



HAL
open science

Etude des conséquences d'un gain de fonction de Sting chez la souris : modèle STING V154M/WT

Delphine Bouis

► **To cite this version:**

Delphine Bouis. Etude des conséquences d'un gain de fonction de Sting chez la souris : modèle STING V154M/WT. Immunologie. Université de Strasbourg, 2018. Français. NNT : 2018STRAJ063 . tel-02917973

HAL Id: tel-02917973

<https://theses.hal.science/tel-02917973v1>

Submitted on 20 Aug 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.



UNIVERSITÉ DE STRASBOURG



ÉCOLE DOCTORALE VIE ET SANTE

CNRS – UPR3572

THÈSE présentée par :

Delphine BOUIS

soutenue le : **25 Septembre 2018**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Immunologie

**Etude des conséquences d'un gain de
fonction de Sting chez la souris :
Modèle STING V154M/WT**

THÈSE dirigée par :

Mme Pauline SOULAS-SPRAUEL

Professeur, Praticien hospitalier à l'Université
de Strasbourg – CNRS UPR3572

RAPPORTEURS :

Mme Ana CUMANO

Directeur de recherche à l'Institut Pasteur –
INSERM U668

Mr Jean-Philippe HERBEUVAL

Directeur de recherche à l'Université Paris-
Descartes – CNRS UMR8601

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mr Jean-Luc IMLER

Professeur à l'Université de Strasbourg –
CNRS UPR9022

Mme Despina MOSHOUS

Maitre de conférence, Praticien hospitalier à
l'Institut IMAGINE – INSERM U1163



École Doctorale
des Sciences de la Vie
et de la Santé
STRASBOURG



Pendant ces 3 années de thèse, j'ai bénéficié d'un Contrat Doctoral de l'École Doctorale Vie et Santé de l'Université de Strasbourg, financé par le Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement supérieur et de la Recherche.

– Delphine BOUIS • d.bouis@ibmc-cnrs.unistra.fr –

– Université de Strasbourg – CNRS UPR3572 – Homéostasie lymphocytaire et autoimmunité –

– Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire - 15, Rue René Descartes – 67084 Strasbourg –

Remerciements

Tout d'abord, je tenais à remercier tous les membres du jury, de m'avoir fait le très grand honneur de participer à cette thèse.

Merci donc au **Professeur Imler** et aux **Docteur Cumano, Herbeuval** et **Moshous**, pour avoir pris le temps de lire et de juger cette thèse ainsi que pour votre disponibilité en ce jour particulier.

Merci à toi **Pauline** pour ces 5 années passées avec toi au laboratoire pendant mon M1, M2 et mes 3 années de thèse. Tu m'as connue en tant que petite pharma et m'a aidée à grandir. Tu es une directrice de thèse absolument géniale avec qui j'ai pris énormément de plaisir à travailler. Tu m'as appris beaucoup et je pense avoir beaucoup évolué ces dernières années notamment grâce à toi. Nous avons toujours pu nous parler et notre franchise mutuelle a fait que nous avons pu aller loin toutes les deux. Tu as toujours été à l'écoute et tu m'as toujours soutenue, même dans les moments les plus difficiles pour moi. Je n'oublie bien entendu pas ton aide précieuse pour l'anti-moustique, le baume du tigre et l'aérius !! C'est toi qui a éveillé mon intérêt pour l'immunologie et qui a su me convaincre de rester en thèse. Grâce à toi j'ai passé des moments extraordinaires et j'ai rencontré des personnes formidables. Pour tout ça et pour tout ce que je ne dis pas, Merci.

Bien entendu, que serait le labo sans toutes les personnes merveilleuses que j'ai pu rencontrer.

Florent, euh pardon Docteur, non toujours pas... Docteur Capitaine (enfin faudrait déjà le permis bateau pour ça...) Lord (et ce lopin de terre à Edimburgh... ?) Arbogast c'est bien cela ? Déjà d'un point de vue pratique, un énorme merci à toi pour ton aide sur mes figures. Illustrator ne m'écoute pas ni ne m'obéit. Merci aussi pour l'aide apportée au courant de ma thèse, et pour m'avoir appris beaucoup. Ce fut un réel plaisir de pouvoir compter sur toi en terme de manip (et plus encore !), pour avoir des idées géniales ou complètement loufoques ! #A man of focus ! D'un point de vue personnel, je dois dire que je ne m'attendais pas à rencontrer quelqu'un comme toi, que ce soit au travail en particulier ou dans la vie en général. Tu es l'une des meilleures personnes que j'ai pu rencontrer (quand tu es de bonne humeur). C'est grâce à toi que j'ai passé les meilleurs moments de ma thèse. Tu es une personne très forte avec énormément de volonté. Et malgré ton caractère de cochon (à la hauteur du mien), je trouve que tu es quelqu'un de formidable. Tellement de fous rires, toujours là pour moi, dans les moments difficiles comme dans ceux plus légers. Tu as rendu ma thèse vraiment agréable à vivre et pour ça et pour tout le reste, je ne te remercierai jamais assez. C'est le début d'une grande aventure !

Je n'oublie pas toutes les personnes de l'équipe 1 avec qui j'ai passé des moments fantastiques, entre les soirées barbecue au lac, ou devant un match de foot. **Yannick, Quentin** et **Aurore**, des bouffées d'air frais au courant de ma thèse, on en oublierait presque que Quentin vient de Barr et que Yannick adore le rince-cochon ! Sans oublier **Léa**, qui m'a formée, rassurée, montré la voie. J'ai

adoré passé tout ce temps avec toi. Tu m'as entraîné sans relâche pour la MRT et ça en valait le coup, j'ai adoré avoir la possibilité de faire une thèse et encore plus de pouvoir la commencer avec toi. Merci ! Et puis bien sur, **Vincent**, avec qui j'ai eu les plus grosses frayeurs en restant tard le soir au labo. Une pause en bas, tu remontes et hop ! un zombie ! J'ai adoré ton franc-parler, ta légèreté, jamais de prise de tête, et un humour noir à souhait. **Aurélien**, toujours discret, toujours adorable, toujours prêt à aider sans jamais se plaindre. **Sophie**, râleuse mais tellement gentille. Capable de te prendre à la dernière minute en consultation parce que ta dent part en vrille quand toi tu veux juste partir en vacances, ou prête à m'apporter une pizza la veille de mon congrès pour déstresser ! **Virginia**, attentionnée et là pour tout le monde, à nous apprendre à baragouiner espagnol quand tout ce qu'on peut lui apprendre de français concerne les baraques à frites... Et enfin, **Mich-Mich**. Mais que ferait-on sans toi, tes insultes à 7h du matin, les tubes qui volent et mickaël qui hurle ! J'ai détesté travailler avec toi ! Mais je trouve que tu es une personne super avec qui j'ai beaucoup rigolé (en dehors du travail !)

Fred, pour ton aide précieuse tout au long de ma thèse, ta présence et ta gentillesse et ton humour très spécial ! Attention, je crois que c'est contagieux !

Merci aussi à **Anne-Marie** et **Anne**, pour avoir été là tout du long, à m'expliquer le côté obscur de la science. J'ai adoré travailler avec vous deux et vous m'avez apporté beaucoup, tant au niveau personnel que professionnel. Une pensée pour **Christiane** et **Dilek**, toujours très gentilles et dévouées, avec qui j'ai beaucoup aimé discuté dans notre vieil IPCB.

Et puis bien sur, un grand merci à **Anne-Sophie** et **Thierry** !

A tous mes autres collègues, qui ont permis de rendre cette thèse plus agréable. Des soirées gros n'importe quoi, du vin blanc et du pâté en croûte à 5h du matin, des tacos (oui oui Romain, personne n'oubliera... Jamais... !), ou juste des barbecues improvisés ! Merci à vous tous, **Abdou**, **Romain**, **Alex**, **Quentin**, **Adrien**, **Caroline**, **Cerise**, **Lucie**... et j'en passe. **Chloé**, on s'est connues trop tard. Les moments passés avec toi étaient franchement géniaux ! Merci pour tout !

Et bien entendu, merci à **Isabelle**, pour ta bonne humeur permanente, tes excellents conseils, ta disponibilité, ta promptitude et efficacité à régler n'importe quel problème ! Tu es une personne merveilleuse et la fée de l'unité ! Merci pour tout ce que tu m'as apporté ! Y compris les bonbons !

A toutes les autres personnes extraordinaires qui ont été là pour moi : **Astrid**, toujours avec un schtroumpf ou deux, et prête à m'aider quelque soit la demande, même si c'est pour fabriquer un petit cheval ou coller des fleurs de lys sur une cape ! **Monique**, **Delphine** et **Fabien**, heureux membres de la confrérie des ours ! **Vincent Flacher**, et **Chris** pour vos idées et vos conseils. **Peggy**, pour ton aide précieuse. **Karine** et **David**, pour toutes nos discussions coup de gueule, et les autres aussi, votre humour et bonne humeur.

D'énormes pensées pour toutes ces personnes croisées au détour des doctoriales et avec qui j'ai adoré partager des bulles, du lard et des coch... ! **Damien**, **Alexis**, **Emma**, **Antoine**, **Najwa**... J'ai été plus qu'heureuse de vous rencontrer.

Et puis mes amis, tous ceux qui me supportent depuis tant d'années maintenant, **Emilie**, **Martin**, **Margaux**, **Guillaume**, **Myriam**, **Marianne**, **Camille**... Et particulièrement **ma schnoukie**. Merci d'avoir été là en chaque instant, de m'avoir aidée, soutenue, fait rire, à qui j'ai toujours pu me confier sans jamais risquer de me faire juger. Avec qui il suffit de dire Hop et c'est parti on se

retrouve à courir dans la boue ! Merci pour tout, d'être là et d'être toi ! Et bien entendu, que serait omy sans **Ali** ! Merci de tout cœur !

Et puis bien entendu **Doris**, pour m'avoir invitée toutes les semaines, à manger des repas merveilleux, à discuter, à boire un petit verre après une dure journée de marche, ou m'accueillir sans réserve pour Nouvel An. Vous connaître est un réel bonheur et je ne vous remercierai jamais assez. Merci aussi à **Claire** de m'avoir accueillie et offert...Mon premier bodyboard !!

A toute ma famille. Vous avez toujours été là pour moi, à chaque instant. Vous avez contribué à faire de moi celle que je suis aujourd'hui et j'espère en ce jour vous en rendre fiers. Il n'est jamais aisé de mettre des mots sur ce que l'ont ressent, surtout en pareil instant... Pas chose facile que de vous dire tout l'amour que j'ai pour vous et à quel point, maintenant que je suis grande, je réalise quel travail fastidieux c'était (et c'est toujours) que de me supporter au quotidien, moi et mon caractère de cochon, ma tête de linotte, mon humeur changeante, mon impatience, et j'en passe. Vous avez été là du début à la fin, à me protéger, me porter toujours plus haut, ou me ramasser dans les moments où j'étais au plus bas. A chacun de vous je dis merci, merci de m'avoir portée si haut, merci pour tout.

Maman, Papa, Jean-Luc, Katia, Marie, Pauline, Axel, Natacha, Grand-mère, Grand-père... Merci à vous tous (et bien sur à ma famille en général) mais à vous en particulier. Outre d'être mon jour, il est aussi le vôtre.

Résumé

De nombreuses mutations ponctuelles dans le gène *STING* chez l'Homme (telle que la mutation V155M par exemple) ont récemment été associées à une pathologie autoinflammatoire sévère appelée SAVI (*STING Associated Vasculopathy with onset in Infancy*). Cette pathologie fait partie des interféronopathies et est caractérisée par une vasculopathie conduisant à des nécroses, une fibrose pulmonaire et des symptômes lupus-like.

Afin de mieux comprendre la physiopathologie du SAVI, nous avons généré un modèle murin porteur de la mutation correspondante (V154M) au moyen de la technologie CRISPR/Cas9.

Ces souris développent un phénotype SCID (*Severe combined immunodeficiency disease*) avec une diminution significative des LT, LB et cellules NK en périphérie. Ce défaut semble être présent dès les premiers stades de développement puisque les cellules progénitrices médullaires et thymiques sont touchées. Un défaut a en effet été observé dans la fraction A de Hardy dans la moelle osseuse, et au stade double négatif DN2 dans le thymus, et semble intrinsèque aux cellules hématopoïétiques. De plus, la réponse humorale est impactée puisque nous observons une quasi absence d'anticorps (IgM, IgG et IgA). Ces résultats sont en accord avec des expériences *in vitro* montrant des défauts des LT et LB matures. Ces souris présentent par ailleurs une expansion du compartiment myéloïde en périphérie. Enfin, le SAVI étant classé parmi les interféronopathies, nous nous sommes intéressés à la réponse IFN I. Les souris *STING* V154M/WT présentent bien une signature IFN, cependant le phénotype SCID est IFN indépendant, puisqu'il n'est pas réversé dans des animaux KO pour le récepteur aux IFN I.

En conclusion, ces résultats mettent en évidence un rôle important de *STING* dans le développement lymphoïde.

Mots clés : *STING, V154M, SCID, IFN I, développement lymphoïde.*

Abstract

In humans, point mutations in the *STING* gene, such as V155M, lead to a severe autoinflammatory disease called SAVI (STING Associated Vasculopathy with onset in Infancy). This pathology is classified as an interferonopathy and is characterized by a vasculopathy leading to necrosis, a pulmonary fibrosis and a lupus-like pathology.

In order to better understand the pathophysiology of this disease, we generated a mouse model with the corresponding *Sting* mutation (V154M), using CRISPR/Cas9 technology.

These mice develop a severe combined immunodeficiency disease (SCID) with a significant decrease of peripheral T, B and NK cells. This defect seems to be present since the early stages of development since medullary and thymic progenitor cells are impacted. Indeed, this defect is already observed in Hardy fraction A of B-cell progenitors in bone marrow and at the double negative state (DN2) in thymus, and seems intrinsic to hematopoietic cells. In addition, the humoral response is impacted since there is almost no secretion of antibodies (total IgM, IgG and IgA). The results of *in vitro* experiments are in accordance with the T- and B- cell defects that we observed *in vivo*. Moreover, these mice show a significant expansion of the monocytes' and granulocytes' compartments in the periphery. Finally, as SAVI is an interferonopathy, we also checked the IFN production. *Sting* V154M mice are characterized by an IFN signature but their phenotype is independent of the IFN pathway, as the phenotype is not reversed in *Sting* V154M IFNAR KO mice.

In conclusion, our results highlight a new and important role of STING in lymphocyte development.

Key words : *STING*, *V154M*, *SCID*, *IFN I*, *lymphoid development*.

