.G., and Newberry, R.D. (2004). Isolated lymphoid follicles can function as sites for induction of mucosal immune responses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1029*, 44–57.

Lorenz, R.G., Chaplin, D.D., McDonald, K.G., McDonough, J.S., and Newberry, R.D. (2003). Isolated lymphoid follicle formation is inducible and dependent upon lymphotoxin-sufficient

B lymphocytes, lymphotoxin beta receptor, and TNF receptor I function. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 *170*, 5475–5482.

Lügering, A., Ross, M., Sieker, M., Heidemann, J., Williams, I.R., Domschke, W., and Kucharzik, T. (2010). CCR6 identifies lymphoid tissue inducer cells within cryptopatches. *Clin. Exp. Immunol.* *160*, 440–449.

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 RORγ⁺ ILCs creates a unique microenvironment within mucosal draining lymph nodes. *Nat. Commun.* *6*, 5862.

Macpherson, A.J., and Smith, K. (2006). Mesenteric lymph nodes at the center of immune anatomy. *J. Exp. Med.* *203*, 497–500.

Macpherson, A.J., Gatto, D., Sainsbury, E., Harriman, G.R., Hengartner, H., and Zinkernagel, R.M. (2000). A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science* *288*, 2222–2226.

Macpherson, A.J., Hunziker, L., McCoy, K., and Lamarre, A. (2001). IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms. *Microbes Infect.* *3*, 1021–1035.

Male, V., and Brady, H.J.M. (2017). Murine thymic NK cells: A case of identity. *Eur. J. Immunol.* *47*, 797–799.

Mao, K., Baptista, A.P., Tamoutounour, S., Zhuang, L., Bouladoux, N., Martins, A.J., Huang, Y., Gerner, M.Y., Belkaid, Y., and Germain, R.N. (2018). Innate and adaptive lymphocytes sequentially shape the gut microbiota and lipid metabolism. *Nature* *554*, 255–259.

Martin, C.E., Spasova, D.S., Frimpong-Boateng, K., Kim, H.-O., Lee, M., Kim, K.S., and Surh, C.D. (2017). Interleukin-7 Availability Is Maintained by a Hematopoietic Cytokine Sink Comprising Innate Lymphoid Cells and T Cells. *Immunity* *47*, 171-182.e4.

- 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.
- McDonald, K.G., McDonough, J.S., Wang, C., Kucharzik, T., Williams, I.R., and Newberry, R.D. (2007). CC chemokine receptor 6 expression by B lymphocytes is essential for the development of isolated lymphoid follicles. *Am. J. Pathol.* 170, 1229–1240.
- McDonald, K.G., McDonough, J.S., Dieckgraefe, B.K., and Newberry, R.D. (2010). Dendritic cells produce CXCL13 and participate in the development of murine small intestine lymphoid tissues. *Am. J. Pathol.* 176, 2367–2377.
- McGee, H.M., Schmidt, B.A., Booth, C.J., Yancopoulos, G.D., Valenzuela, D.M., Murphy, A.J., Stevens, S., Flavell, R.A., and Horsley, V. (2013). IL-22 promotes fibroblast-mediated wound repair in the skin. *J. Invest. Dermatol.* 133, 1321–1329.
- McGrath, K.E., Koniski, A.D., Maltby, K.M., McGann, J.K., and Palis, J. (1999). Embryonic expression and function of the chemokine SDF-1 and its receptor, CXCR4. *Dev. Biol.* 213, 442–456.
- McKenzie, A.N.J. (2014). Type-2 Innate Lymphoid Cells in Asthma and Allergy. *Ann. Am. Thorac. Soc.* 11, S263–S270.
- McKenzie, A.N.J., Spits, H., and Eberl, G. (2014). Innate Lymphoid Cells in Inflammation and Immunity. *Immunity* 41, 366–374.
- Mear, J.B., Gosset, P., Kipnis, E., Faure, E., Dessein, R., Jawhara, S., Fradin, C., Faure, K., Poulain, D., Sendid, B., et al. (2014). *Candida albicans* Airway Exposure Primes the Lung Innate Immune Response against *Pseudomonas aeruginosa* Infection through Innate Lymphoid Cell Recruitment and Interleukin-22-Associated Mucosal Response. *Infect. Immun.* 82, 306–315.
- Mebius, R.E. (2003). Organogenesis of lymphoid tissues. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 292–303.

Mebius, R.E., Rennert, P., and Weissman, I.L. (1997). Developing Lymph Nodes Collect CD4+CD3- LTβ+ Cells That Can Differentiate to APC, NK Cells, and Follicular Cells but Not T or B Cells. *Immunity* 7, 493–504.

Mebius, R.E., Miyamoto, T., Christensen, J., Domen, J., Cupedo, T., Weissman, I.L., and Akashi, K. (2001). The fetal liver counterpart of adult common lymphoid progenitors gives rise to all lymphoid lineages, CD45+CD4+CD3- cells, as well as macrophages. *J. Immunol.* Baltim. Md 1950 166, 6593–6601.

Melo-Gonzalez, F., and Hepworth, M.R. (2017). Functional and phenotypic heterogeneity of group 3 innate lymphoid cells. *Immunology* 150, 265–275.

Mielke, L.A., Groom, J.R., Rankin, L.C., Seillet, C., Masson, F., Putoczki, T., and Belz, G.T. (2013). TCF-1 Controls ILC2 and NKp46+RORγt+ Innate Lymphocyte Differentiation and Protection in Intestinal Inflammation. *J. Immunol.* 191, 4383–4391.

Min, B., Foucras, G., Meier-Schellersheim, M., and Paul, W.E. (2004). Spontaneous proliferation, a response of naïve CD4 T cells determined by the diversity of the memory cell repertoire. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 3874–3879.