Table des matières

ABREVIATIONS	6
LISTE DES FIGURES	14
LISTE DES TABLEAUX	14
LISTE DES ANNEXES	15
INTRODUCTION	16
PARTIE I - L'immunité innée, première ligne de défense	17
I- Introduction	17
II- Les interférons (IFN) - Généralités	18
II-1. Les IFN I	19
II-1.1. Voies de signalisation déclenchées par l'activation d'IFNAR	20
II-1.1.1. Voie canonique.....	20
II-1.1.2. Autres voies induites par les IFN I	21
II-1.2. Production constitutive d'IFN I.....	22
II-1.2.1. IFN I et cellules souches hématopoïétiques (HSCs)	22
II-1.2.2. IFN I et différenciation des macrophages	22
II-1.3. Mécanismes anti-viraux	23
II-1.4. Régulation négative de la voie des IFN I	24
III- Détection d'agents pathogènes par le système immunitaire : Les PRRs	26
III-1. Les C-type lectin receptors (CLRs)	27
III-2. Les Toll-like receptors (TLRs).....	31
III-3. Les AIM2-like receptors (ALRs).....	34
III-4. Les NOD-like receptors (NLRs)	36
III-5. Les RIG-I-like Receptors (RLRs).....	38

III-6. Autres senseurs d'ADN cytosoliques.....	40
III-6.1. DAI.....	40
III-6.2. DDX41.....	41
IV- La voie des RLRs et la voie cGAS/STING : à la croisée des chemins	41
PARTIE II- Identification et caractérisation de la voie cGAS- cGAMP – STING .	42
I- STING.....	42
I-1. Découverte de STING	42
I-2. Structure de la protéine STING	43
I-3. Activation et Migration de STING.....	45
I-3.1. STING, translocon et complexe d'exocytose.....	45
I-3.2. Activation par les virus	46
I-3.3. Activation par les bactéries	47
I-3.4. Voie de signalisation générale de STING.....	47
I-3.5. STING, microbiote et homéostasie lymphocytaire	48
I-3.6.Activation via l'ADN mitochondrial.....	50
I-4. Régulation de STING.....	51
I-4.1. Régulation positive de la voie de STING.....	52
I-4.1.1. Tripartite motif-containing protein (TRIM) 56 et TRIM32	52
I-4.1.2. Ring finger protein 26 (RNF26).....	53
I-4.1.3. Inactive rhomboid protein 2 (iRhom2) et Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 5 (EIF3S5).....	53
I-4.1.4. Zinc finger DHHC domain-containing protein 1 (ZDHHC1), Autocrine motility factor receptor (AMFR) et Insulin-induced gene 1 (INSIG1)	54
I-4.2. Régulation négative de la voie de STING	55
I-4.2.1. TRIM30 α (pour Tripartite motif-containing protein) et RNF5 (pour Ring finger protein 5).....	55
I-4.2.2. Ubiquitin-specific protease 13 (USP13)	56
I-4.2.3. RIG-I et IL-6.....	56

I-4.2.4. STING et la machinerie autophagique	57
I-4.2.5. NLRC3 et NLRX1 (pour NOD-like receptor C3 ou X1)	61
I-4.2.6. Protein phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ -dependent, 1A (PPM1A).....	62
II- cGAS	63
II-1. Découverte et description de la c-GMP-AMP synthase	63
II-2. Activation de l'enzyme cGAS.....	64
II-3. Régulation	65
II-3.1. Régulation par l'autophagie	65
II-3.2. Régulation par des modifications post-traductionnelles	65
II-3.3. Régulation de cGAS via des mécanismes épigénétiques et boucle d'auto-régulation ...	66
II-3.4. Régulation par l'ADN	67
III- cGAMP	68
III-1. Description	68
III-2. Régulation	68
IV- Résumé de la voie cGAS – cGAMP - STING	69
PARTIE III : STING et pathologies associées	70
I- Les interféronopathies	70
II- STING et cancer	71
III- STING et autoinflammation/autoimmunité.....	72
IV- Mutations de STING	73
IV-1. STING et FCL.....	73
IV-2. STING et LES	73
IV-3. STING et SAVI	74
IV-3.1. Signature IFN et caractéristiques cliniques.....	74
IV-3.2. Caractéristiques biologiques.....	75
IV-4. Autres mutations – correspondance Homme/souris	75
PARTIE IV – Développement des cellules progénitrices hématopoïétiques	77

I- Les cellules souches hématopoïétiques (HSCs)	77
II- Développement des populations lymphoïdes	79
II-1. Lymphopoïèse B	79
II-1.1. Facteurs de transcription et cytokines impliqués dans la régulation du développement B	79
II-1.2. L'émergence d'un répertoire varié de LB.....	81
II-1.3. Du stade pré-proB à la sortie de la moelle osseuse	82
II-1.4. Le LB en périphérie.....	83
II-2. Lymphopoïèse T	84
II-2.1. Entrée de l'ETP (pour <i>Early T cell progenitor</i>) dans le thymus.....	84
II-2.2. Evolution des progéniteurs thymiques	85
II-2.2.1 DN1.....	86
II-2.2.2 DN2.....	86
II-2.2.3 DN3.....	87
II-2.2.4 Des DN4 aux DP	87
II-2.3. Le LT en périphérie.....	88
II-3. Lymphocytes innés.....	89
III- Développement des populations myéloïdes	90
PARTIE V - Déficits immunitaires primitifs (DIP)	91
I- Généralités	91
II- Déficit immunitaire combiné sévère (SCID)	92
II-1. SCID T-B+NK-	94
– Exemple du déficit en JAK3 –.....	94
II-2. SCID T-B-NK-	94
– Exemple du déficit en Adénosine déaminase (ADA) –	94
III- Déficit immunitaire combiné (CID)	95
III-1. CID avec diminution des LT CD4+.....	97
– Exemple du déficit en LCK –.....	97

III-2. CID avec diminution des LT CD8+.....	97
– Exemple du déficit en ZAP70 –	97
III-3. CID avec diminution des LB	98
– Exemple du déficit en IL-21 –	98
PROJET DE THESE	99
AVANT-PROPOS.....	100
RESULTATS PARTIE I.....	102
RESULTATS PARTIE II.....	122
MATERIEL ET METHODES - partie II.....	123
RESULTATS PARTIE II.....	125
DISCUSSION	133
BIBLIOGRAPHIE.....	145
ANNEXES.....	171

ABREVIATIONS

A

Ac	<i>Anticorps</i>
ACP5	<i>Phosphatase, acid, type 5</i>
ADA	<i>Adénosine déaminase</i>
ADAM	<i>A disintegrin and metalloproteinase</i>
ADAR1	<i>Adenosine deaminase RNA-specific 1</i>
ADN	<i>Acide désoxyribonucléique</i>
ADNmt	<i>ADN mitochondrial</i>
AGS	<i>Syndrome Aicardi-Goutières</i>
AIM2	<i>Absent in Melanoma 2</i>
AK2	<i>Adenylate kinase 2</i>
Akt (alias PKB)	<i>Protein kinase B</i>
ALRs	<i>AIM2-like receptors</i>
AMFR	<i>Autocrine motility factor receptor</i>
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
AP1	<i>Activator protein 1</i>
ARN	<i>Acide ribonucléique</i>
ASC	<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i>
ATF	<i>Activating transcription factor</i>
Atg	<i>Autophagy related genes</i>
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>

B

B2M	<i>β2-microglobulin</i>
Bcl10	<i>B cell lymphoma 10</i>
BCR	<i>B Cell Receptor</i>
BDCA-2	<i>Blood dendritic cell antigen 2</i>
BIR	<i>Baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat</i>
BMDMs	<i>Bone marrow derived macrophages</i>
BSN	<i>Bilateral striatal necrosis</i>

C

C1q	<i>Complement component 1q</i>
CARD	<i>Caspase recruitment and activation domain</i>
CARD9	<i>Caspase Recruitment Domain Family Member 9</i>
CASP	<i>Caspase apoptosis-related cysteine protease</i>
CBD	<i>CDNs binding domain</i>
CCP	<i>Cytosolic carboxypeptidase</i>
c-di-AMP	<i>Cyclic di-adénosine monophosphate</i>
c-di-GMP	<i>Cyclic di-guanosine monophosphate</i>

CDK	<i>Cyclin dependent kinase</i>
CDN	<i>Cyclic dinucleotides</i>
CFS-1	<i>Colony stimulating factor 1</i>
CFS-1R	<i>Colony stimulating factor 1 receptor</i>
cGAMP	<i>Cyclic GMP-AMP</i>
cGAS	<i>Cyclic GMP-AMP synthase</i>
CID	<i>Déficits immunitaires combinés</i>
CIITA	<i>Régulateur transcriptionnel du CMH II</i>
cKIT	<i>Cytokine receptor-tyrosine kinase</i>
CLECX_Y	<i>C-type lectin domain family x, member Y</i>
CLP	<i>Common lymphoid progenitor</i>
CLRs	<i>C-type lectin receptors</i>
CMH	<i>Complexe majeur d'histocompatibilité</i>
CMP	<i>Common myeloid progenitor</i>
CORO1A	<i>Coronin-1A</i>
CpG	<i>Cytosine-phosphate-guanine</i>
CTD	<i>C-terminal domain</i>
CTL_D	<i>C-type lectin-like domain</i>
CTT	<i>C-ter tail</i>
CVD	<i>Cardiovascular disease</i>
CXCL1	<i>Keratinocyte derived chemokine</i>
CXCL10	<i>C-X-C motif chemokine 10</i>
CXCL2	<i>Macrophage inflammatory protein-2</i>

D

DAI/ZBP-1	<i>DNA-dependent activator of IRFs</i>
DAMPs	<i>Damage-associated molecular patterns</i>
db	<i>Double brin</i>
DCIR	<i>Dendritic cell immunoreceptor</i>
DCLRE1C	<i>DNA cross-link repair protein 1C</i>
DCs	<i>Cellules dendritiques</i>
DC-SIGN	<i>Dendritic cell-specific ICAM3-grabbing nonintegrin</i>
DD	<i>Domaine de dimérisation</i>
DDX41	<i>DEAD-Box Helicase 41</i>
Dectin-1 ou CLEC7A	<i>C-type lectin domain family 7, member A</i>
DIP	<i>Déficits immunitaires primitifs</i>
DMXAA	<i>5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid</i>
DN	<i>Double négative</i>
DNGR-1	<i>DC NK lectin group receptor-1</i>
DOCK8	<i>Dedicator of cytokinesis 8</i>
DP	<i>Double positive</i>
DSH	<i>Dyschromatosis symmetrica hereditaria</i>

E

EBV	<i>Epstein-Barr virus</i>
EEA1	<i>Early endosome antigen 1</i>
EIF2A	<i>Eukaryotic translation initiation factor 2a</i>

EIF3S5 *Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 5*
 ENPP1 *Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase*
 EP *Erythrocyte-committed progenitor*
 ERK1/2 *Extracellular signal-regulated kinase 1/2*
 ETP *Early T cell progenitor*

F

FCL *Familial chilblain lupus*
 Flt3 *Fms-related tyrosine kinase 3*
 FOG-1 *Friend of GATA1*
 FOXN1 *Forkhead box N1*

G

GAS *Gamma-activated sequence*
 GATA.1 *GATA Binding Protein 1*
 GC *Germinal center*
 G-CSF *Granulocyte colony stimulating factor*
 GMP *Granulocyte/macrophage lineage-restricted progenitor*
 GOF *Gain-of-function*

H

HIN *Hematopoietic IFN-inducible nuclear antigens with a 200-amino-acid repeat*
 HIV *Human immunodeficiency virus*
 HSCs *Hematopoietic stem cells*
 HSP *Heat shock proteins*
 HSV *Herpes simplex virus*

I

ICAM *Intracellular adhesion molecule*
 ICC *Intracranial calcification*
 iE - DAP *g-D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid*
 IFI16 *IFN- γ -inducible protein 16*
 IFIH1 *IFN-induced helicase C domain-containing protein 1*
 IFN *Interféron*
 IFNAR *Interferon α/β receptor*
 IFNGR *Interferon γ receptor*
 Ig *Immunoglobuline*
 IKK *I κ B kinase*
 IL *Interleukine*
 IL2RG *IL-2 receptor gamma*
 ILCP *ID2+PLZF+ ILC precursor*
 ILCs *Innate Lymphoid cells*
 INSIG1 *Insulin-induced gene 1*
 IRAK *Interleukin-1 receptor-associated kinase*
 IRF *IFN regulatory factor*
 iRhom2 *Inactive rhomboid protein 2*

ISD	<i>Interferon stimulatory DNA</i>
ISG15	<i>Ubiquitin like modifier ISG15</i>
ISGF3	<i>Interferon-stimulated gene factor 3</i>
ISGs	<i>Interferon stimulated genes</i>
ISP	<i>Immature single positive</i>
ISRE	<i>IFN-stimulation responsive element</i>
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine based activation motif</i>
IUIS	<i>International Union of Immunological Societies</i>

J

JAK	<i>Janus activated kinases</i>
JNK	<i>c-jun N-terminal kinases</i>

K

KIR	<i>Kinase inhibitory region</i>
KIT/SCF	<i>v-kit hardy-zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog</i>
KO	<i>Knock-out</i>
KSHV	<i>Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus</i>

L

LAMP1	<i>Lysosome-associated membrane protein 1</i>
LAPosome	<i>LC3-associated phagosome</i>
LB	<i>Lymphocyte B</i>
LB Fo	<i>LB folliculaire</i>
LB MZ	<i>LB de la zone marginale</i>
LB T	<i>LB transitionnel</i>
LC3	<i>Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3</i>
Lck	<i>Lymphocyte-specific protein-tyrosine kinase</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LES	<i>Lupus Erythémateux systémique</i>
LFR	<i>Leukemia/lymphoma-related factor</i>
LGP2	<i>Laboratory of genetics and physiology 2</i>
LIG4	<i>ADN ligase IV</i>
Lin	<i>Lineage</i>
LOF	<i>Loss-of-function</i>
LOX-1	<i>Lectin-like oxidized-lDl receptor</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>
LRRs	<i>Leucine Rich Repeats</i>
LT	<i>Lymphocyte T</i>
LTh	<i>Lymphocyte T helper</i>
LT-HSCs	<i>Long term HSCs</i>
Lti	<i>Lymphoid tissue inducer</i>
LTαβ	<i>Lymphotoxin αβ</i>

M

MAGT1	<i>Magnesium transporter 1</i>
MAL	<i>Myelin and lymphocyte protein</i>
Malt1	<i>Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1</i>
MAMPs	<i>Microbe-associated molecular patterns</i>
MAMs	<i>Mitochondria-associated membranes</i>
MAP3K14	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein</i>
MAVS	<i>Mitochondrial antiviral signaling protein</i>
MCP1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
MD2 ou Ly96	<i>Lymphocyte antigen 96</i>
MDA5	<i>Melanoma differentiation-associated gene 5</i>
MDL-1	<i>Myeloid dap12-associating lectin 1</i>
MDP	<i>Muramyl dipeptide</i>
MEFs	<i>Mouse Embryo fibroblats</i>
MEP	<i>Megakaryocyte/erythrocyte lineage-restricted progenitor</i>
MHV68	<i>Mouse hepatitis virus 68</i>
MICL	<i>Myeloid inhibitory c-type lectin-like receptor</i>
MKP	<i>Megakaryocyte-commited progenitor</i>
MPP	<i>Multipotent progenitor</i>
MSN	<i>Moesin</i>
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
Mx	<i>Myxovirus resistance</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response 88</i>

N

N	<i>Normal</i>
NACHT	<i>NLR, Nucleotide oligomerisation domain - like Receptors</i>
nc	<i>Non communiqué</i>
ND	<i>Non déterminé</i>
NEMO	<i>NF-κB essential modulator</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor-κB</i>
NHEJ1	<i>Non-homologous end-joining 1</i>
NICD	<i>Notch intracellular domain</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NLRs	<i>NOD-like Receptors</i>
NOD	<i>Nucleotide oligomerisation domain</i>
NOX	<i>NADPH oxydase</i>
NTD	<i>Transmembrane domain</i>

O

OAS	<i>2'5' oligoadenylate synthetase</i>
------------	---------------------------------------

P

p62/SQSTM1	<i>Sequestosome 1</i>
PAMPs	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
Pax5	<i>Paired box protein 5</i>

PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PKC δ	<i>Protéine kinase C δ</i>
PKR	<i>Protein kinase, IFN-inducible dsRNA-activated</i>
POLA1	<i>Polymerase DNA A1</i>
PP2C	<i>Protein phosphatase 2C</i>
PPM1a	<i>Protein phosphatase, Mg²⁺ /Mn²⁺-dependent, 1A</i>
PQBP1	<i>Polyglutamine-binding protein</i>
PRAAS	<i>Proteasome-associated autoinflammatory syndrome</i>
PRKCD	<i>Protein kinase, dna-activated, catalytic subunit</i>
PRRs	<i>Pattern recognition receptors</i>
PSMB	<i>Proteasome subunit beta</i>
PTPRC	<i>Protein-tyrosine phosphatase, receptor-type, C</i>
pTα	<i>Pre-T cell α</i>
PYD	<i>Pyrin domain</i>
PYHIN	<i>Pyrin and HIN domain family</i>

R

Raf1	<i>V-RAF-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
RAGA	<i>Recombination-activating gene</i>
RANKL	<i>Receptor activator of NF-κB ligand</i>
RANTES	<i>Regulated upon activation, normal T-cell expressed, and presumably secreted</i>
RE	<i>Réticulum endoplasmique</i>
RFX5	<i>Regulatory factor X 5</i>
RFXANK	<i>Regulatory factor X, ankyrin repeat-containing</i>
RFXAP	<i>Regulatory factor X-associated protein</i>
RICK	<i>RIP-like interacting caspase-like apoptosis regulatory protein kinase</i>
RIG-I	<i>Retinoic acid inducible gene I</i>
RLRs	<i>RIG-I-like Receptors</i>
RNA pol III	<i>RNA polymerase III</i>
RNASEH2	<i>Ribonuclease H2</i>
RNF	<i>Ring finger protein</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
Rubicon	<i>Run domain- and cysteine-rich domain-containing beclin-1-interacting protein</i>

S

SAMHD1	<i>SAM domain- and HD domain-containing protein 1</i>
SAVI	<i>STING-associated vasculopathy with onset in infancy</i>
Sca1	<i>Stem-cell antigen 1</i>
SCID	<i>Syndrome d'immunodéficience combinée sévère</i>
SF2	<i>Helicase superfamily 2</i>
SFKs	<i>Src family kinases</i>
SH2	<i>Src homology 2</i>
SHP2	<i>Src homology region 2-containing protein tyrosine phosphatase 2</i>
SKIVL2	<i>Superkiller viralicidic activity 2S</i>
SLAM/CD150	<i>Signaling lymphocyte activation molecule</i>
SMS	<i>Singleton-Merten syndrome</i>

SOCS	<i>Suppressor of cytokines signaling</i>
SP (pour LT)	<i>Simple positive</i>
SP (voir Interféronopathies)	<i>Spastic paraparesis</i>
SPENCD	<i>Spondyloenchondrodysplasia</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
ST-HSCs	<i>Short term HSCs</i>
STING	<i>Stimulator of interferon genes</i>
STK4	<i>Serine/threonine protein kinase 4</i>
Syk	<i>Spleen tyrosine kinase</i>

T

TAB	<i>TAK1-binding protein</i>
TACE	<i>TNFα converting enzyme</i>
Tak1	<i>Transforming growth factor beta-activated kinase 1</i>
TBK1	<i>TANK binding kinase</i>
TCGF	<i>T cell growth factor</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>
TdT	<i>Terminal desoxynucleotidyl transferase</i>
Tetherin (alias BST2)	<i>Bone marrow stromal antigen 2</i>
Tfam	<i>Transcription factor A mitochondrial</i>
Tfh	<i>LT folliculaire helper</i>
TFR	<i>Transferrin receptor</i>
TGFβ	<i>Tumor growth factor β</i>
THES	<i>Tricho-hepato-enteric syndrome</i>
TIR	<i>Toll/IL-1R</i>
TIRAP	<i>TIR domain containing adaptor protein</i>
TLRs	<i>Toll-like Receptors</i>
TM	<i>Transmembrane domain</i>
TMEM173	<i>Transmembrane protein 173</i>
TORCH	<i>Toxoplasmosis, Other, Rubella, Cytomegalovirus and Herpes infections</i>
TRAF	<i>TNF receptor associated factor</i>
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TRAP	<i>Translocon associated protein</i>
TREX1	<i>3' repair exonuclease 1</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>
TRIM	<i>Tripartite motif-containing protein</i>
TTL	<i>Tubulin tyrosine ligase-like</i>
Tyk2	<i>Tyrosine kinase 2</i>

U

ULK1	<i>UNC51-like kinase 1</i>
UPR	<i>Unfolded protein response</i>
USP	<i>Ubiquitin-specific protease</i>

V

VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
-------------	---

Viperin	<i>Inhibitory protein endoplasmic reticulum-associated IFN inducible</i>
vIRF1	<i>viral IFN regulatory factor 1</i>
VPS34/PIK3C3	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase, class 3</i>
VSV	<i>Vesicular stomatitis virus</i>
X	
XLPDR	<i>X-linked reticulated pigmentary disorder</i>
Z	
ZAP70	<i>Zeta-chain-associated protein kinase70</i>
ZDHC1	<i>Zinc finger DHHC domain-containing protein 1</i>

Liste des figures

FIGURE 1 : Rôles des IFN I	19
FIGURE 2 : Voies conduisant à la production des IFN I.....	20
FIGURE 3 : Voies canonique et non-canonique des IFN I.....	20
FIGURE 4 : Structures des motifs ITAM-ITIM et HemITAM.....	29
FIGURE 5 : Voie de signalisation des CLR.....	30
FIGURE 6 : Modélisation structurale des TLRs (exemple du TLR3, Botos, 2011)	31
FIGURE 7 : Voies de signalisation des TLRs.....	33
FIGURE 8 : Structure de l'inflammasome, exemples des inflammasomes NLRP3 et AIM2.....	34
FIGURE 9 : Voies de signalisation des ALRs	35
FIGURE 10 : Structure des différents types de NLRs	36
FIGURE 11 : Voies de signalisation des NLRs	38
FIGURE 12 : Etat inactivé RIG-I	39
FIGURE 13 : Voies de signalisation des RLRs.....	39
FIGURE 14 : Récapitulatif des voies des PRRs.....	40
FIGURE 15 : Représentation schématique de la structure de la protéine STING.	43
FIGURE 16 : Etat d'auto-inhibition de la protéine STING (Adapté de Burdette, 2013).	44
FIGURE 17 : Voie générale de la signalisation de STING.....	48
FIGURE 18 : Régulation de STING	52
FIGURE 19 : Régulation de cGAS-cGAMP	65
FIGURE 20 : Signalisation de l'IFN I et cibles des gènes responsables des interféronopathies	71
FIGURE 21 : Mutations rencontrées dans le gène <i>Sting</i>	73
FIGURE 22 : Caractéristiques et devenir des cellules souches hématopoïétiques	77
FIGURE 23 : Voie de signalisation du récepteur Notch.....	79
FIGURE 24 : Lymphopoïèse B	81
FIGURE 25 : Devenir des LB à la sortie de la moelle osseuse.....	83
FIGURE 26 : Lymphopoïèse T.....	85
FIGURE 27 : Développement des LT à la sortie du thymus	88
FIGURE 28 : Les lymphocytes innées et leurs fonctions	89
FIGURE 29 : Développement de la lignée myéloïde.....	90

Liste des tableaux

TABLEAU 1 : Les sous-types d'IFN et leurs signalisations chez la souris (Petska, 2004).....	19
TABLEAU 2 : Exemples d'ISGs et leurs fonctions.....	21
TABLEAU 3 : Les CLR et leurs ligands	28
TABLEAU 4 : Les TLR et leurs ligands	32
TABLEAU 5 : Les ALRs et leurs ligands.....	35
TABLEAU 6 : Les NLR et leurs ligands	37
TABLEAU 7 : Les RLR et leurs ligands.....	38

<u>TABLEAU 8</u> : Les interféronopathies et la concordance des modèles murins	70
<u>TABLEAU 9</u> : Mutations GOF de <i>STING</i> et caractéristiques des patients	74
<u>TABLEAU 10</u> : Principales caractéristiques des déficits immunitaires combinés sévères (SCID)	93
<u>TABLEAU 11</u> : Principales caractéristiques des déficits immunitaires combinés (CID)	93
<u>TABLEAU 12</u> : Principales caractéristiques des patients SAVI et des modèles murins V154M et N153S	134

Liste des Annexes

<u>ANNEXE 1</u> : Trib1 is overexpressed in Systemic Lupus Erythematosus, while it regulates Immunoglobulin production in murine B cells	172
<u>ANNEXE 2</u> : CD4 T cell autophagy is integral to memory maintenance	186
<u>ANNEXE 3</u> : Fonctionnal autophagy is required for homeostasis maintenance and survival of Langerhans cells	199
<u>ANNEXE 4</u> : Phenotyping of autoreactive B cells with labeled nucleosomes in 56R transgenic mice	224

INTRODUCTION

INTRODUCTION

PARTIE I - L'immunité innée, première ligne de défense

I- INTRODUCTION

L'inflammation est une réponse protectrice vis à vis de stimuli néfastes (comme des agents pathogènes, des dommages cellulaires ...), assurant l'élimination des pathogènes, et également la réparation des tissus endommagés (Medzhitov, 2008). Elle est classiquement caractérisée par 5 symptômes majeurs que sont la rougeur, l'oedème, la chaleur, la douleur et la perte de fonction tissulaire. Ces phénomènes macroscopiques reflètent une augmentation de la perméabilité de l'endothélium vasculaire permettant l'entrée de composants sériques (notamment des chimiokines) **dans le tissu infecté/endommagé**, et l'infiltration de cellules immunitaires (Takeuchi, 2010).

L'immunité innée constitue l'une de nos premières lignes de défense. Le bon déroulement de cette réponse immunitaire dépend de l'existence de mécanismes de **détection des signaux de danger**, qui ont été activement recherchés au cours de ces dernières années. Polly Matzinger, notamment, établit dans les années 90 une théorie selon laquelle la réponse immunitaire est médiée par des signaux dit de « danger », relargués par les cellules de l'hôte (Matzinger, 1994). Parmi ces signaux, appelés **DAMPs** (pour *Damage-associated molecular patterns*), on peut citer un stress cellulaire, la présence d'ATP (pour *Adénosine triphosphate*) cytosolique, d'IL (Interleukine)-1 β , ou encore le relargage de protéines dites HSP (pour *Heat shock proteins*). De la même façon, des motifs issus de pathogènes forment la classe des **PAMPs** (pour *Pathogen Associated Molecular Patterns*), défini aujourd'hui sous **MAMPs** (pour *Microbe-associated molecular patterns*), englobant plus largement les motifs exprimés par les agents pathogènes et commensaux.

Ces motifs pourront être détectés par les cellules immunitaires de l'hôte au moyen de récepteurs spécifiques appelés PRR (pour *Pattern recognition receptor*) qui vont alors, comme mentionné plus haut, engendrer une réponse immunitaire à l'origine du relargage de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines, notamment (Ishikawa, 2011).

Ainsi, pour exemple, des PRRs tels que Retinoic acid inducible gene I (RIG-I), melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5), ou encore LGP2 (*laboratory of genetics and physiology 2*),

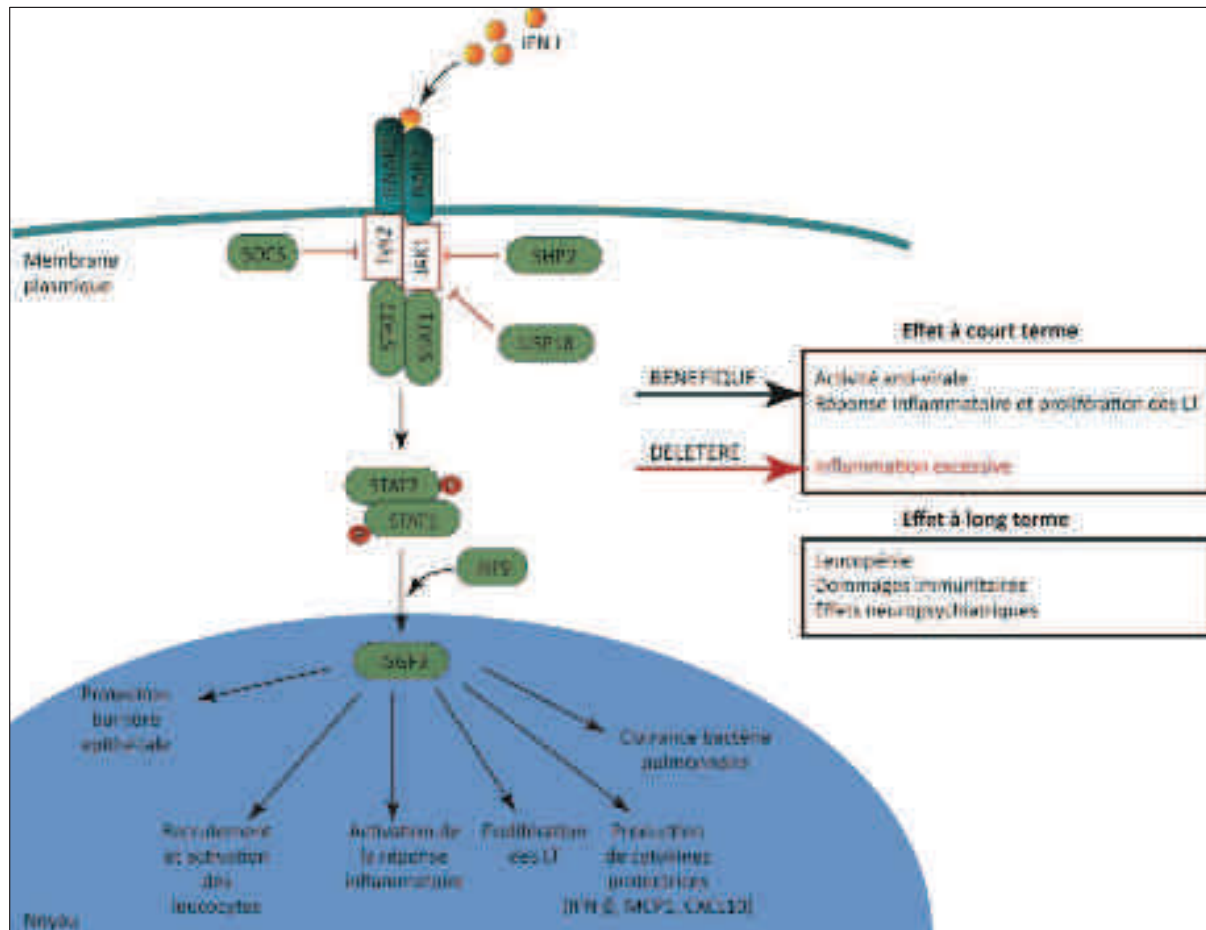
permettent de capter l'ARN (*Acide ribonucléique*) viral et d'induire une cascade de signalisation (Kato, 2006 ; Yoneyama, 2004 ; 2005) permettant la production d'IFN (pour *Interferon*) de type I (IFN I) et donc la mise en place d'une réponse anti-virale. Suite à leur interaction avec l'ARN viral, ces hélicases (catalysant l'ouverture des acides nucléiques double-brin) vont en effet permettre le recrutement de molécules adaptatrices et ainsi conduire à l'activation de kinases telles que les MAP (pour *Mitogen-activated protein*) kinases, IKK (pour *IκB kinase*)-related kinase, TBK1 (pour *TANK binding kinase*), et la kinase IKK-I (Kawai, 2005 ; Seth, 2005). Finalement, elles vont activer des facteurs de transcription tels que NF-κB (pour *Nuclear factor-κB*), AP1 (pour *Activator protein 1*) et IRF3 (pour *IFN regulatory factor 3*), qui vont être transloqués dans le noyau, se lier au promoteur de l'IFN et permettre la sécrétion d'IFN I, induisant donc une puissante réponse anti-virale.

II- LES INTERFERONS (IFN) - GENERALITES

Les IFN, découvert pour la première fois dans les années 50 (Isaacs et Lindemann, 1957 ; Nagano et Kojima, 1958) sont des polypeptides décrits comme appartenant à une famille de **cytokines induites au cours d'une infection virale** et possédant 3 fonctions majeures (Trinchieri, 2010). En effet, outre leur rôle essentiel dans la **défense anti-virale**, ils sont notamment capables de **moduler la réponse immunitaire innée** et **d'activer le système adaptatif** afin de permettre la mise en place d'une réponse de haute affinité (Durbin, 2000).

A l'heure actuelle, il existe **3 classes d'IFN** ayant été identifiés chez les mammifères, codés par des gènes situés sur le chromosome 4 chez la souris (chromosome 9 chez l'Homme) : **les IFN I**, qui incluent les IFNα (13 isoformes répertoriées), β, ε, κ et ω, **l'IFN II** (IFNγ) et **les IFN III** (λ 1, 2 et 3, aussi appelés IL29, IL28a et IL28b, respectivement) (Levy, 2011 ; Pestka, 2004). Ces cytokines se distinguent notamment par une signalisation moléculaire bien spécifique, à travers des récepteurs différents selon les sous-types, mais aussi des stimuli différents à l'origine de leur production (**Tableau 1**).

Figure 1 : Rôles des IFN I



Les IFN possèdent des rôles pléiotropes et sont impliqués, outre dans la réponse anti-virale, dans de nombreuses fonctions biologiques, bénéfiques ou délétères. Représentation schématique de la voie canonique des IFN I et des rôles associés aux IFN I (Adapté de Paludan, 2016).

Abréviations : CXCL10, C-X-C motif chemokine 10 ; IFN, Interferon ; IFNAR, Interferon- α/β receptor ; IL, Interleukin ; IRF9, Interferon regulatory factor 9 ; ISGF3, IFN-stimulated gene factor-3 ; JAK1, Janus Kinase 1 ; MCP1, Monocyte chemoattractant protein-1 ; SHP2, Src homology region 2-containing protein tyrosine phosphatase 2 ; SOCS, Suppressor of cytokine signaling ; Tyk2, Tyrosine Kinase 2 ; USP18, Ubiquitin specific peptidase 18.

TABLEAU 1 : Les sous-types d'IFN et leurs signalisations chez la souris (Petska, 2004)

LIGAND	SOUS-TYPES	RECEPTEUR (sous-unités)	SIGNALISATION
IFN I	IFN α	IFNAR (IFNAR 1/IFNAR 2)	Jak1 / Tyk2
	IFN β		Stat1 / Stat2 / Stat3
	IFN δ		Stat4 / Stat5
	IFN ϵ		PI3K
	IFN κ		Akt
	IFN τ		NF- κ B
	IFN ω		MAPK
IFN II	IFN γ	IFN- γ R (IFN- γ R1/IFN- γ R2)	Jak1 / Jak2 Stat1 / Stat3 / Stat5 PI3K Akt NF- κ B MAPK
IFN III	IFN λ 1/IL-29	IFN- λ R (IL-28R1 / IL-10R2)	Jak1 / Tyk2
	IFN λ 2/IL-28A		Stat1 / Stat2 / Stat3
	IFN λ 3/IL-28B		Stat5

Abréviations : **Akt**, alias **PKB**, *Protein kinase B* ; **IFN**, *Interferon* ; **IFNAR**, *Interferon α/β receptor* ; **IFN- γ R**, *Interferon γ receptor* ; **Jak**, *Janus activated kinase* ; **MAPK**, *Mitogen-activated protein* ; **NF- κ B**, *Nuclear factor- κ B* ; **PI3K**, *Phosphatidylinositol 3-kinase* ; **STAT**, *Signal Transducers and Activators of Transcription* ; **Tyk**, *Tyrosine kinase*.