Mjösberg, J., Bernink, J., Golebski, K., Karrich, J.J., Peters, C.P., Blom, B., te Velde, A.A., Fokkens, W.J., van Drunen, C.M., and Spits, H. (2012). The transcription factor GATA3 is essential for the function of human type 2 innate lymphoid cells. *Immunity* 37, 649–659.

Mjösberg, J.M., Trifari, S., Crellin, N.K., Peters, C.P., van Drunen, C.M., Piet, B., Fokkens, W.J., Cupedo, T., and Spits, H. (2011). Human IL-25- and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CCR4 and CD161. *Nat. Immunol.* 12, 1055–1062.

Molofsky, A.B., Van Gool, F., Liang, H.-E., Van Dyken, S.J., Nussbaum, J.C., Lee, J., Bluestone, J.A., and Locksley, R.M. (2015). Interleukin-33 and Interferon-γ Counter-Regulate Group 2 Innate Lymphoid Cell Activation during Immune Perturbation. *Immunity* 43, 161–174.

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.

Montaldo, E., Juelke, K., and Romagnani, C. (2015). Group 3 innate lymphoid cells (ILC3s): Origin, differentiation, and plasticity in humans and mice. *Eur. J. Immunol.* *45*, 2171–2182.

Monticelli, L.A., Sonnenberg, G.F., Abt, M.C., Alenghat, T., Ziegler, C.G.K., Doering, T.A., Angelosanto, J.M., Laidlaw, B.J., Yang, C.Y., Sathaliyawala, T., et al. (2011). Innate lymphoid cells promote lung-tissue homeostasis after infection with influenza virus. *Nat. Immunol.* *12*, 1045–1054.

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.

Monticelli, L.A., Buck, M.D., Flamar, A.-L., Saenz, S.A., Tait Wojno, E.D., Yudanin, N.A., Osborne, L.C., Hepworth, M.R., Tran, S.V., Rodewald, H.-R., et al. (2016). Arginase 1 is an innate lymphoid-cell-intrinsic metabolic checkpoint controlling type 2 inflammation. *Nat. Immunol.* *17*, 656–665.

Moo-Young, T.A., Larson, J.W., Belt, B.A., Tan, M.C., Hawkins, W.G., Eberlein, T.J., Goedegebuure, P.S., and Linehan, D.C. (2009). Tumor derived TGF-Beta mediates conversion of CD4+Foxp3+ regulatory T cells in a murine model of pancreas cancer. *J. Immunother. Hagerstown Md* *1997* *32*.

Mora, J.R., and von Andrian, U.H. (2009). Role of Retinoic Acid in the Imprinting of Gut-Homing IgA-Secreting Cells. *Semin. Immunol.* *21*, 28–35.

Mora, J.R., Bono, M.R., Manjunath, N., Weninger, W., Cavanagh, L.L., Roseblatt, M., and Von Andrian, U.H. (2003). Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells. *Nature* *424*, 88–93.

Mora, J.R., Iwata, M., Eksteen, B., Song, S.-Y., Junt, T., Senman, B., Otipoby, K.L., Yokota, A., Takeuchi, H., Ricciardi-Castagnoli, P., et al. (2006). Generation of gut-homing IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells. *Science* *314*, 1157–1160.

Moro, K., Yamada, T., Tanabe, M., Takeuchi, T., Ikawa, T., Kawamoto, H., Furusawa, J.-I., Ohtani, M., Fujii, H., and Koyasu, S. (2010). Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)/Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature* *463*, 540–544.

Mortha, A., Chudnovskiy, A., Hashimoto, D., Bogunovic, M., Spencer, S.P., Belkaid, Y., and Merad, M. (2014). Microbiota-dependent crosstalk between macrophages and ILC3 promotes intestinal homeostasis. *Science* *343*, 1249288.

Moyron-Quiroz, J.E., Rangel-Moreno, J., Kusser, K., Hartson, L., Sprague, F., Goodrich, S., Woodland, D.L., Lund, F.E., and Randall, T.D. (2004). Role of inducible bronchus associated lymphoid tissue (iBALT) in respiratory immunity. *Nat. Med.* *10*, 927–934.

Muniz, V.S., Weller, P.F., and Neves, J.S. (2012). Eosinophil crystalloid granules: structure, function, and beyond. *J. Leukoc. Biol.* *92*, 281–288.

Munneke, J.M., Björklund, A.T., Mjösberg, J.M., Garming-Legert, K., Bernink, J.H., Blom, B., Huisman, C., Oers, M.H.J. van, Spits, H., Malmberg, K.-J., et al. (2014). Activated innate lymphoid cells are associated with a reduced susceptibility to graft-versus-host disease. *Blood* *124*, 812–821.

Murugaiyan, G., and Saha, B. (2009). Protumor vs Antitumor Functions of IL-17. *J. Immunol.* *183*, 4169–4175.

Nagarkar, D.R., Poposki, J.A., Tan, B.K., Comeau, M.R., Peters, A.T., Hulse, K.E., Suh, L.A., Norton, J., Harris, K.E., Grammer, L.C., et al. (2013). Thymic stromal lymphopoietin activity is increased in nasal polyps of patients with chronic rhinosinusitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* *132*, 593-600.e12.

Nakashima, A., Ito, M., Yoneda, S., Shiozaki, A., Hidaka, T., and Saito, S. (2010). Circulating and decidual Th17 cell levels in healthy pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N* *1989* *63*, 104–109.

Narni-Mancinelli, E., Gauthier, L., Baratin, M., Guia, S., Fenis, A., Deghmane, A.-E., Rossi, B., Fourquet, P., Escalière, B., Kerdiles, Y.M., et al. (2017). Complement factor P is a ligand for the natural killer cell-activating receptor NKp46. *Sci. Immunol.* *2*.

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.

Numasaki, M., Fukushi, J., Ono, M., Narula, S.K., Zavodny, P.J., Kudo, T., Robbins, P.D., Tahara, H., and Lotze, M.T. (2003). Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood* *101*, 2620–2627.