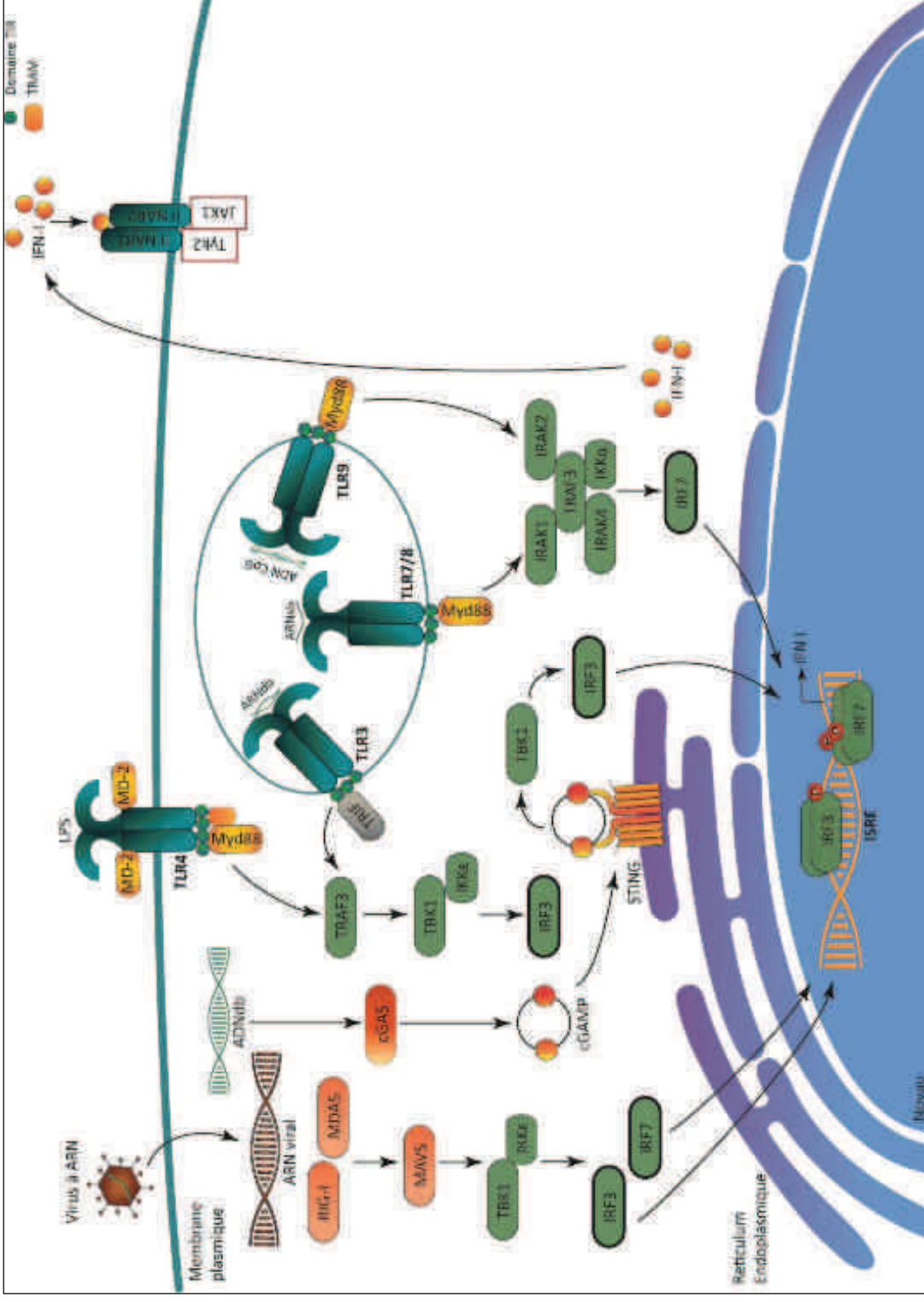
Nous nous concentrerons dans ce manuscrit sur les IFN I, et plus exactement les IFN α et IFN β , étant les sous-types impliqués dans la pathologie étudiée au cours de cette thèse, et majoritairement responsables d'un nouveau sous-groupe de maladies auto-inflammatoires, qualifié d'interféronopathies.

II-1. Les IFN I

Ces molécules possèdent des **effets pléiotropes** voire antagonistes, puisqu'ils sont capables de réguler et d'induire la prolifération, la différenciation, la migration et survie cellulaire mais aussi d'inhiber la prolifération et de conduire à la mort cellulaire par apoptose (**Figure 1**) (Gough, 2012 ; Platanias, 2005).

La grande majorité des types cellulaires est capable de produire des IFN I bien que les **cellules hématopoïétiques soient considérées comme source majeure**, et particulièrement les cellules dendritiques plasmacytoïdes (Ivashkiv, 2014). Cette production est, comme mentionné plus haut, secondaire à la reconnaissance de motifs d'agents pathogènes microbiens (virus, bactéries, champignons), les MAMPs, par les PRRs. Cet engagement MAMPs-PRRs aboutit à la sécrétion de

Figure 2 : Voies conduisant à la production des IFN I



De nombreux types cellulaires sont capables de produire des IFN I, et de nombreuses voies biologiques conduisent à leur production. C'est le cas de la voie RIG-I/MAVS suite à la reconnaissance d'ARN cytosolique, mais aussi des TLRs (4/3/7/8/9) par activation des IRF3 ET 7. Enfin, la voie cGAS/STING, après reconnaissance d'ADNdb.

Abréviations : **ADN**, acide désoxyribonucléique ; **ARN**, acide ribonucléique ; **cGAS**, Cyclic GMP-AMP synthase ; **db**, double brin ; **IFN**, Interferon ; **IFNAR**, Interferon- α/β receptor ; **IKK**, I-kappa B kinase ; **IRAK**, interleukin-1 receptor-associated kinase ; **IRF**, Interferon regulatory factor ; **ISRE**, Interferon-stimulated response element ; **JAK1**, Janus Kinase 1 ; **LPS**, Lipopolysaccharide ; **MAVS**, Mitochondrial antiviral-signaling protein ; **MD-2**, ou **Ly96**, Lymphocyte antigen 96 ; **MDA5**, Melanoma Differentiation-Associated protein 5 ; **Myd88**, Myeloid differentiation primary response 88 ; **RIG-1**, Retinoic-acid-inducible protein 1 ; **sb**, simple brin ; **STING**, Stimulator of interferon genes ; **TBK1**, TANK Binding Kinase 1 ; **TIR**, Toll/interleukin-1 receptor ; **TIRAP**, TIR domain containing adaptor protein ; **TLR**, Toll-like receptor ; **TRAF3**, TNF receptor associated factor 3 ; **TRAM**, TRIF-related adaptor molecule ; **TRIF**, TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon- β ; **Tyk2**, Tyrosine Kinase 2.

cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6..), dont l'expression provient principalement de l'activation de la voie NF- κ B, et d'IFN I, dont l'expression est régulée par les IRF 3 et 7. Une fois secrétés, les IFN I sont reconnus par leur récepteur transmembranaire hétérodimérique : IFNAR (pour *Interferon α/β receptor*), composé des sous-unités IFNAR1 et IFNAR2. L'action des IFN I est autocrine ou paracrine (**Figure 2**) (Iwasaki, 2012).

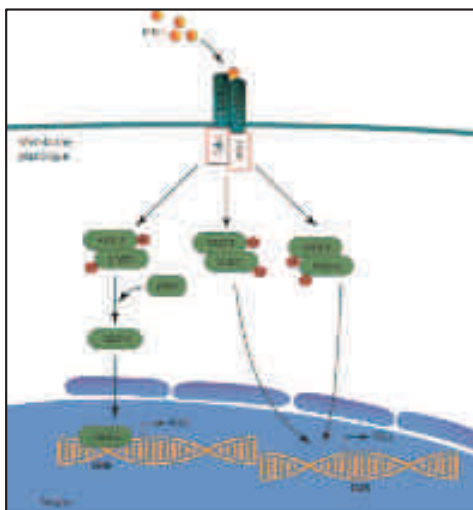
II-1.1. Voies de signalisation déclenchées par l'activation d'IFNAR

II-1.1.1. Voie canonique

La liaison des IFN I à leur récepteur active les kinases qui lui sont associées : **JAK1** de la famille des JAKs (pour *Janus activated kinases*), associée à IFNAR2, et **Tyk2** (pour *Tyrosine kinase 2*) associée à IFNAR 1. Ces dernières vont ensuite être à l'origine de la phosphorylation du récepteur et du recrutement consécutif de protéines **STATs** (pour *Signal Transducers and Activators of Transcription*) qui vont former l'**hétérodimère STAT1 - STAT2**. Ce dernier forme un complexe appelé **ISGF3** (pour *Interferon-stimulated gene factor 3*) suite à la liaison de IRF9 (**Figure 3**).

Ce complexe est ensuite transloqué dans le noyau, et se lie aux éléments de réponse des IFN I, ISRE (pour *IFN-stimulation responsive element*), permettant l'**expression de plus de 1000 gènes induits par l'IFN, ou ISGs** (pour *Interferon stimulated genes*) (Darnell, 1994 ; Schoggins, 2011 ; Schneider, 2014). Ces ISGs codes pour des protéines possédant des **rôles très variés**, tels que la détection de pathogènes, une action anti-virale, la modulation de la réponse immunitaire, l'attraction et l'adhésion cellulaire ou encore l'induction de l'apoptose. Quelques exemples sont cités dans le tableau ci-contre (**Tableau 2**).

FIGURE 3 : Voies canonique et non-canonique des IFN I



Suite à la liaison des IFN I à leur récepteur IFNAR, s'ensuit l'activation des kinases Jak1 et Tyk2 qui conduisent au recrutement et à la formation des complexes STAT. Dans le cas de la voie canonique, un hétérodimère STAT1/STAT2 se forme, conduit à la production d'ISGF3 suite à la liaison avec IRF9, qui se fixera ensuite sur l'élément de réponse ISRE, permettant l'expression de nombreux ISGs. Dans le cas de voies non canoniques, des homodimères STAT (STAT1 ou STAT3) se formeront puis iront se fixer sur l'élément de réponse GAS, conduisant là encore à l'expression d'ISGs.

Abréviations : **GAS**, *Gamma-activated sequence* ; **IFN**, *Interferon* ; **IFNAR**, *Interferon- α/β receptor* ; **ISRE**, *Interferon-stimulated response element* ; **IRF9**, *Interferon regulatory factor 9* ; **ISGF3**, *Interferon-stimulated gene factor 3* ; **JAK1**, *Janus Kinase 1* ; **STAT**, *signal transducer and activator of transcription* ; **Tyk2**, *Tyrosine Kinase 2*.

TABLEAU 2 : Exemples d'ISGs et leurs fonctions

CATEGORIES ISGs	EXEMPLES	FONCTION
Détection de pathogènes et défense de l'hôte	PKR / EIF2AK2	Sérine/thréonine kinase activant EIF2 α responsable de l'inhibition de la synthèse de protéines
	OAS1	Conduit à l'activation de la RnaseL capable de dégrader l'ARN viral et donc de contrecarrer la réplication virale
	Viperine / RSAD2	Blocage du relargage de particules virales
	Tetherine/ CD317	Empêche la libération des particules virales
	IRF7	Augmente la production d'IFN I
	ISG15	Prolifération des cellules NK et amplification de la réponse IFN
Angiogénèse	VEGF	Induit l'angiogénèse
Attraction et adhésion cellulaire	ICAM1	Permet le relargage des LB de la zone marginale et promeut les interactions LB/LT
	CCL5	Attire les LT et monocytes au site d'infection, empêche la réplication en cas d'infection par HIV
Réponse immunitaire et modulation	MxA et B	Bloque la réplication virale et induit l'apoptose
	CMH I et II	Présentation antigénique, favorisant la réponse T cytotoxique dans le cas d'une infection par un pathogène intracellulaire / Induit la réponse adaptative
	IRF1/5/7	Permettent la transcription de cytokines pro-inflammatoires
	SOCS	Régulateur négatif de la voie des IFN I
	USP18	Régulateur négatif de la voie des IFN I
Apoptose	CASP4/8	Permet l'activation de la caspase 1
	Fas/CD95	Inducteur de la mort cellulaire par apoptose

Abréviations : **ARN**, Acide ribonucléique ; **CASP**, Caspase apoptosis-related cysteine protease ; **CMH**, Complexe majeur d'histocompatibilité ; **EIF2A**, Eukaryotic translation initiation factor 2a ; **ICAM1**, Intracellular adhesion molecule 1 ; **IFN**, Interferon ; **IRF**, Interferon regulatory factor ; **ISG15**, Ubiquitin-like modifier ISG15 ; **LB**, Lymphocyte B ; **LT**, Lymphocyte T ; **MxA**, Myxovirus resistance ; **NK**, Natural killer ; **OAS1**, 2'5' oligoadenylate synthetase 1 ; **PKR**, Protein kinase, IFN-inducible dsRNA-activated ; **RSAD2**, Radical s-adenosyl methionine domain-containing protein 2 ; **SOCS**, Suppressor of cytokine signaling ; **Tetherin**, ou **BST2**, bone marrow stromal antigen 2 ; **USP18**, Ubiquitin specific protease 18 ; **VEGF**, Vascular endothelial growth factor ; **Viperin**, Virus inhibitory protein endoplasmic reticulum-associated IFN inducible.

II-1.1.2. Autres voies induites par les IFN I

Outre l'hétérodimère STAT1/STAT2, les protéines STAT sont capables de former des **homodimères**, comme c'est par exemple le cas pour **STAT1** et **STAT3**. Ces deux complexes homodimériques (STAT1/STAT1 et STAT3/STAT3) sont transloqués dans le noyau mais se fixent sur une séquence dite « GAS » (pour *gamma-activated sequence*) à la place de l'élément de réponse ISRE. De la même façon, ils vont permettre l'expression d'ISGs, et contribuer à la mise en place d'une réponse inflammatoire (Figure 3) (Schneider, 2014).

D'autres voies alternatives peuvent finalement aussi être activées par l'IFN I, à savoir la voie des **MAPK** ou **NF- κ B**.

II-1.2. Production constitutive d'IFN I

On pourrait penser qu'étant donné leur fort potentiel antiviral, les IFN I ne seraient synthétisés que suite à des stimuli tels que ceux produits lors d'infections. Cependant, il a été montré que la production des IFN I serait aussi induite de façon constitutive.

II-1.2.1. IFN I et cellules souches hématopoïétiques (HSCs)

En effet, **une production constitutive d'IFN I serait nécessaire à la maintenance et la mobilisation des HSCs** (pour *Hematopoietic stem cells*, cellules souches hématopoïétiques). Les IFN I, et notamment l'IFN α , induiraient la **prolifération des HSCs quiescentes**. Les IFN I seraient donc responsables de la régulation de l'expansion des cellules hématopoïétiques. De plus, des souris IFNAR KO (pour *Knock-out*) présentent un nombre total de HSCs diminué par rapport à des souris contrôles, impliquant donc les IFN I dans leur maintenance (Esser, 2009). Kim et collaborateurs ont pu observer qu'un traitement des HSCs avec de l'IFN α permettait, dans le cas de transfert de moelle osseuse, une amélioration de la greffe de ces HSCs. Ils purent en outre mettre en évidence l'implication de la voie IFN α /Jak/Stat dans le développement, la maturation et le maintien des HSCs embryonnaires (Kim, 2016 ; Diamond, 2011). Une autre équipe a de la même façon souligné le fait qu'en plus d'être responsable de la prolifération des HSCs, **l'IFN I était régulé par un ISG, l'IRF2, permettant alors le maintien de la quiescence des HSCs** (Sato, 2009).

II-1.2.2. IFN I et différenciation des macrophages

De plus, l'IFN β serait **nécessaire à la différenciation des macrophages**, sur lesquels il exercerait un effet inhibiteur. Il a été démontré que les IFN α/β diminueraient le nombre de récepteurs au CFS-1 (pour *colony stimulating factor 1*) (Hamilton, 1996). Le récepteur au CFS-1 (pour *Colony stimulating factor 1 receptor*, CFS-1R) fait partie de la famille des récepteurs aux facteurs de croissance. Il régule la différenciation, la survie et la migration des monocytes/macrophages et de leurs précurseurs (Hume, 2012). D'autre part, **l'IFN β serait impliqué dans le contrôle de l'homéostasie osseuse**. En effet, induit par RANKL (pour *Receptor activator of NF- κ B ligand*) au cours de la génération d'ostéoclastes, un sous-type de macrophages impliqué dans la résorption osseuse, il inhiberait la différenciation et la prolifération de ces cellules en interférant avec l'expression du facteur de transcription c-Fos induite par RANKL (Hamilton, 1996 ; Takayanagi, 2002). Les souris IFNAR1 KO présenteraient ainsi de légers signes d'ostéoporose en raison d'une présence excessive d'ostéoclastes, dont la production n'est plus inhibée par l'expression d'IFN β (Takayanagi, 2002).