Nussbaum, J.C., Van Dyken, S.J., von Moltke, J., Cheng, L.E., Mohapatra, A., Molofsky, A.B., Thornton, E.E., Krummel, M.F., Chawla, A., Liang, H.-E., et al. (2013). Type 2 innate lymphoid cells control eosinophil homeostasis. *Nature* *502*, 245–248.

Ohl, L., Henning, G., Krautwald, S., Lipp, M., Hardtke, S., Bernhardt, G., Pabst, O., and Förster, R. (2003). Cooperating mechanisms of CXCR5 and CCR7 in development and organization of secondary lymphoid organs. *J. Exp. Med.* *197*, 1199–1204.

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.*

Okada, S., Markle, J.G., Deenick, E.K., Mele, F., Averbuch, D., Lagos, M., Alzahrani, M., Al-Muhsen, S., Halwani, R., Ma, C.S., et al. (2015). Impairment of immunity to *Candida* and *Mycobacterium* in humans with bi-allelic RORC mutations. *Science* *349*, 606–613.

Okada, T., Ngo, V.N., Ekland, E.H., Förster, R., Lipp, M., Littman, D.R., and Cyster, J.G. (2002). Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches. *J. Exp. Med.* *196*, 65–75.

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.

Olivier, B.J., Cailotto, C., van der Vliet, J., Knippenberg, M., Greuter, M.J., Hilbers, F.W., Konijn, T., Te Velde, A.A., Nolte, M.A., Boeckxstaens, G.E., et al. (2016). Vagal innervation is required for the formation of tertiary lymphoid tissue in colitis. *Eur. J. Immunol.* *46*, 2467–2480.

- Pabst, O., Ohl, L., Wendland, M., Wurbel, M.-A., Kremmer, E., Malissen, B., and Förster, R. (2004). Chemokine receptor CCR9 contributes to the localization of plasma cells to the small intestine. *J. Exp. Med.* *199*, 411–416.
- Pabst, O., Herbrand, H., Friedrichsen, M., Velaga, S., Dorsch, M., Berhardt, G., Worbs, T., Macpherson, A.J., and Förster, R. (2006). Adaptation of solitary intestinal lymphoid tissue in response to microbiota and chemokine receptor CCR7 signaling. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *177*, 6824–6832.
- Pantelyushin, S., Haak, S., Ingold, B., Kulig, P., Heppner, F.L., Navarini, A.A., and Becher, B. (2012). Ror γ t⁺ innate lymphocytes and $\gamma\delta$ T cells initiate psoriasiform plaque formation in mice. *J. Clin. Invest.* *122*, 2252–2256.
- Park, H., Li, Z., Yang, X.O., Chang, S.H., Nurieva, R., Wang, Y.-H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., et al. (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat. Immunol.* *6*, 1133–1141.
- Patel, A., Harker, N., Moreira-Santos, L., Ferreira, M., Alden, K., Timmis, J., Foster, K., Garefalaki, A., Pachnis, P., Andrews, P., et al. (2012). Differential RET Signaling Pathways Drive Development of the Enteric Lymphoid and Nervous Systems. *Sci Signal* *5*, ra55–ra55.
- Pavert, S.A. van de, and Mebius, R.E. (2010). New insights into the development of lymphoid tissues. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, nri2832.
- van de Pavert, S.A., and Mebius, R.E. (2010). New insights into the development of lymphoid tissues. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 664–674.
- van de Pavert, S.A., and Vivier, E. (2015). Differentiation and function of group 3 innate lymphoid cells, from embryo to adult. *Int. Immunol.* dxv052.
- van de Pavert, S.A., and Vivier, E. (2016). Differentiation and function of group 3 innate lymphoid cells, from embryo to adult. *Int. Immunol.* *28*, 35–42.
- van de Pavert, S.A., Olivier, B.J., Goverse, G., Vondenhoff, M.F., Greuter, M., Beke, P., Kusser, K., Höpken, U.E., Lipp, M., Niederreither, K., et al. (2009). Chemokine CXCL13 is essential for

lymph node initiation and is induced by retinoic acid and neuronal stimulation. *Nat. Immunol.* *10*, 1193–1199.

van de Pavert, S.A., Ferreira, M., Domingues, R.G., Ribeiro, H., Molenaar, R., Moreira-Santos, L., Almeida, F.F., Ibiza, S., Barbosa, I., Goverse, G., et al. (2014a). Maternal retinoids control type 3 innate lymphoid cells and set the offspring immunity. *Nature* *508*, 123–127.

van de Pavert, S.A., Ferreira, M., Domingues, R.G., Ribeiro, H., Molenaar, R., Moreira-Santos, L., Almeida, F.F., Ibiza, S., Barbosa, I., Goverse, G., et al. (2014b). Maternal retinoids control type 3 innate lymphoid cells and set the offspring immunity. *Nature* *508*, 123–127.

Pearson, C., Thornton, E.E., McKenzie, B., Schaupp, A.-L., Huskens, N., Griseri, T., West, N., Tung, S., Seddon, B.P., Uhlig, H.H., et al. (2016). ILC3 GM-CSF production and mobilisation orchestrate acute intestinal inflammation. *ELife* *5*, e10066.

Pelly, V.S., Kannan, Y., Coomes, S.M., Entwistle, L.J., Rückerl, D., Seddon, B., MacDonald, A.S., McKenzie, A., and Wilson, M.S. (2016). IL-4-producing ILC2s are required for the differentiation of TH2 cells following *Heligmosomoides polygyrus* infection. *Mucosal Immunol.* *9*, 1407–1417.

Pfützner, B.M., Branstetter, D., Loibl, S., Denkert, C., Lederer, B., Schmitt, W.D., Dombrowski, F., Werner, M., Rüdiger, T., Dougall, W.C., et al. (2014). RANK expression as a prognostic and predictive marker in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* *145*, 307–315.

Pichery, M., Mirey, E., Mercier, P., Lefrançais, 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. Baltim. Md 1950* *188*, 3488–3495.

Pollard, M., and Sharon, N. (1970). Responses of the Peyer's Patches in Germ-Free Mice to Antigenic Stimulation. *Infect. Immun.* *2*, 96–100.

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 ROR γ t(+) innate lymphoid cells. *Nat. Immunol.* *12*, 949–958.

Powell, N., Walker, A.W., Stolarczyk, E., Canavan, J.B., Gökmen, M.R., Marks, E., Jackson, I., Hashim, A., Curtis, M.A., Jenner, R.G., et al. (2012). The transcription factor T-bet regulates intestinal inflammation mediated by interleukin-7 receptor⁺ innate lymphoid cells. *Immunity* 37, 674–684.

Powell, N., Lo, J.W., Biancheri, P., Vossenkämper, A., Pantazi, E., Walker, A.W., Stolarczyk, E., Ammoscato, F., Goldberg, R., Scott, P., et al. (2015). Interleukin 6 Increases Production of Cytokines by Colonic Innate Lymphoid Cells in Mice and Patients With Chronic Intestinal Inflammation. *Gastroenterology* 149, 456–467.e15.

Préfontaine, D., Lajoie-Kadoch, S., Foley, S., Audusseau, S., Olivenstein, R., Halayko, A.J., Lemièrre, C., Martin, J.G., and Hamid, Q. (2009). Increased expression of IL-33 in severe asthma: evidence of expression by airway smooth muscle cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 183, 5094–5103.

Qiu, J., Heller, J.J., Guo, X., Chen, Z.E., Fish, K., Fu, Y.-X., and Zhou, L. (2012). The Aryl Hydrocarbon Receptor Regulates Gut Immunity through Modulation of Innate Lymphoid Cells. *Immunity* 36, 92–104.

Qiu, Y., Nguyen, K.D., Odegaard, J.I., Cui, X., Tian, X., Locksley, R.M., Palmiter, R.D., and Chawla, A. (2014). Eosinophils and Type 2 Cytokine Signaling in Macrophages Orchestrate Development of Functional Beige Fat. *Cell* 157, 1292–1308.

Randall, T.D., and Mebius, R.E. (2014). The development and function of mucosal lymphoid tissues: a balancing act with micro-organisms. *Mucosal Immunol.* 7, 455–466.

Rankin, L.C., Groom, J.R., Chopin, M., Herold, M.J., Walker, J.A., Mielke, L.A., McKenzie, A.N.J., Carotta, S., Nutt, S.L., and Belz, G.T. (2013). The transcription factor T-bet is essential for the development of NKp46⁺ innate lymphocytes via the Notch pathway. *Nat. Immunol.* 14, 389–395.

Rankin, L.C., Girard-Madoux, M.J.H., Seillet, C., Mielke, L.A., Kerdiles, Y., Fenis, A., Wieduwild, E., Putoczki, T., Mondot, S., Lantz, O., et al. (2015). Complementarity and redundancy of IL-22-producing innate lymphoid cells. *Nat. Immunol.* *advance online publication.*

- Reboldi, A., and Cyster, J.G. (2016). Peyer's patches: Organizing B cell responses at the intestinal frontier. *Immunol. Rev.* 271, 230–245.
- Reeves, R.K., Rajakumar, P.A., Evans, T.I., Connole, M., Gillis, J., Wong, F.E., Kuzmichev, Y.V., Carville, A., and Johnson, R.P. (2011). Gut inflammation and indoleamine deoxygenase inhibit IL-17 production and promote cytotoxic potential in NKp44+ mucosal NK cells during SIV infection. *Blood* 118, 3321–3330.
- Renema, N., Navet, B., Heymann, M.-F., Lezot, F., and Heymann, D. (2016). RANK–RANKL signalling in cancer. *Biosci. Rep.* 36.
- Rennert, P.D., James, D., Mackay, F., Browning, J.L., and Hochman, P.S. (1998). Lymph Node Genesis Is Induced by Signaling through the Lymphotoxin β Receptor. *Immunity* 9, 71–79.
- Reynders, A., Yessaad, N., Manh, T.-P.V., Dalod, M., Fenis, A., Aubry, C., Nikitas, G., Escalière, B., Renaud, J.C., Dussurget, O., et al. (2011). Identity, regulation and in vivo function of gut NKp46+ROR γ t+ and NKp46+ROR γ t– lymphoid cells. *EMBO J.* 30, 2934–2947.
- Ribeiro, V.S.G., Hasan, M., Wilson, A., Boucontet, L., Pereira, P., Lesjean-Pottier, S., Satoh-Takayama, N., Di Santo, J.P., and Vosshenrich, C.A.J. (2010). Cutting edge: Thymic NK cells develop independently from T cell precursors. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 185, 4993–4997.
- Rigas, D., Lewis, G., Aron, J.L., Wang, B., Banie, H., Sankaranarayanan, I., Galle-Treger, L., Maazi, H., Lo, R., Freeman, G.J., et al. (2017). Type 2 innate lymphoid cell suppression by regulatory T cells attenuates airway hyperreactivity and requires inducible T-cell costimulator–inducible T-cell costimulator ligand interaction. *J. Allergy Clin. Immunol.* 139, 1468-1477.e2.
- Robinette, M.L., Bando, J.K., Song, W., Ulland, T.K., Gilfillan, S., and Colonna, M. (2017). IL-15 sustains IL-7R-independent ILC2 and ILC3 development. *Nat. Commun.* 8, 14601.
- Rocha, B., Dautigny, N., and Pereira, P. (1989). Peripheral T lymphocytes: expansion potential and homeostatic regulation of pool sizes and CD4/CD8 ratios in vivo. *Eur. J. Immunol.* 19, 905–911.