Dans les cas cités ci-dessus, l'IFN β est produit via la voie JNK activant le facteur de transcription AP1, (facteur de transcription dimérique, composé de c-Jun et c-Fos) ou des protéines ATF (pour *Activating transcription factor*) (Karin, 1997). Ce mécanisme se distingue de la voie mettant en jeu les facteurs IRF3/IRF7/NF- κ B, qui engendre la production d'IFN β via une activation liée à la présence d'agents pathogènes. En effet, Hata et collègues ont montré que la délétion de IRF3 permet tout de même une expression constitutive d'IFN β (Hata, 2001), qui serait dépendante des facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B (Gough, 2013).

Outre son rôle dans l'homéostasie osseuse, **l'IFN β serait produit par les DCs** (pour *cellules dendritiques*) **et les macrophages indépendamment de la présence de pathogènes**, via une stimulation bactérienne, la plus importante stimulation étant produite par *Lactobacillus acidophilus*, bactérie commensale de la flore intestinale. Cette fois encore cette production serait indépendante d'IRF3/7, et dans ce cas nécessiterait la molécule adaptatrice MyD88 conduisant à l'activation des voies Syk et PI3K (Weiss, 2011).

Ceci impliquerait donc une **production physiologique basale d'IFN I** jouant un rôle dans la **maintenance d'une homéostasie cellulaire**, mais permettant aussi de mobiliser rapidement les éléments responsables de l'action antimicrobienne, et donc de conduire à une réponse immunitaire innée et adaptative rapide et efficace. Il a en effet été montré qu'un déficit de la production constitutive d'IFN I résulterait en une diminution de l'expression de protéines régulant elles-mêmes l'expression de cytokines nécessaires à la mise en place d'une réponse efficace contre les agents pathogènes. De plus, ce déficit d'IFN I conduit en un remodelage osseux aberrant et une perte de l'homéostasie du compartiment médullaire des cellules souches (Gough, 2013).

II-1.3. Mécanismes anti-viraux

L'action anti-virale des IFN I est médiée par l'action combinée des effecteurs anti-viraux codés par les ISGs (**voir Tableau 2**). De très nombreux ISGs sont induits afin de répondre efficacement en cas d'infection virale. Pour ce faire, ces ISGs auront des **rôles complémentaires** et agiront tant pour **empêcher l'adhésion et la fusion de la capsid virale** avec la membrane plasmique, médiant **l'apoptose de particules virale**, ou encore pour **inhiber le cycle de réplication virale** (DeVeer, 2001).

Parmi ces protéines impliquées dans la mise en place des mécanismes anti-viraux, on peut citer PKR (pour *Protein kinase, IFN-inducible dsRNA-activated*), OAS (pour *2'5' oligoadenylate synthetase*), et les protéines Mx (pour *Myxovirus resistance*). OAS, après activation, va être en mesure de contribuer à la dégradation de l'ARN viral, tandis que PKR inhibera la traduction de l'ARN messager viral. Les protéines Mx sont quant à elles parmi les mieux caractérisés des ISGs. Il s'agit de GTPases dont le

mécanisme d'action anti-viral passe par l'inhibition de la réplication virale. Nous citerons aussi les molécules du CMH (pour *Complexe majeur d'histocompatibilité*), dont l'induction permettra la présentation antigénique et ainsi l'activation des lymphocytes T (LT) et lymphocytes B (LB). Finalement, outre le fait d'empêcher l'entrée du virus, d'autres molécules (telles que la viperin ou la tetherin, **Tableau 2**) vont empêcher sa sortie et éviter la propagation de l'infection (Samuel, 2001 ; Hervas-Stubbs, 2011 ; Schneider, 2014).

Pour la grande majorité des types cellulaires, **la voie majeure conduisant à la production d'IFN I est secondaire à l'activation de récepteurs cytosoliques reconnaissant des acides nucléiques d'origine virale, ou endogène, et particulièrement de l'ADN (pour Acide désoxyribonucléique) double brin (db)**. Dans la plupart des infections virales, une production précoce d'IFN I est requise afin de limiter au maximum l'initiation de la réplication virale, bien avant que les mécanismes immunitaires cellulaires ne soient efficaces.

En outre, ces mécanismes protecteurs sont rapidement mis en place en réponse à l'exposition à des virus, bactéries, ou champignons, et permettent la stimulation de la réponse immunitaire adaptative impliquant l'activation des LT helper (Th), orchestrant l'activation des LT cytotoxiques, et la réponse humorale (Iwasaki, 2010 ; Kawai, 2009).

II-1.4. Régulation négative de la voie des IFN I

Une régulation négative de cette voie de signalisation paraît donc nécessaire puisqu'**une trop forte sécrétion d'IFN I peut être délétère pour l'organisme**. En effet, elle peut engendrer la sécrétion incontrôlée de cytokines pro-inflammatoires, appelée tempête cytokinique, qui est souvent associée à une inflammation incontrôlée et à une augmentation de la mortalité.

Les mécanismes mis en jeu impliquent, entre autres, une down-régulation de l'expression des sous-unités du récepteur IFNAR, et l'induction de régulateurs négatifs comme les protéines **SOCS** (*Suppressor of cytokines signaling*) ou **USP18** (*Ubiquitin specific protease 18*), ou enfin l'induction de l'expression de **micro-ARNs** (De Weerd, 2012).

Le gène codant pour la sous-unité IFNAR2 peut, de façon aléatoire, générer un **isoforme transmembranaire tronqué** incapable d'induire la moindre cascade de signalisation et inhibant de ce fait les effets des IFN I (De Weerd, 2007). La sous-unité IFNAR1 contient quant à elle un domaine régulateur au niveau C-terminal, pouvant être ubiquitylé et dégradé, si besoin (Kumar, 2004).

Une **boucle de rétro-contrôle négatif** est par ailleurs mise en place et **médiée par les ISGs**. Comme mentionné plus haut, certains ISGs codent pour les protéines **SOCS** (et notamment SOCS1), de puissants régulateurs négatifs, à la fois des IFN I et II. Ces molécules possèdent un domaine central SH2 (pour *Src homology 2*) responsable de la liaison à des protéines partenaires, et notamment des tyrosines kinase, puisque le domaine SH2 reconnaît spécifiquement les phospho-tyrosines. De plus, leur domaine N-terminal KIR (pour *kinase inhibitory region*) est impliqué dans l'inhibition de l'activité kinase des protéines ciblées, et finalement leur domaine C-terminal, SOCS box, est impliqué dans la dégradation ciblée (Fenner, 2006 ; Piganis, 2011). **Ces molécules permettront la fixation de résidus ubiquitine sur les kinases de la voie JAK/STAT, entraînant alors leur adressage au protéasome et leur dégradation.**

SOCS1 permet une boucle de rétrocontrôle négatif en agissant exclusivement sur la sous-unité IFNAR1 du récepteur aux IFN I. En effet, des études ont montré que le croisement de souris KO pour SOCS1 et pour IFNAR1 conduit à la réversion du phénotype inflammatoire observé chez les souris SOCS1 KO, alors que des souris SOCS1 KO croisées avec des souris déficientes pour la sous-unité IFNAR2 ne permettent pas une telle réversion (Fenner, 2006). Cependant, l'inhibition du récepteur ne passerait pas directement par une action sur la sous-unité IFNAR1, mais plutôt par l'interaction avec la protéine associée à cette sous-unité, Tyk2. Elle permettrait en effet la déstabilisation de cette dernière et ainsi l'internalisation de la sous-unité IFNAR1 (Piganis, 2011).

USP18, quant à elle, se lie à la sous-unité IFNAR2 et occasionne un **changement conformationnel du récepteur**, le rendant moins stable. De plus, **ISG15**, un autre gène induit par les IFN I, va permettre par liaison à IFNAR2, une réaction appelée **ISGylation**. Cette dernière est responsable de la diminution de l'ubiquitination de protéines et ainsi, d'une diminution de la dégradation et du recyclage de ces protéines cibles. Ceci conduit donc à une activation soutenue des protéines cibles de ISG15 (pour *Ubiquitin like modifier ISG15*). **USP18 va conduire à la régulation négative de IFNAR en inhibant ISG15, permettant donc un recyclage du récepteur** (Villarroya-Beltri, 2017 ; Malakhov, 2002).

Enfin, outre la dégradation du récepteur ou l'action des protéines SOCS, la régulation négative des IFN I passe par **l'expression de micro-ARNs** (miARN). Les miARN sont de petites molécules d'ARN non-codants capables de se fixer sur des ARN messagers et d'empêcher l'expression consécutive du gène cible. En effet, ils conduisent à la dégradation ou à l'inhibition de ces ARN messagers. L'expression de STAT1, protéine impliquée dans la cascade de signalisation en aval du récepteur IFNAR, est finement régulée par miR-146a, tandis que miR-155 supprimerait l'expression des composants de la voie IFNAR-JAK-STAT dans les LT CD8+ (tels que SOCS1) (Forster, 2015).

III- DETECTION D'AGENTS PATHOGENES PAR LE SYSTEME IMMUNITAIRE : LES PRRs

Ces récepteurs capables de détecter les agents pathogènes, les PRRs, permettent d'initier une réponse rapide après détection de signaux de danger (Kawai, 2009).

Les **PAMPs**, outre le fait d'être partagées au sein d'une même classe de pathogènes, sont des composants moléculaires essentiels pour la survie de ces derniers et incluent des lipides, des lipoprotéines, protéines, glycanes ou acides nucléiques (Ma, 2016). **Ils sont exprimés par de nombreux microorganismes mais absents de l'hôte, permettant ainsi la mise en place de signaux de danger qui vont alerter le système immunitaire de la présence de pathogènes et activer l'immunité innée (Tang, 2012).**

Les PRRs présentent l'avantage d'avoir un répertoire très variée leur permettant de reconnaître un large panel de microbes. De plus, un type de PAMPs pourra être reconnu par plusieurs PRRs. Ceci permettra ainsi la **mise en place rapide d'une puissante réponse inflammatoire, c'est-à-dire la production de cytokines pro-inflammatoires et d'IFN I (ou I et III), mais aussi l'activation de mécanismes de défense tels que la phagocytose, l'autophagie et autres types de mort cellulaire (Brubaker, 2015 ; Iwasaki, 2004).**

De nombreux progrès ont été faits en matière de compréhension des mécanismes de détection de l'ARN viral, mais beaucoup reste à découvrir sur la détection de l'ADN microbien. Une détection rapide d'agents pathogènes, d'ADN étranger ou d'ADN du soi est essentielle pour la mise en place d'une défense appropriée contre l'infection et aura aussi des conséquences sur le développement d'une autoimmunité. Ainsi, mieux évaluer les mécanismes mis en jeu permettrait aussi de mieux comprendre la réponse immunitaire contre les pathogènes et d'élucider les causes de pathologies autoimmunes/autoinflammatoires.

Durant ces 10 dernières années, de nombreux **senseurs d'ADN** ont été étudiés et mieux caractérisés, tels que IFI16 (pour *IFN- γ -inducible protein 16*), un membre de la famille PYHIN (pour *Pyrin and HIN domain family*) (Shattgen, 2011). On peut également citer DDX41 (pour *DEAD-Box Helicase 41*), membre de la famille des hélicases DEDXc, un senseur pour le c-di-AMP (pour *cyclic di-adenosine monophosphate*), c-di-GMP (pour *cyclic di-guanosine monophosphate*) ou l'ADNdb. Néanmoins son rôle en tant qu'hélicase reste mal connu (Marinho, 2017). Finalement, l'ADN cytoplasmique peut aussi activer la signalisation de l'inflammasome dépendant d'AIM2 (pour *Absent in Melanoma 2*).

Ainsi, aujourd'hui, plus de 10 senseurs de l'ADN cytosoliques ont été décrits (Paludan, 2013).

Tous ces PRRs cités ci-dessus sont localisés à la surface des cellules, dans le cytoplasme ou dans des compartiments cellulaires cytosoliques spécifiques (endosomes, lysosomes). Ils sont divisés en 5 familles :

Les Toll-like Receptors (TLRs), les Nucleotide oligomerisation domain (NOD) - like Receptors (NLRs), les RIG-I-like Receptors (RLRs) et les C-type lectin receptors (CLRs) et finalement, les ALRs (pour *AIM2-like receptors*) (Brubaker, 2015).

III-1. Les C-type lectin receptors (CLRs)

Alors qu'ils sont **cruciaux dans l'établissement d'une réponse immunitaire suite à une infection fongique**, les CLRs restent les moins étudiés des PRRs concernant les infections virales ou bactériennes. Parmi eux, on peut citer **Dectin-1 et 2**, **DC-SIGN** (pour *Dendritic cell-specific ICAM3-grabbing nonintegrin*), ou encore **DNGR-1** (pour *DC NK lectin group receptor-1*) (**Tableau 3**).

Ils forment une famille relativement hétérogène de récepteurs, présents à la fois sous forme **soluble** (opsonines), ou **membranaire**, mais possédant tous un domaine appelé CTLD (pour *C-type lectin-like domain*) ayant une structure caractéristique en double-boucle (Zelensky, 2005). Les CLRs solubles (comme par exemple les collectines) agissent simplement comme des opsonines, c'est-à-dire comme des molécules permettant de recouvrir des agents microbiens ou des cellules infectées et d'entraîner leur phagocytose par les macrophages, et donc n'induisant pas de cascade de signalisation (Hoving, 2014). Nous ne développerons ici que les CLRs membranaires.

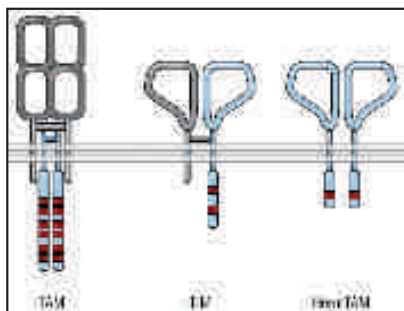
TABLEAU 3 : Les CLR et leurs ligands

C-type Lectin Receptors (CLRs)			
CLRs	Localisation	Ligand	Origine du ligand
Dectin-1 / CLEC6A	Membrane plasmique	β -1,3 glucane	Champignons / Mycobactéries
Dectin-2 / CLEC7A	Membrane plasmique	Mannose / α -mannane	Champignons / Mycobactéries
DC-SIGN / CD209	Membrane plasmique	Mannose / Fucose	Champignons / Mycobactéries / Virus (Dengue, HIV, Cytomégalo virus..)/ Parasites (<i>Schistosoma mansoni</i>)
DNGR-1 / CLEC9a	Membrane plasmique	Formes filamenteuses d'actine	Cellules nécrotiques
Mincle / CLEC4E	Membrane plasmique	α -mannose / Glycolipides	Champignons / Mycobactéries
BDCA-2	Membrane plasmique	Mannose / Fucose	Inconnu
DCIR / CLEC4A	Membrane plasmique / Endosome	Mannose / Fucose	Virus (HIV)
SIGNR3 / CD209d	Membrane plasmique	Mannose / Fucose	Mycobactéries
LOX-1 / OLR1	Membrane plasmique	LDL oxydées / Lipoprotéines modifiées	Endogènes / Bactéries
CLEC-1	Membrane plasmique	Inconnu	Inconnu
CLEC-2	Membrane plasmique		Podoplanine endogène / Virus (HIV) / Rhodocytine (protéine du venin de serpent)
CLEC4D	Membrane plasmique		Inconnu
CLEC12B	Membrane plasmique		
DCAR / CLEC4B	Membrane plasmique		
MICL / CLEC12A	Membrane plasmique		
MDL-1 / CLEC5A	Membrane plasmique		Virus (Dengue)

Abréviations : **CLECxY**, *C-type lectin domain family x, member Y* ; **DC-SIGN**, *Dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin* ; **HIV**, *Human immunodeficiency virus* ; **DNGR-1**, *DC NK lectin group receptor-1* ; Mincle, *Macrophage-inducible c-type lectin* ; **BDCA-2**, *Blood dendritic cell antigen 2* ; **DCIR**, *Dendritic cell immunoreceptor* ; **LOX-1**, *Lectin-like oxidized-ldl receptor 1* ; **LDL**, *Low density lipoprotein* ; **MICL**, *Myeloid inhibitory c-type lectin-like receptor* ; **MDL-1**, *Myeloid dap12-associating lectin 1*.

Les CLR membranaires possèdent ainsi un domaine CTLD extracellulaire, de même qu'une extrémité intracellulaire particulière porteuse d'un domaine ITAM (pour *Immunoreceptor tyrosine based activation motif*) modifié appelé hemITAM. Ce domaine est particulier puisqu'il ne contient qu'un module de résidus tyrosine, contrairement au motif ITAM, formé d'un tandem de deux modules de résidus tyrosine séparés par 6 à 8 acides aminés (**Figure 4**) (Bauer, 2017).