Roediger, B., Kyle, R., Le Gros, G., and Weninger, W. (2014). Dermal group 2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis and allergy. *Curr. Opin. Immunol.* *31*, 108–114.

Rossi, S.W., Kim, M.-Y., Leibbrandt, A., Parnell, S.M., Jenkinson, W.E., Glanville, S.H., McConnell, F.M., Scott, H.S., Penninger, J.M., Jenkinson, E.J., et al. (2007). RANK signals from CD4(+)3(-) inducer cells regulate development of Aire-expressing epithelial cells in the thymic medulla. *J. Exp. Med.* *204*, 1267–1272.

Saely, C.H., Geiger, K., and Drexel, H. (2012). Brown versus white adipose tissue: a mini-review. *Gerontology* *58*, 15–23.

Sakata, T., Iwagami, S., Tsuruta, Y., Teraoka, H., Tatsumi, Y., Kita, Y., Nishikawa, S.-I., Takai, Y., and Fujiwara, H. (1990). Constitutive Expression of Interleukin-7 mRNA and Production of IL-7 by a Cloned Murine Thymic Stromal Cell Line. *J. Leukoc. Biol.* *48*, 205–212.

Salimi, M., Barlow, J.L., Saunders, S.P., Xue, L., Gutowska-Owsiak, D., Wang, X., Huang, L.-C., Johnson, D., Scanlon, S.T., McKenzie, A.N.J., et al. (2013). A role for IL-25 and IL-33-driven type-2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis. *J. Exp. Med.* *210*, 2939–2950.

Sandborn, W.J., Gasink, C., Gao, L.-L., Blank, M.A., Johanns, J., Guzzo, C., Sands, B.E., Hanauer, S.B., Targan, S., Rutgeerts, P., et al. (2012). Ustekinumab induction and maintenance therapy in refractory Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* *367*, 1519–1528.

Sano, T., Huang, W., Hall, J.A., Yang, Y., Chen, A., Gavzy, S.J., Lee, J.-Y., Ziel, J.W., Miraldi, E.R., Domingos, A.I., et al. (2016). An IL-23R/IL-22 Circuit Regulates Epithelial Serum Amyloid A to Promote Local Effector Th17 Responses. *Cell* *164*, 324.

Sanos, S.L., Bui, V.L., Mortha, A., Oberle, K., Heners, C., Johner, C., and Diefenbach, A. (2009). ROR γ and commensal microflora are required for the differentiation of mucosal interleukin 22-producing NKp46+ cells. *Nat. Immunol.* *10*, 83–91.

Sanos, S.L., Vonarbourg, C., Mortha, A., and Diefenbach, A. (2011). Control of epithelial cell function by interleukin-22-producing ROR γ t+ innate lymphoid cells. *Immunology* *132*, 453–465.

Sasaki, Y., Darmochwal-Kolarz, D., Suzuki, D., Sakai, M., Ito, M., Shima, T., Shiozaki, A., Rolinski, J., and Saito, S. (2007). Proportion of peripheral blood and decidual CD4(+) CD25(bright) regulatory T cells in pre-eclampsia. *Clin. Exp. Immunol.* *149*, 139–145.

Sato, A., Hashiguchi, M., Toda, E., Iwasaki, A., Hachimura, S., and Kaminogawa, S. (2003). CD11b+ Peyer's patch dendritic cells secrete IL-6 and induce IgA secretion from naive B cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *171*, 3684–3690.

Satoh-Takayama, N., Vosshenrich, C.A.J., Lesjean-Pottier, S., Sawa, S., Lochner, M., Rattis, F., Mention, J.-J., Thiam, K., Cerf-Bensussan, N., Mandelboim, O., et al. (2008a). Microbial flora drives interleukin 22 production in intestinal NKp46+ cells that provide innate mucosal immune defense. *Immunity* *29*, 958–970.

Satoh-Takayama, N., Vosshenrich, C.A.J., Lesjean-Pottier, S., Sawa, S., Lochner, M., Rattis, F., Mention, J.-J., Thiam, K., Cerf-Bensussan, N., Mandelboim, O., et al. (2008b). Microbial Flora Drives Interleukin 22 Production in Intestinal NKp46+ Cells that Provide Innate Mucosal Immune Defense. *Immunity* *29*, 958–970.

Savage, A.K., Constantinides, M.G., Han, J., Picard, D., Martin, E., Li, B., Lantz, O., and Bendelac, A. (2008). The transcription factor PLZF directs the effector program of the NKT cell lineage. *Immunity* *29*, 391–403.

Sawa, S., Cherrier, M., Lochner, M., Satoh-Takayama, N., Fehling, H.J., Langa, F., Di Santo, J.P., and Eberl, G. (2010). Lineage relationship analysis of ROR γ mat+ innate lymphoid cells. *Science* *330*, 665–669.

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

Seillet, C., Rankin, L.C., Groom, J.R., Mielke, L.A., Tellier, J., Chopin, M., Huntington, N.D., Belz, G.T., and Carotta, S. (2014). Nfil3 is required for the development of all innate lymphoid cell subsets. *J. Exp. Med.* *211*, 1733–1740.

- Seita, J., and Weissman, I.L. (2010). Hematopoietic Stem Cell: Self-renewal versus Differentiation. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 2, 640–653.
- Seliger, B., Ruiz-Cabello, F., and Garrido, F. (2008). IFN inducibility of major histocompatibility antigens in tumors. *Adv. Cancer Res.* 101, 249–276.
- Serafini, N., Vosshenrich, C.A.J., and Di Santo, J.P. (2015). Transcriptional regulation of innate lymphoid cell fate. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 415–428.
- Shalpour, S., Deiser, K., Sercan, O., Tuckermann, J., Minnich, K., Willimsky, G., Blankenstein, T., Hämmerling, G.J., Arnold, B., and Schüler, T. (2010). Commensal microflora and interferon-gamma promote steady-state interleukin-7 production in vivo. *Eur. J. Immunol.* 40, 2391–2400.
- Shields, J.D., Kourtis, I.C., Tomei, A.A., Roberts, J.M., and Swartz, M.A. (2010). Induction of lymphoidlike stroma and immune escape by tumors that express the chemokine CCL21. *Science* 328, 749–752.
- Shikotra, A., Choy, D.F., Ohri, C.M., Doran, E., Butler, C., Hargadon, B., Shelley, M., Abbas, A.R., Austin, C.D., Jackman, J., et al. (2012). Increased expression of immunoreactive thymic stromal lymphopoietin in patients with severe asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 129, 104-111.e1-9.
- Siegle, J.S., Hansbro, N., Dong, C., Angkasekwinai, P., Foster, P.S., and Kumar, R.K. (2011). Blocking induction of T helper type 2 responses prevents development of disease in a model of childhood asthma. *Clin. Exp. Immunol.* 165, 19–28.
- Silver, J.S., Kearley, J., Copenhaver, A.M., Sanden, C., Mori, M., Yu, L., Pritchard, G.H., Berlin, A.A., Hunter, C.A., Bowler, R., et al. (2016). Erratum: Inflammatory triggers associated with exacerbations of COPD orchestrate plasticity of group 2 innate lymphoid cells in the lungs. *Nat. Immunol.* 17, 1005.
- Simoni, Y., Fehlings, M., Kløverpris, H.N., McGovern, N., Koo, S.-L., Loh, C.Y., Lim, S., Kurioka, A., Fergusson, J.R., Tang, C.-L., et al. (2017). Human Innate Lymphoid Cell Subsets Possess Tissue-Type Based Heterogeneity in Phenotype and Frequency. *Immunity* 46, 148–161.

Simson, L., Ellyard, J.I., Dent, L.A., Matthaei, K.I., Rothenberg, M.E., Foster, P.S., Smyth, M.J., and Parish, C.R. (2007). Regulation of Carcinogenesis by IL-5 and CCL11: A Potential Role for Eosinophils in Tumor Immune Surveillance. *J. Immunol.* *178*, 4222–4229.

Song, C., Lee, J.S., Gilfillan, S., Robinette, M.L., Newberry, R.D., Stappenbeck, T.S., Mack, M., Cella, M., and Colonna, M. (2015). Unique and redundant functions of NKp46+ ILC3s in models of intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* *212*, 1869–1882.

Sonnenberg, G.F., and Artis, D. (2012). Innate lymphoid cell interactions with the microbiota: implications for intestinal health and disease. *Immunity* *37*, 601–610.

Sonnenberg, G.F., and Artis, D. (2015). Innate lymphoid cells in the initiation, regulation and resolution of inflammation. *Nat. Med.* *21*, 698–708.

Sonnenberg, G.F., Monticelli, L.A., Alenghat, T., Fung, T.C., Hutnick, N.A., Kunisawa, J., Shibata, N., Grunberg, S., Sinha, R., Zahm, A.M., et al. (2012). Innate lymphoid cells promote anatomical containment of lymphoid-resident commensal bacteria. *Science* *336*, 1321–1325.

Sonnenberg, G.F., Mjösberg, J., Spits, H., and Artis, D. (2013). SnapShot: innate lymphoid cells. *Immunity* *39*, 622-622.e1.

Spahn, T.W., Herbst, H., Rennert, P.D., Lügering, N., Maaser, C., Kraft, M., Fontana, A., Weiner, H.L., Domschke, W., and Kucharzik, T. (2002). Induction of colitis in mice deficient of Peyer's patches and mesenteric lymph nodes is associated with increased disease severity and formation of colonic lymphoid patches. *Am. J. Pathol.* *161*, 2273–2282.

Spits, H., and Cupedo, T. (2012). Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage relationships, and function. *Annu. Rev. Immunol.* *30*, 647–675.

Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N.J., Mebius, R.E., et al. (2013). Innate lymphoid cells — a proposal for uniform nomenclature. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 145–149.

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.

- 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. (2017). IL-33 promotes the egress of group 2 innate lymphoid cells from the bone marrow. *J. Exp. Med.* jem.20170449.
- 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.
- Sugiyama, M., Nakato, G., Jinnohara, T., Akiba, H., Okumura, K., Ohno, H., and Yoshida, H. (2012). Expression pattern changes and function of RANKL during mouse lymph node microarchitecture development. *Int. Immunol.* 24, 369–378.
- Sun, Z., Unutmaz, D., Zou, Y.R., Sunshine, M.J., Pierani, A., Brenner-Morton, S., Mebius, R.E., and Littman, D.R. (2000). Requirement for RORgamma in thymocyte survival and lymphoid organ development. *Science* 288, 2369–2373.
- Sutton, C.E., Mielke, L.A., and Mills, K.H.G. (2012). IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells and innate lymphoid cells. *Eur. J. Immunol.* 42, 2221–2231.
- Takatori, H., Kanno, Y., Watford, W.T., Tato, C.M., Weiss, G., Ivanov, I.I., Littman, D.R., and O’Shea, J.J. (2009). Lymphoid tissue inducer-like cells are an innate source of IL-17 and IL-22. *J. Exp. Med.* 206, 35–41.
- Takeda, K., Cretney, E., Hayakawa, Y., Ota, T., Akiba, H., Ogasawara, K., Yagita, H., Kinoshita, K., Okumura, K., and Smyth, M.J. (2005). TRAIL identifies immature natural killer cells in newborn mice and adult mouse liver. *Blood* 105, 2082–2089.
- Tan, J.T., Dudl, E., LeRoy, E., Murray, R., Sprent, J., Weinberg, K.I., and Surh, C.D. (2001). IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naïve T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 8732–8737.
- Tang, C., Yamada, H., Shibata, K., Muta, H., Wajjwalku, W., Podack, E.R., and Yoshikai, Y. (2008). A novel role of CD30L/CD30 signaling by T-T cell interaction in Th1 response against mycobacterial infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 181, 6316–6327.