FIGURE 4 : Structures des motifs ITAM-ITIM et HemITAM



Les motifs de base retrouvés au niveau de nombreux récepteurs et permettant la transduction du signal incluent notamment des motifs ITAM (pour *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) ou ITIM (pour *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif*) engendrant au contraire un signal inhibiteur, et finalement, un motif appelé HemITAM (pour *Hemi-Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) (Bauer, 2017).

Les mieux caractérisés des CLR sont sans doute Dectin-1 (codé par le gène *CLEC7A* chez l'Homme et *Clec7a* chez la souris) et Dectin-2 (codé par *CLEC6A* chez l'Homme; *Clec4n* chez la souris). Dectin-1 est majoritairement exprimé dans les cellules dendritiques, les monocytes, les macrophages et les neutrophiles, alors que Dectin-2 ne l'est que dans les cellules dendritiques, et en particulier dans les cellules de Langerhans (Kanazawa, 2003).

Dectin-1 joue un rôle important dans la défense anti-fongique (Figure 5). Il va en effet permettre d'engendrer une réponse anti-microbienne et inflammatoire via la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS pour *Reactive oxygen species*), la phagocytose de matériel étranger ainsi que la production de cytokines et chimiokines (Goodridge, 2011).

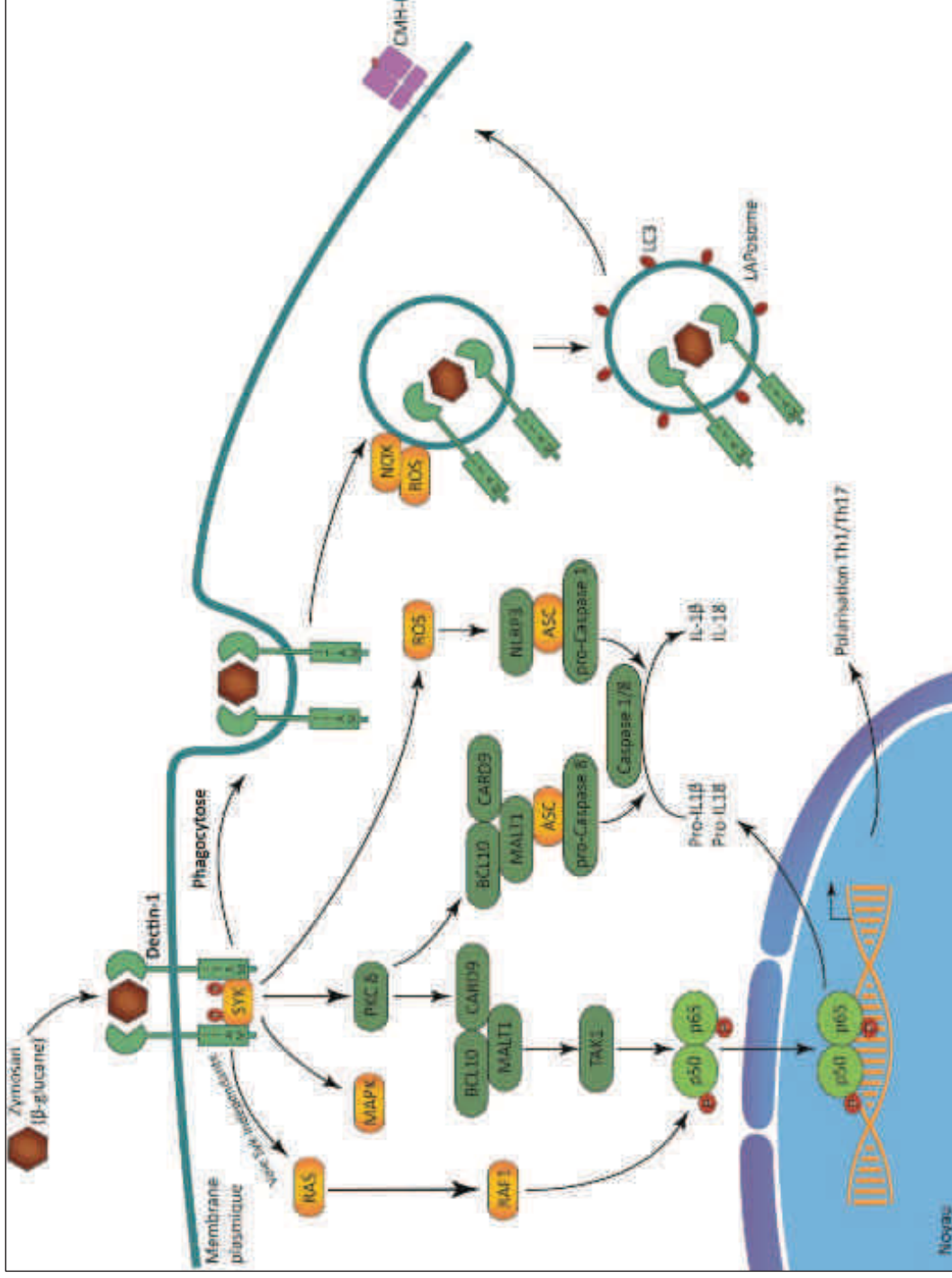
Suite à la liaison avec son ligand, le plus important d'entre eux étant le β -1,3-glucane d'origine fongique, Dectin-1 va se dimériser et, de la même façon que le TLR4, se relocaliser au niveau des radeaux lipidiques pour conduire à l'entrée du MAMP par endocytose (Taylor, 2007).

Dectin-2 (non représenté sur la Figure 5) agira de façon quasi équivalente à Dectin-1. Cependant, ayant une extrémité intracellulaire trop courte pour induire un signal, Dectin-2 va se lier à la chaîne γ du récepteur Fc, possédant un motif ITAM qui lui permettra d'activer la cascade de signalisation (Goodridge, 2011).

Cette famille de récepteurs va aussi reconnaître, outre les champignons, **les IgA** (pour *Immunoglobuline A*) **sécrétées, les mucines et les β -glucanes** d'autres microorganismes, tels que les **bactéries** *Listeria* et *Mycobacterium* (Hoving, 2014).

Ceci va permettre d'initier une cascade de signalisation conduisant à une réponse inflammatoire activée par la phosphorylation des domaines hemITAM par les kinases de la famille Src (SFKs pour *Src family kinases*) à commencer par le **recrutement de la kinase Syk** (pour *Spleen tyrosine kinase*). A son tour, **Syk va activer la protéine kinase C δ** (PKC δ) qui conduit à la formation d'un complexe associant les protéines CARD9 (pour *Caspase Recruitment Domain Family Member 9*), Bcl10 (pour *B cell*

Figure 5 : Voies de signalisation des CLR



Suite à la liaison avec son ligand (β-1,3-glucane), Dectin-1 va recruter la kinase Syk au niveau du motif hemITAM. Syk va permettre l'activation de la voie des MAPKs mais aussi de la PKC δ, ce qui conduit à la formation d'un complexe associant CARD9, Bcl10 et Malt1 responsable de l'activation de la voie canonique de NF-κB, à l'origine de l'activation de l'inflammasome et de la production de cytokines pro-inflammatoires. Ce complexe CARD9/Bcl10/Malt1 peut aussi s'associer à la protéine adaptatrice ASC et conduire à l'activation des caspases 1 et 8 qui pourront cliver les pro-interleukines IL-1β et IL-18. Toujours de façon Syk-dépendante, Dectin-1 peut conduire à la formation de ROS, à la fois responsable de l'activation de l'inflammasome ainsi que du recrutement de la protéine LC3 au phagosome, contribuant à la fois la dégradation sélective de matériel mais aussi le chargement du CMH II. Enfin, Dectin-1 peut aussi activer des voies Syk-indépendantes, telles que la voie Ras/Raf1, permettant d'activer NF-κB et augmentant ainsi l'activité transcriptionnelle de p65, conduisant à la polarisation des LTh en Th1 et 17.

Abréviations : **ASC**, Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD ; **Bcl10**, B cell lymphoma 10 ; **Card9**, Caspase Recruitment Domain Family Member 9 ; **CMH II**, Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II ; **Dectin-1** ou **CLEC7A**, C-type lectin domain family 7, member A ; **LAPosome**, LC3-associated phagosome ; **LC3**, Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 ; **Malt1**, Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1 ; **MAPK**, Mitogen-activated protein ; **NLRP3**, Nod-like receptor P3 ; **NOX**, NADPH oxidase ; **Raf1**, V-RAF-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1 ; **ROS**, Reactive oxygen species ; **Syk**, Spleen tyrosine kinase ; **Tak1**, Transforming growth factor beta-activated kinase 1.

lymphoma 10) et Malt1 (pour *Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1*) (Xu, 2009).

Ce complexe va finalement conduire à l'activation de TAK1 (pour *Transforming growth factor beta-activated kinase 1*) puis à celle de la voie canonique de NF-κB, et des MAPK, à l'origine de la maturation des cellules dendritiques, de l'activation de l'inflammasome, de la production de cytokines, et également de l'activation de la phagocytose (Figure 5) (Strasser, 2012).

CARD9, impliquée dans le complexe précédemment mentionné, joue en particulier un rôle crucial en cas d'atteinte bactérienne puisqu'il a été observé chez des souris CARD9 KO une réplication bactérienne incontrôlée conduisant rapidement à une inflammation excessive et une mortalité prématurée des animaux (Dorhoi, 2010).

D'autre part, Dectin-1 est aussi à l'origine du recrutement de la protéine LC3 (pour *Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*) au phagosome : LC3 est une protéine soluble recrutée au niveau de la membrane de l'autophagosome, à l'origine de la dégradation sélective de matériel/organelles (processus nommé autophagie) grâce à l'action d'hydrolases lysosomales (Ma, 2012).

Ma et collaborateur ont en effet observé que Dectin-1 contrôle la maturation du phagosome et le chargement du CMH II (pour *Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II*) par recrutement de la protéine LC3 au phagosome. Ce processus nécessiterait l'activation de Syk et la production de ROS par la NADPH oxydase et conduirait à la formation d'un LAPosome (pour *LC3 associated phagosome*) (Figure 5) (Ma, 2014).

Finalement, ces récepteurs sont responsables de la mise en place de l'immunité adaptative, de par leur capacité à diriger la différenciation des LTh vers un phénotype Th1 et Th17 (Gringhuis, 2009).

En effet, Dectin-1 peut aussi activer d'autres voies comme Raf-1, indépendamment de Syk, permettant d'activer NF-κB et augmentant ainsi l'activité transcriptionnelle de p65 pour permettre la polarisation des LTh en Th1 et 17 en cas de stimulation par *Candida albicans* (Gringhuis, 2007). Cette différenciation est en effet liée à la production d'IL6, d'IL23 induite par NF-κB, mais aussi d'IL-1β puisque l'expression de la pro-IL-1β dépend de la voie NF-κB, alors que le clivage nécessaire à son activité résulte de l'action de la caspase 8 en complexe avec CARD9, Bcl10 et Malt1 (Figure 5) (LeibundGut, 2009 ; Strasser, 2012).

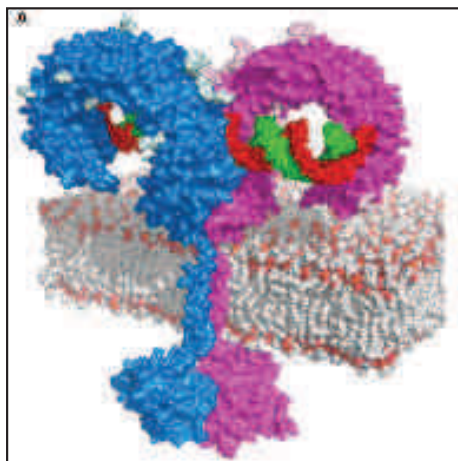
Finalement, outre les champignons, certains CLR (comme DNGR-1), pourraient avoir un rôle protecteur contre les infections virales en permettant la cross-présentation d'antigènes par les DCs aux LT CD8 (Zelenay, 2012 ; Hoving, 2014).

III-2. Les Toll-like receptors (TLRs)

Les TLRs sont des protéines transmembranaires, qui une fois liées à leur ligand, **forment des dimères** (homodimères, ou hétérodimères tels que ceux formés par les TLRs 1/2 ou TLRs 2/6), situés à la surface de la membrane plasmique ou endosomale.

Ces glycoprotéines sont constituées d'un domaine extracellulaire impliqué dans la reconnaissance des MAMPs. Situé en position N-terminale, ce domaine est appelé **LRRs** (pour *Leucine Rich Repeat*), et contient 20 à 30 résidus non chargés, la plupart hydrophobes, formant un brin β et une hélice α . Ces domaines LRRs vont conférer à la partie N-terminale une structure en fer à cheval, et leur variabilité entre les différents TLRs est responsable de la spécificité du récepteur pour l'un ou l'autre ligand (**Figure 6**) (Botos, 2011).

FIGURE 6 : Modélisation structurelle des TLRs (exemple du TLR3, Botos, 2011)



Modélisation de la structure de l'homodimère formé par le TLR3 (en bleu et violet) complexé avec de l'ARNdb (en rouge et vert).

De plus, ils possèdent un domaine intracellulaire appelé **TIR** (pour *Toll/IL-1R*), homologue du domaine C-terminal du récepteur de l'IL-1, permettant d'initier la cascade de signalisation à l'origine de la transcription de gènes impliqués dans la défense anti-microbienne et l'inflammation (Kawai, 2010).

Les TLRs sont au nombre de 13 chez les mammifères (toutes espèces confondues) et bien que la plupart d'entre eux (TLRs 1 à 9) soient conservés entre l'Homme et la souris, il apparaît que d'autres ne sont pas fonctionnels chez l'une ou l'autre espèce. Par exemple, le TLR10 est non fonctionnel chez

la souris suite à une insertion rétrovirale dans le gène codant ce TLR, tandis que les TLRs 11, 12 et 13 n'existent pas chez l'Homme (**Tableau 4**).