- Taniguchi, K., Petersson, M., Höglund, P., Kiessling, R., Klein, G., and Kärre, K. (1987). Interferon gamma induces lung colonization by intravenously inoculated B16 melanoma cells in parallel with enhanced expression of class I major histocompatibility complex antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *84*, 3405–3409.
- Taylor, R.T., Lügering, A., Newell, K.A., and Williams, I.R. (2004). Intestinal cryptopatch formation in mice requires lymphotoxin alpha and the lymphotoxin beta receptor. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *173*, 7183–7189.
- Teshima, T., Reddy, P., and Zeiser, R. (2016). Acute Graft-versus-Host Disease: Novel Biological Insights. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *22*, 11–16.
- Teunissen, M.B.M., Munneke, J.M., Bernink, J.H., Spuls, P.I., Res, P.C.M., Te Velde, A., Cheuk, S., Brouwer, M.W.D., Menting, S.P., Eidsmo, L., et al. (2014). Composition of innate lymphoid cell subsets in the human skin: enrichment of NCR(+) ILC3 in lesional skin and blood of psoriasis patients. *J. Invest. Dermatol.* *134*, 2351–2360.
- 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.
- Tsuji, M., Suzuki, K., Kitamura, H., Maruya, M., Kinoshita, K., Ivanov, I.I., Itoh, K., Littman, D.R., and Fagarasan, S. (2008). Requirement for lymphoid tissue-inducer cells in isolated follicle formation and T cell-independent immunoglobulin A generation in the gut. *Immunity* *29*, 261–271.
- Turner, J.-E., Morrison, P.J., Wilhelm, C., Wilson, M., Ahlfors, H., Renauld, J.-C., Panzer, U., Helmbj, H., and Stockinger, B. (2013). IL-9-mediated survival of type 2 innate lymphoid cells promotes damage control in helminth-induced lung inflammation. *J. Exp. Med.* *210*, 2951–2965.
- Uehara, S., Grinberg, A., Farber, J.M., and Love, P.E. (2002). A role for CCR9 in T lymphocyte development and migration. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *168*, 2811–2819.
- Van Maele, L., Carnoy, C., Cayet, D., Ivanov, S., Porte, R., Deruy, E., Chabalgoity, J.A., Renauld, J.-C., Eberl, G., Benecke, A.G., et al. (2014). Activation of Type 3 innate lymphoid

cells and interleukin 22 secretion in the lungs during *Streptococcus pneumoniae* infection. *J. Infect. Dis.* *210*, 493–503.

Veiga-Fernandes, H., Coles, M.C., Foster, K.E., Patel, A., Williams, A., Natarajan, D., Barlow, A., Pachnis, V., and Kioussis, D. (2007). Tyrosine kinase receptor RET is a key regulator of Peyer's patch organogenesis. *Nature* *446*, 547–551.

Vély, F., Barlogis, V., Vallentin, B., Neven, B., Piperoglou, C., Perchet, T., Petit, M., Yessaad, N., Touzot, F., Bruneau, J., et al. (2016). Evidence of innate lymphoid cell redundancy in humans. *Nat. Immunol.* *17*, 1291–1299.

Verrier, T., Satoh-Takayama, N., Serafini, N., Marie, S., Di Santo, J.P., and Vosshenrich, C.A.J. (2016). Phenotypic and Functional Plasticity of Murine Intestinal NKp46⁺ Group 3 Innate Lymphoid Cells. *J. Immunol.* *196*, 4731–4738.

Viant, C., Rankin, L.C., Girard-Madoux, M.J.H., Seillet, C., Shi, W., Smyth, M.J., Bartholin, L., Walzer, T., Huntington, N.D., Vivier, E., et al. (2016). Transforming growth factor- β and Notch ligands act as opposing environmental cues in regulating the plasticity of type 3 innate lymphoid cells. *Sci. Signal.* *9*, ra46.

Villanova, F., Flutter, B., Tosi, I., Gryś, K., Sreeneebus, H., Perera, G.K., Chapman, A., Smith, C.H., Di Meglio, P., and Nestle, F.O. (2014). Characterization of innate lymphoid cells in human skin and blood demonstrates increase of NKp44⁺ ILC3 in psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* *134*, 984–991.

Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., and Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.* *9*, 503–510.

Vonarbourg, C., Mortha, A., Bui, V.L., Hernandez, P.P., Kiss, E.A., Hoyler, T., Flach, M., Bengsch, B., Thimme, R., Hölscher, C., et al. (2010). Regulated expression of nuclear receptor ROR γ t confers distinct functional fates to NK cell receptor-expressing ROR γ t(+) innate lymphocytes. *Immunity* *33*, 736–751.

Vondenhoff, M.F., Greuter, M., Goverse, G., Elewaut, D., Dewint, P., Ware, C.F., Hoorweg, K., Kraal, G., and Mebius, R.E. (2009). LT β R signaling induces cytokine expression and up-

regulates lymphangiogenic factors in lymph node anlagen. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 *182*, 5439–5445.

Vosshenrich, C.A.J., García-Ojeda, M.E., Samson-Villéger, S.I., Pasqualetto, V., Enault, L., Richard-Le Goff, O., Corcuff, E., Guy-Grand, D., Rocha, B., Cumano, A., et al. (2006). A thymic pathway of mouse natural killer cell development characterized by expression of GATA-3 and CD127. *Nat. Immunol.* *7*, 1217–1224.

Walker, J.A., and McKenzie, A.N. (2013). Development and function of group 2 innate lymphoid cells. *Curr. Opin. Immunol.* *25*, 148–155.