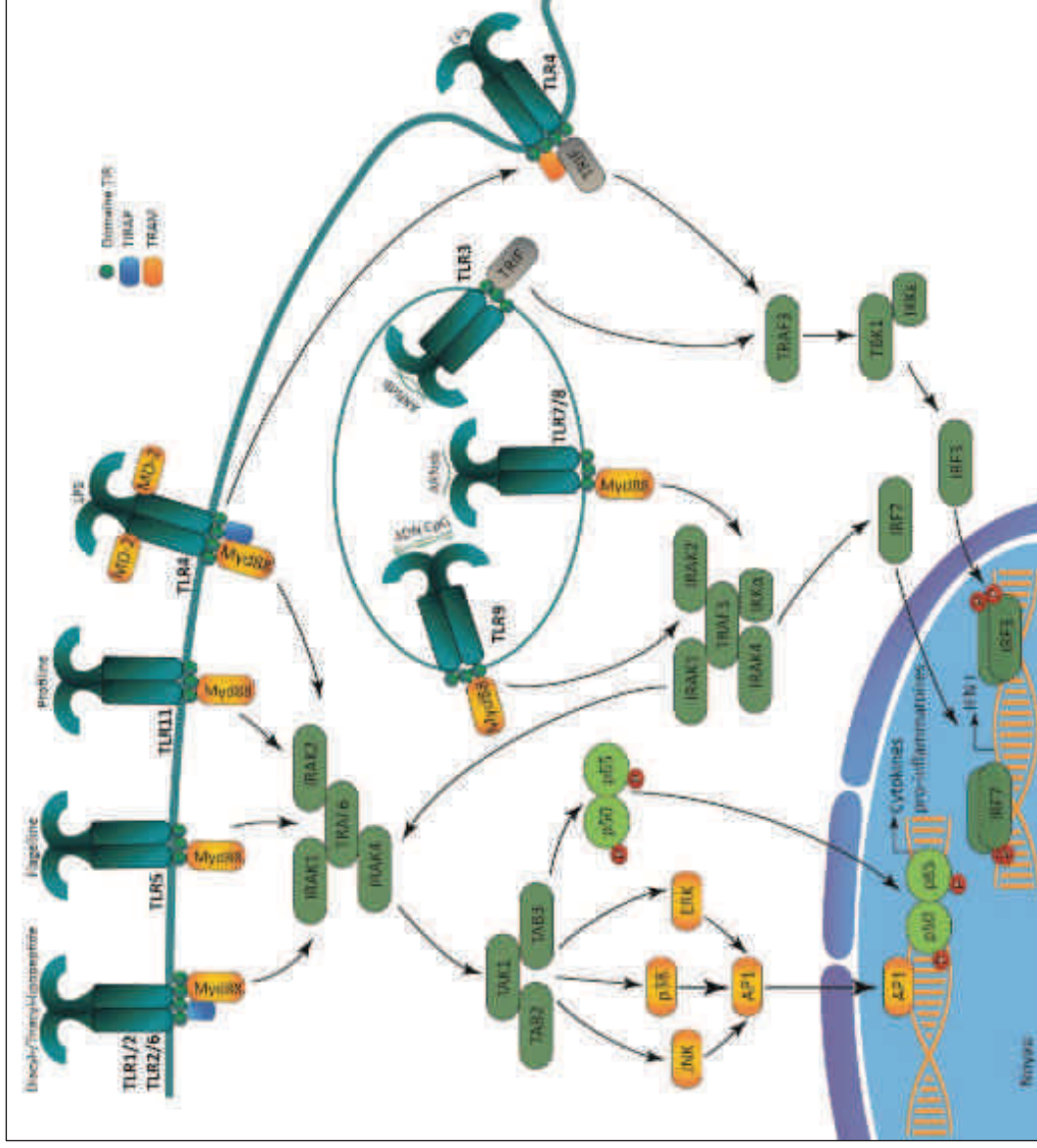
TABLEAU 4 : Les TLRs et leurs ligands

Toll-like Receptors (TLRs)			
TLR	Localisation	Ligand	Origine du ligand
TLR 1/2	Membrane plasmique	Triacyl lipopeptide	Bactéries / Mycobactéries
TLR 2/6	Membrane plasmique	Diacyl lipopeptide	Bactéries (mycoplasmes)
TLR 3	Compartiments intracellulaires (endosome)	ARNdb	Virus (<i>Influenza</i>)
TLR 4	Membrane plasmique	Lipopolsaccharide	Bactéries Gram -
		Glycoprotéines d'enveloppe	Virus (RSV)
TLR 5	Membrane plasmique	Flagelline	Bactéries flagellées
TLR 7	Compartiments intracellulaires (endosome)	ARNsb	Virus (VSV)
TLR 8	Compartiments intracellulaires (endosome)	ARNsb	Virus (VSV)
TLR 9	Compartiments intracellulaires (endosome)	Motifs non-méthylés de l'ADN (CpG) / Hémozoïne	Bactéries Gram - / Virus (HSV) / Protozoaires (<i>P. falciparum</i>)
TLR 10 (gène murin non fonctionnel)	Membrane plasmique	Inconnu	/
TLR 11 (pseudogène non fonctionnel chez l'Homme)	Compartiments intracellulaires (endosome)	Profiline / composants de bactéries uropathogéniques	Protozoaires (<i>T. gondii</i>) / Bactéries (<i>E. coli</i>)
TLR 12 (gène absent chez l'Homme)	Compartiments intracellulaires (endosome)	Profiline	Protozoaires (<i>T. gondii</i>)
TLR 13 (gène absent chez l'Homme)	Compartiments intracellulaires (endosome)	ARN ribosomal	Bactéries (streptocoques)

Abréviations : **ARNdb**, Acide ribonucléique double brin ; **sb**, simple brin ; **ADN**, Acide désoxyribonucléique ; **CpG**, Cytosine-phosphate-Guanine.

Les TLRs peuvent être divisés en sous-familles, classées selon différents critères, tels que le type de PAMPs reconnu. Ainsi, les TLRs 1/2 et 2/6 reconnaissent des lipides tandis que les TLRs 3/7/8 et 9 reconnaissent des acides nucléiques (Akira, 2006). D'autre part, ils possèdent une distribution cellulaire différente puisque les TLRs 1/2/4/5/6 et 10 sont exprimés à la surface de la cellule, et de ce fait sont principalement impliqués dans la reconnaissance de motifs bactériens, tandis que les TLRs 3/7/8 et 9 sont localisés dans des compartiments intracellulaires tels que les endosomes ou endosomes-lysosomes (endosomes tardifs) et ainsi, seront spécialisés dans la reconnaissance d'acides nucléiques (Mogensen, 2009). Néanmoins, cette localisation ne sera effective qu'après stimulation engendrée par un PAMP, puisqu'à l'état basal ces TLRs intracellulaires sont exprimés sur le réticulum endoplasmique (RE) des cellules (Kawai, 2009). Il apparaît par ailleurs que cette

Figure 7 : Voies de signalisation des TLRs



Après reconnaissance de leurs ligands, les TLRs vont s'activer en formant des homo- ou hétéro- dimères. Associés à des protéines adaptatrices telles que MyD88, TRIF, TRAM ou TIRAP, ils vont activer une cascade de signalisation dépendante des molécules adaptatrices utilisées. La voie TIRAP/MyD88 dépendante conduira à la formation et l'activation du complexe IRAK1/2/4/TRAF6, activant à son tour le complexe TAK1/TAB2/3 responsable de l'activation de la voie des MAPKs (JNK, ERK, p38) et de la voie NF-κB. L'activation d'IRF3, à l'origine de la production d'IFN I, sera quant à elle dépendante des molécules TRAM/TRIF activant TRAF3, TBK1 puis finalement IRF3. Enfin, les TLRs 7/8/9 associés uniquement à MyD88, seront eux capables d'activer un complexe IRAK1/2/4/TRAF3/IKKα responsable à la fois de l'activation d'IRF7 mais aussi des voies des MAPKs et NF-κB. Seul le TLR4 est capable de s'associer à la fois avec la molécule TIRAP mais aussi avec TRIF, activant de ce fait toutes les voies sus-mentionnées. Ce TLR est en outre endocytosé suite à son activation par le LPS.

Abréviations : **ADN CpG**, Motifs Cytosine-phosphate-Guanine de l'Acide désoxyribonucléique ; **AP1**, Activator protein 1 ; **ARNdb**, Acide ribonucléique double brin ; **ARNsb**, Acide ribonucléique simple brin ; **ERK**, Extracellular signal-regulated kinase ; **IKKε**, Iκ-B kinase ε ; **IRAK**, Interleukin 1 receptor-associated kinase ; **JNK**, c-jun N-terminal kinases ; **LPS**, Lipopolysaccharide ; **TAB**, TAK1 binding protein 1 ; **TAK1**, TGFβ-activated kinase 1 ; **TIRAP**, TIR domain-containing adaptor protein ; **TRAF**, TNF receptor-associated factor ; **TRIF**, TIR domain-containing adaptor inducing IFNβ.

reconnaissance de motifs microbiens peut être soit directe, comme pour les TLRs 1/2, 3 et 9, qui se lient respectivement aux lipopeptides, ARNdb et motifs CpG (pour *Cytosine-phosphate-guanine*) de l'ADN, ou alors indirecte, comme dans le cas du TLR4, qui reconnaît le lipopolysaccharide (LPS, constituant majeur de la membrane externe des bactéries Gram -) au moyen d'une molécule adaptatrice, MD2 (aussi appelée Ly96 pour *lymphocyte antigen 96*) (Kawai, 2001).

Les TLRs sont exprimés dans la plupart des types cellulaires (macrophages, DCs, LB, fibroblastes, cellules épithéliales...), que ce soit de façon constitutive, ou induite après infection (Iwasaki, 2004).

L'activation et la dimérisation des TLRs permettra le **rapprochement des domaines TIR et l'activation d'une cascade de signalisation, débutant par le recrutement de molécules adaptatrices comme MyD88, TIRAP, TRIF ou TRAM**, selon le(s) TLR(s) impliqués (Botos, 2015). Les TLRs sont en effet capables d'engendrer la transcription de gènes différents en fonction des adaptateurs utilisés. En effet, une activation de NF- κ B et/ou des MAPKs incluant les protéines ERK1/2 (pour *extracellular signal-regulated kinase 1/2*), p38 et JNKs (pour *c-jun N-terminal kinases*) sera le résultat d'une signalisation TIRAP/MyD88-dépendante, tandis que l'activation des IRFs est quasi exclusivement dépendante des molécules TRAM/TRIF (Mogensen, 2009 ; O'Neill, 2007). Le TLR4 est le seul capable d'activer ces 2 voies tandis que les autres TLRs, à l'exception du TLR3, vont interagir uniquement avec MyD88 (Kagan, 2008). Les gènes dont la transcription est activée par les TLRs codent pour des cytokines pro-inflammatoires, des protéines antivirales et antimicrobiennes, et enfin des protéines permettant l'initiation de la réponse immunitaire adaptative (Figure 7).

Le premier PRR à avoir été impliqué dans la détection d'ADN fut le TLR9 (Hemmi, 2000) qui reconnaît des motifs chimiques dont l'ADN du soi est dépourvu, comme par exemple les motifs non-méthylés de l'ADN, appelés CpG de bactéries ou virus.

Spécialisés dans la détection d'acides nucléiques, les TLRs 3 et 7, TLRs endosomaux tout comme le TLR9, reconnaissent respectivement de l'ARN double et simple brin (Mogensen, 2009 ; Kawai, 2009).

Ces TLRs des compartiments intracellulaires vont préférentiellement conduire à une réponse antivirale grâce à la production de cytokines pro inflammatoires via la voie NF- κ B, et d'IFN I, via la voie IRF7 (Figure 7) (O'Neill, 2013). Cette synthèse d'IFN I serait cellule-dépendante, puisque les TLR7 et 9 en particulier, l'induiraient de façon prédominante dans les DCs plasmacytoïdes.

Cette détection d'acides nucléiques peut être problématique dans la mesure où la distinction est difficile entre l'ARN/ADN du soi et étranger. C'est pourquoi leur localisation est restreinte aux compartiments endosomaux, limitant de ce fait la détection d'acides nucléiques du soi, responsables

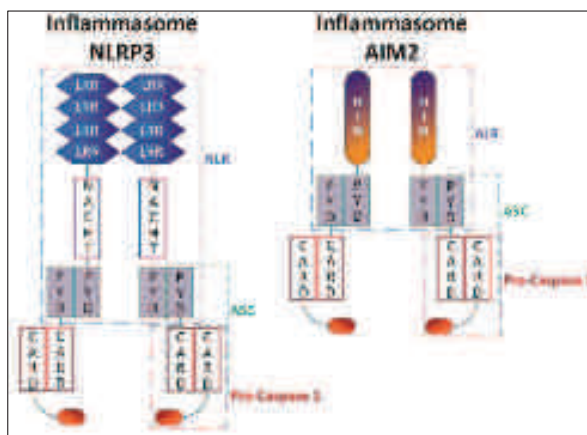
de nombreuses pathologies autoimmunes, et présents en abondance au niveau extracellulaire dans le cas de pathologies telles que le lupus (Barbalat, 2011).

Finalement, le TLR9 est aussi en mesure d'être activé par l'hémozoïne, dérivé de *Plasmodium falciparum*, un pigment apparaissant suite à la dégradation de l'hémoglobine par le parasite. En effet, une fois capté par les cellules phagocytaires, l'hémozoïne s'accumule dans des phagolysosomes où elle sera reconnue par le TLR9, initiant la cascade de signalisation MyD88-dépendante (Coban, 2005).

III-3. Les AIM2-like receptors (ALRs)

La production d'IL-1 β et d'IL-18 est l'une des caractéristiques majeures de l'activation de l'inflammasome, correspondant à des complexes protéiques cytosoliques de haut poids moléculaire, constitués d'un ALR ou d'un NLR, d'une protéine adaptatrice (telle que ASC [Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD]) et d'une cystéine protéase (la pro-caspase 1), et impliqués dans la défense anti-microbienne (Figure 8) (Bauernfeind, 2013 ; Eitel, 2011).

FIGURE 8 : Structure de l'inflammasome, exemples des inflammasomes NLRP3 et AIM2

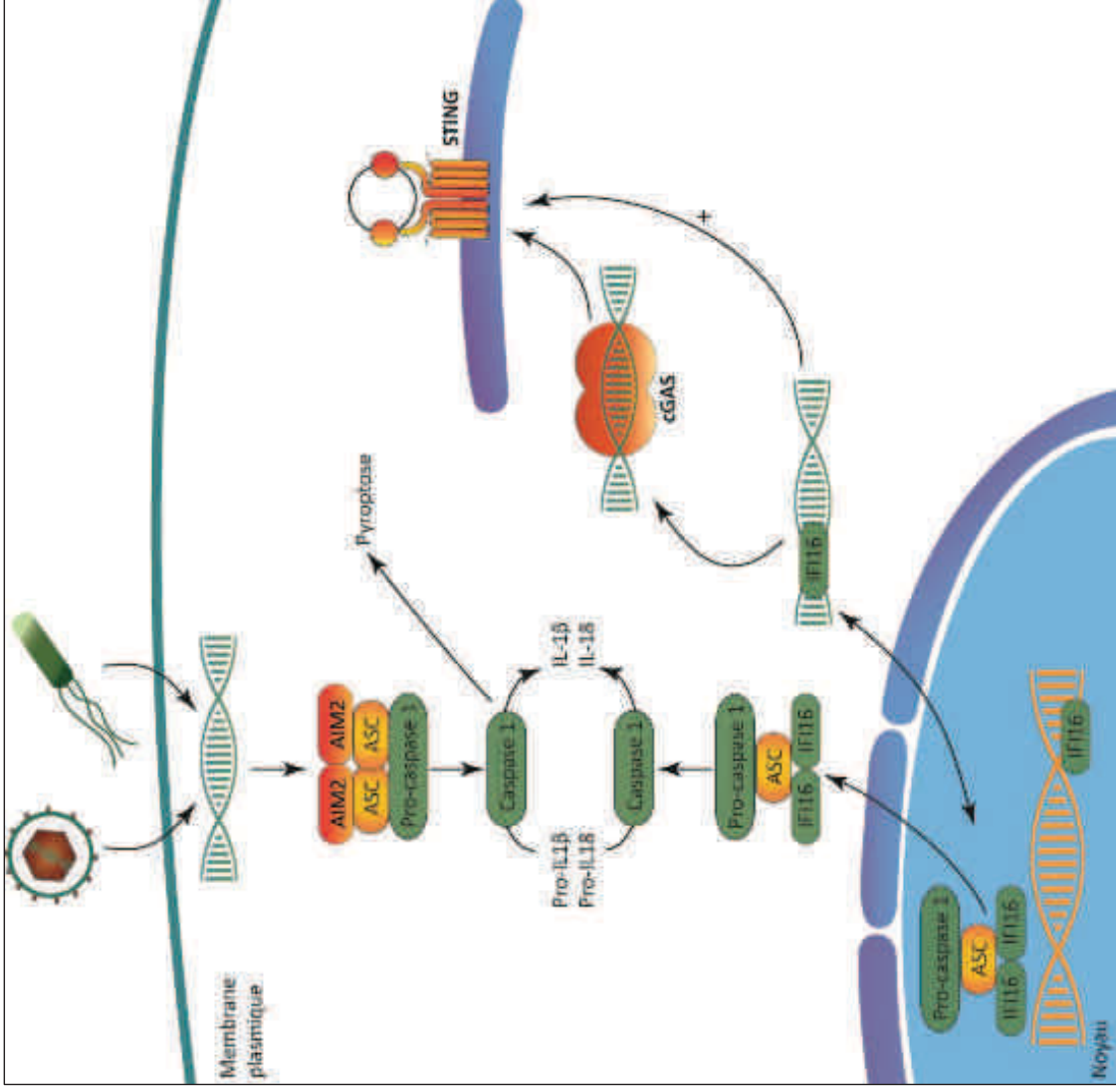


Les inflammasomes sont des complexes protéiques constitués d'un NLR ou d'un ALR, d'une protéine adaptatrice (comme par exemple ASC), et d'une cystéine protéase : la pro-caspase 1. Les ALRs sont constitués d'un domaine carboxy-terminal HIN, et d'un domaine N-terminal PYD. Les NLRs (cf III-1.4) quant à eux, sont constitués d'une structure tripartite avec un domaine C-terminal de type LRR, un domaine central appelé NACHT (ou NOD), et un domaine N-terminal variant selon le type de NLR. Dans le cas présent, il s'agit du NLR NLRP3, dont le domaine N-terminal est composé de motifs PYD.

Abréviations : **AIM2**, Absent in Melanoma 2 ; **ASC**, Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD ; **CARD**, Caspase recruitment and activation domain ; **HIN**, hematopoietic interferon-inducible nuclear antigens with a 200-amino-acid repeat ; **LRR**, Leucine Rich Repeats ; **NACHT**, NLR, Nucleotide oligomerisation domain - like Receptors ; **PYD**, Pyrin domain.

Les ALRs font partie de la famille de protéines appelée PYHIN, comprenant un domaine carboxy-terminal HIN (pour *hematopoietic interferon-inducible nuclear antigens with a 200-amino-acid repeat*) qui permet la liaison à l'ADN, et un domaine N-terminal PYD qui active la cascade de

Figure 9 : Voies de signalisation des ALRs



AIM2, grâce à son domaine C-terminal, va se lier à l'ADN viral et bactérien. Une fois activé, il va faciliter le recrutement de la protéine adaptatrice ASC et de la pro-caspase 1. La formation de ce complexe va permettre de cliver la pro-caspase en caspase 1, elle-même responsable du clivage des pro-cytokines pro-IL-1 β et pro-IL-18 en formes actives, IL-1 β et IL-18. IFI16 quant à lui, est majoritairement localisé au niveau nucléaire et est capable de s'associer avec ASC et la pro-caspase 1, sortir du noyau et, comme AIM2, cliver la pro-caspase 1 en caspase 1. De plus, IFI16, après reconnaissance de l'ADN, pourrait aussi conduire à l'activation de STING directement, ou via cGAS.