WANG, X., and LIN, Y. (2008). Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes? *Acta Pharmacol. Sin.* *29*, 1275–1288.

Wang, C., Kang, S.G., HogenEsch, H., Love, P.E., and Kim, C.H. (2010). Retinoic Acid Determines the Precise Tissue Tropism of Inflammatory Th17 Cells in the Intestine. *J. Immunol.* *184*, 5519–5526.

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.

Wang, Y., Godec, J., Ben-Aissa, K., Cui, K., Zhao, K., Pucsek, A.B., Lee, Y.K., Weaver, C.T., Yagi, R., and Lazarevic, V. (2014). The transcription factors T-bet and Runx are required for the ontogeny of pathogenic interferon- γ -producing T helper 17 cells. *Immunity* *40*, 355–366.

Ward, N.L., and Umetsu, D.T. (2014). A new player on the psoriasis block: IL-17A- and IL-22-producing innate lymphoid cells. *J. Invest. Dermatol.* *134*, 2305–2307.

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.

Weiss, J.M., Bilate, A.M., Gobert, M., Ding, Y., Curotto de Lafaille, M.A., Parkhurst, C.N., Xiong, H., Dolpady, J., Frey, A.B., Ruocco, M.G., et al. (2012). Neuropilin 1 is expressed on

thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3+ T reg cells. *J. Exp. Med.* 209, 1723–1742.

Weizman, O.-E., Adams, N.M., Schuster, I., 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*.

Wilcox, G. (2005). Insulin and Insulin Resistance. *Clin. Biochem. Rev.* 26, 19–39.

Wilhelm, C., Hirota, K., Stieglitz, B., Snick, J.V., Tolaini, M., Lahl, K., Sparwasser, T., Helmbj, H., and Stockinger, B. (2011). An IL-9 fate reporter demonstrates the induction of an innate IL-9 response in lung inflammation. *Nat. Immunol.* 12, 1071.

Wolk, K., Kunz, S., Witte, E., Friedrich, M., Asadullah, K., and Sabat, R. (2004). IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* 21, 241–254.

Wong, S.H., Walker, J.A., Jolin, H.E., Drynan, L.F., Hams, E., Camelo, A., Barlow, J.L., Neill, D.R., Panova, V., Koch, U., et al. (2012). Transcription factor ROR α is critical for nuocyte development. *Nat. Immunol.* 13, 229–236.

Wüthrich, M., Gern, B., Hung, C.Y., Ermland, K., Rocco, N., Pick-Jacobs, J., Galles, K., Filutowicz, H., Warner, T., Evans, M., et al. (2016). Vaccine-induced protection against 3 systemic mycoses endemic to North America requires Th17 cells in mice. *J. Clin. Invest.* 126, 795.

Xu, X., Weiss, I.D., Zhang, H.H., Singh, S.P., Wynn, T.A., Wilson, M.S., and Farber, J.M. (2014). Conventional NK cells can produce IL-22 and promote host defense in *Klebsiella pneumoniae* pneumonia. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 192, 1778–1786.

Yamamoto, M., Rennert, P., McGhee, J.R., Kweon, M.N., Yamamoto, S., Dohi, T., Otake, S., Bluethmann, H., Fujihashi, K., and Kiyono, H. (2000). Alternate mucosal immune system: organized Peyer’s patches are not required for IgA responses in the gastrointestinal tract. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 164, 5184–5191.

Yang, Q., Monticelli, L.A., Saenz, S.A., Chi, A.W.-S., Sonnenberg, G.F., Tang, J., De Obaldia, M.E., Bailis, W., Bryson, J.L., Toscano, K., et al. (2013). T cell factor 1 is required for group 2 innate lymphoid cell generation. *Immunity* 38, 694–704.

Yang, Y., Weiner, J., Liu, Y., Smith, A.J., Huss, D.J., Winger, R., Peng, H., Cravens, P.D., Racke, M.K., and Lovett-Racke, A.E. (2009). T-bet is essential for encephalitogenicity of both Th1 and Th17 cells. *J. Exp. Med.* 206, 1549–1564.

Ye, P., Rodriguez, F.H., Kanaly, S., Stocking, K.L., Schurr, J., Schwarzenberger, P., Oliver, P., Huang, W., Zhang, P., Zhang, J., et al. (2001). Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J. Exp. Med.* 194, 519–527.

Yokota, Y., Mansouri, A., Mori, S., Sugawara, S., Adachi, S., Nishikawa, S., and Gruss, P. (1999). Development of peripheral lymphoid organs and natural killer cells depends on the helix-loop-helix inhibitor Id2. *Nature* 397, 702–706.

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.

Yoshida, H., Kawamoto, H., Santee, S.M., Hashi, H., Honda, K., Nishikawa, S., Ware, C.F., Katsura, Y., and Nishikawa, S.I. (2001). Expression of alpha(4)beta(7) integrin defines a distinct pathway of lymphoid progenitors committed to T cells, fetal intestinal lymphotoxin producer, NK, and dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 167, 2511–2521.

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.

Zhang, K., Xu, X., Pasha, M.A., Siebel, C.W., Costello, A., Haczku, A., MacNamara, K., Liang, T., Zhu, J., Bhandoola, A., et al. (2017). Cutting Edge: Notch Signaling Promotes the Plasticity of Group-2 Innate Lymphoid Cells. *J. Immunol.* 1601421.

Zheng, Y., Valdez, P.A., Danilenko, D.M., Hu, Y., Sa, S.M., Gong, Q., Abbas, A.R., Modrusan, Z., Ghilardi, N., de Sauvage, F.J., et al. (2008). Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat. Med.* *14*, 282–289.

Zook, E.C., and Kee, B.L. (2016). Development of innate lymphoid cells. *Nat. Immunol.* *17*, 775–782.