Abréviations : **AIM2**, Absent in Melanoma 2; **ASC**, Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD; **cGAS**, cyclic-GMP-AMP- synthase; **IFI16**, IFN- γ -inducible protein 16; **STING**, Stimulator of IFN genes.

signalisation à l'origine de la formation de l'inflammasome. **Ces ALRs sont ainsi capables de détecter de l'ADN microbien viral mais aussi bactérien, qu'il soit cytosolique ou nucléaire** (voir IFI16) (Tableau 5) (Jin, 2013).

TABLEAU 5 : Les ALRs et leurs ligands

AIM2-like Receptors (ALRs)			
ALRs	Localisation	Ligand	Origine du ligand
AIM2	Intra-cytoplasmique	ADNdb	Virus (ex. : CytomégaloVirus) / Bactéries (ex. : <i>Listeria</i>)
IFI16	Intra-cytoplasmique / nucléaire	ADNdb	

Abréviations : **ADNdb**, Acide désoxyribonucléique double brin ; **AIM2**, Absent in Melanoma 2; **ALR**, AIM2-like receptor; **IFI16**, IFN- γ -inducible protein 16.

Ils vont faciliter le recrutement de la pro-caspase-1, et d'une molécule adaptatrice, ASC, commune à la plupart des inflammasomes, bien que certains complexes inflammasomes ASC-indépendants puissent aussi se former. **Ces structures seront ensuite responsables d'une rapide dégradation des cellules infectées ou des corps étrangers, via la pyroptose, et du relargage de cytokines de la famille de l'IL-1 telles que l'IL-1 β , l'IL-18 ou encore l'IL-33** (Rathinam, 2012 ; Fernandes-Alnemri, 2009 ; Schattgen, 2011), permettant le recrutement de neutrophiles et de cellules phagocytaires (Figure 9) (Lamkanfi, 2014).

La caspase 1, activée par AIM2, est nécessaire à la production d'IL-1 β et d'IL-18 par clivage de précurseurs pro-cytokines. Ces interleukines, sécrétées par l'inflammasome, sont originales dans le sens où elles ne nécessitent pas de modifications post-transcriptionnelles via le RE et l'appareil de Golgi puisqu'elles ne contiennent aucune extrémité N-terminale nécessaire à ce trafic dit conventionnel. C'est pourquoi elles vont être produites sous forme inactive nécessitant un clivage via la caspase 1 (Lamkanfi, 2012).

Suite à la découverte d'AIM2, une seconde protéine de la famille des PYHIN, **IFI16**, a été décrite pour son rôle dans la prolifération et la différenciation cellulaire (Luan, 2008). Cependant, Unterholzner et collègues ont caractérisée une autre fonction de IFI16, qui est celle d'activer une réponse de type IFN I : en effet, ils ont observé une inhibition des gènes activés par les IFN I chez des souris KO pour IFI16 (appelé IFI204 chez la souris) (Unterholzner, 2010). Ainsi, **IFI16 déclenche, suite à sa liaison avec de l'ADNdb et son association avec STING (pour Stimulator of interferon genes), une réponse IFN I** (Unterholzner, 2010). Cependant, malgré sa fonction de senseur d'ADN cytosolique, cette protéine serait majoritairement localisée au niveau nucléaire. En effet, ce récepteur posséderait des sites d'acétylation contrôlant sa distribution cellulaire lui permettant ainsi de détecter à la fois de l'ADN

étranger dans le cytoplasme et dans le noyau (suite par exemple à une infection par KSHV). IFI16 ferait en effet office de navette entre le cytosol et le noyau (Li, 2012) et serait aussi capable de s'associer à ASC, sortir du noyau et activer l'inflammasome. En outre, il aurait aussi la capacité à former un inflammasome au sein même du noyau (Figure 9) (Schattgen, 2011).

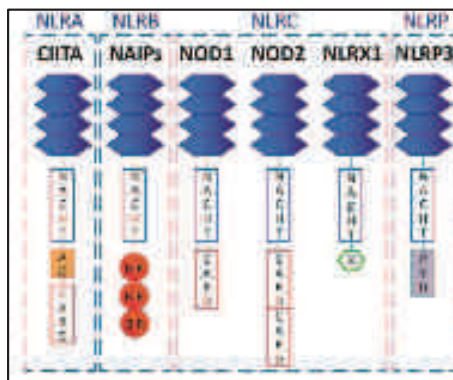
De la même façon que d'autres senseurs d'ADN (notamment cGAS [pour *cyclic GMP-AMP synthase*]), IFI16 serait sensible à la taille et à « l'habillage » de l'ADNdb, permettant une discrimination entre de l'ADN du soi et de l'ADN pathogénique, l'ADN du soi étant complexé à de nombreuses histones (Dempsey, 2015).

III-4. Les NOD-like receptors (NLRs)

De la même façon que les ALRs, les NLRs sont pour certains responsables de la formation d'inflammasomes suite à la détection de composants bactériens et viraux.

La famille des NLRs est une famille de récepteurs cytoplasmiques codés par 23 gènes chez l'Homme, 34 chez la souris, et caractérisés par une structure tripartite contenant un domaine C-terminal de type LRR, un domaine central de liaison avec les nucléotides appelé NOD (aussi nommé domaine NACHT), et finalement, un domaine effecteur à l'extrémité N-terminale permettant l'interaction avec d'autres protéines (Ting, 2008). Ce dernier peut, selon le type de NLR, être de type CARD (pour *caspase recruitment and activation domain*), BIR (pour *baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat*) ou encore PYD (pour *Pyrin domain*), comme c'est le cas pour les ALRs (Figure 10).

FIGURE 10 : Structure des différents types de NLRs



Les NLRs sont composés d'un domaine C-terminal de type LRR, un domaine central appelé NACHT (ou NOD) et un domaine effecteur N-terminal variant selon le type de NLR. Les NLRA possède un domaine N-terminal composé d'un domaine transactivateur (AD) en plus d'un domaine CARD, les NLRB possèdent un domaine BIR, les NLRC (comprenant NOD1, NOD2 et NLRX1 par exemple) possèdent uniquement un domaine CARD, et les NLRP un domaine CARD suivi d'un domaine N-terminal de type PYD.

Abréviations : **AD**, transactivator domain ; **BIR**, baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat ; **CARD**, caspase recruitment and activation domain ; **CIITA**, MHC class II transcription activator ; **PYD**, Pyrin domain.

Il existe en effet 5 sous-familles de NLRs classés en fonction de cette structure N-terminale : on peut ainsi distinguer **les NLRA**, pour lesquels la partie N-terminale consiste en un domaine appelé CIITA (régulateur transcriptionnel du CMH II) composé d'un domaine transactivateur (AD) en plus d'un domaine CARD, **les NLRB** ayant un domaine BIR, **les NLRC** possédant uniquement des domaines CARD, **les NLRP** avec un domaine PYD et finalement, **les NLRX**, dont le domaine N-terminal n'est pas connu à ce jour (**Figure 10**) (Saleh, 2011).

Parmi les plus connus, on peut citer NOD1 (ou NLRC1) et NOD2 (NLRC2). Ces NLRs reconnaissent des motifs différents du peptidoglycane, composant majoritaire de la paroi bactérienne : le g-D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid (iE-DAP) que l'on trouve chez les bactéries Gram -, et le muramyl dipeptide (MDP), présent à la fois dans les bactéries Gram+ et - (Kawai, 2009).

Alors que NOD1 est impliqué dans la reconnaissance intracellulaire de diverses bactéries entéroinvasives telles que *Escherichia coli* ou les bactéries du genre *Pseudomonas*, NOD2 participe à la détection des bactéries du genre *Streptococcus*, ou de mycobactéries (**Tableau 6**).

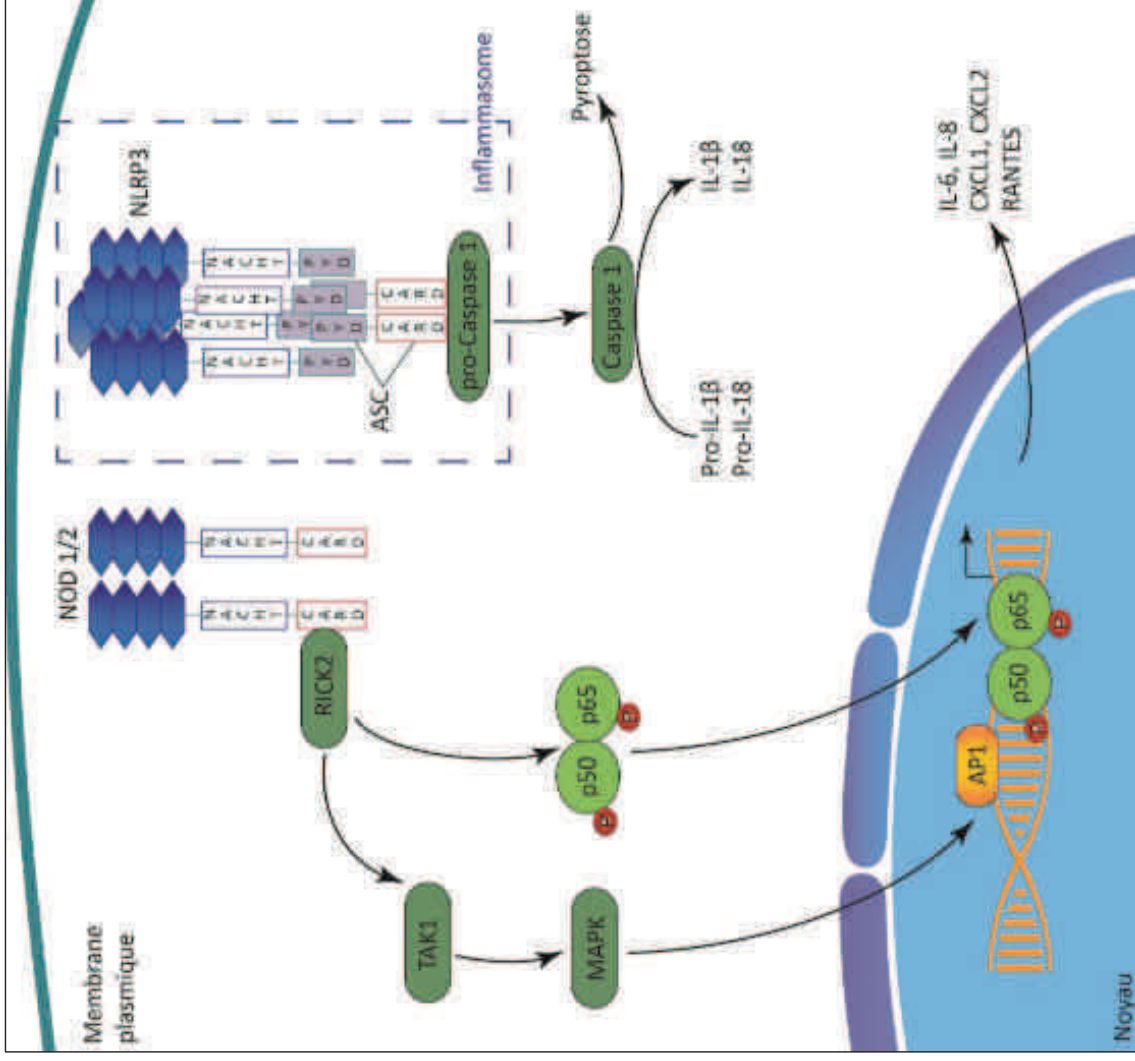
TABLEAU 6 : Les NLRs et leurs ligands

NOD-like Receptors (NLRs)			
Familles	NLRs	Localisation	Ligand
NLRA	CIITA	Intra-cytoplasmique	Inconnu
NLRB	NAIP		<i>Legionella pneumophila</i> ; Flagelline
NLRC	NOD1/NLRC1		Acide méso-diaminopimelique (iE-DAP) (Bactéries)
	NOD2/NLRC2		Muramyl dipeptide (MDP) (Bactéries)
	NLRC3		Inconnu
	NLRC4		<i>Legionella pneumophila</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Salmonella typhimurium</i> ; <i>Shigella flexneri</i>
	NLRC5		Inconnu
	NLRX1		Inconnu
NLRP	NLRP1/NALP1		Toxine de <i>Bacillus anthracis</i> ; MDP
	NLRP2/NALP2		Inconnu
	NLRP3/NALP3		ADN adénoviral – ARN viral (Influenza/Sendai) – ARN bactérien – <i>Candida albicans</i> / <i>Saccharomyces cerevisiae</i> – Signaux de danger (ATP extracellulaire/NAD+...) – Toxines perméabilisantes (Hémolysine/Nigéricine/Pneumolysine..) – LPS...
	NLRP4-14/NALP4-14		Inconnu

Abréviations : **ADN**, Acide désoxyribonucléique ; **CIITA**, MHC class II transcription activator ; **i E-DAP**, Acide meso-diaminopimelique ; **LPS**, Lipopolysaccharide ; **MDP**, Muramyl dipeptide ; **NAD+**, Nicotinamide adénine dinucléotide ; **NAIP**, NLR family, apoptosis inhibitory protein ; **NLR**, NOD-like receptor ; **NOD**, Nucleotide oligomerization domain ; **PYD**, Pyrin domain.

De façon générale, à l'état basal ces récepteurs se trouvent dans un état inactif grâce à des interactions intra-moléculaires. Par exemple pour NOD2, la partie C-ter (LRR) interagit avec la partie N-ter (domaines CARD et NOD) en absence de liaison à un ligand bactérien (Franchi, 2009).

Figure 11 : Voies de signalisation des NLRs



Une fois activés par différents signaux de danger, les NLRs s'oligomérisent et s'associent à la molécule adaptatrice ASC afin d'activer la caspase 1 responsable de la production d'IL-1 β et d'IL-18. D'autre part, les NLRs recrutent la kinase RICK2 qui se lie directement à la sous unité NEMO de NF- κ B (IKK γ) et active NF- κ B. RICK2 permet aussi de recruter la kinase TAK1, conduisant à l'activation de la voie des MAPKs telles que p38 ou JNK.

Abréviations : **AP1**, Activator protein 1; **ASC**, Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD; **CARD**, caspase recruitment and activation domain ; **CXCL1**, keratinocyte derived chemokine ; **CXCL2**, macrophage inflammatory ; **PYD**, Pyrin domain ; **RANTES**, Regulated upon activation, normal T-cell expressed, and presumably secreted ; **RICK** ; **RIP-like interacting caspase-like apoptosis regulatory protein kinase** ; **TAK1**, Transforming growth factor beta-activated Kinase 1.

Après activation, **ces récepteurs vont s'oligomériser**, permettant de ce fait le recrutement par exemple, via interactions entre domaines CARD, de la sérine/thréonine kinase RICK (pour *RIP-like interacting caspase-like apoptosis regulatory protein kinase*) 2. RICK va directement se lier à la sous unité NEMO de NF- κ B (IKK γ) et permettre son ubiquitination, **conduisant ainsi à l'activation de NF- κ B** (Da Silva, 2007). D'autre part, **RICK2 permet le recrutement de la kinase TAK1. Cette activation va finalement conduire à l'activation de la voie Akt, et de MAPKs telles que p38 ou JNK** (Raza Ali, 2015). **Toutes ces voies vont permettre une réponse inflammatoire robuste et la production de cytokines** telles que l'IL-6 et l'IL-8, ou de chimiokines telles que CXCL1 (pour *keratinocyte derived chemokine*), CXCL2 (pour *macrophage inflammatory protein-2*), et RANTES (pour *Regulated upon activation, normal T-cell expressed, and presumably secreted*), **majoritairement impliquées dans l'attraction des monocytes/macrophages et des LT au site de l'inflammation** (Figure 11) (Masumoto, 2006).

Parmi les NLRs, la protéine la plus étudiée, et ainsi l'inflammasome le mieux caractérisé, est NRLP3 (anciennement NALP3). Exprimé fortement dans les monocytes et les macrophages, il est associé, comme AIM2, à la protéine adaptatrice ASC via son domaine PYRIN. Une fois activé, NRLP3 s'oligomériser via ses sous-domaines NACHT, et la caspase 1 s'active après clivage (Rathinam, 2012).

III-5. Les RIG-I-like Receptors (RLRs)

Enfin, outre les TLRs et ALRs, d'autres molécules appelées **RLRs sont spécialisées dans la reconnaissance d'acides nucléiques**.

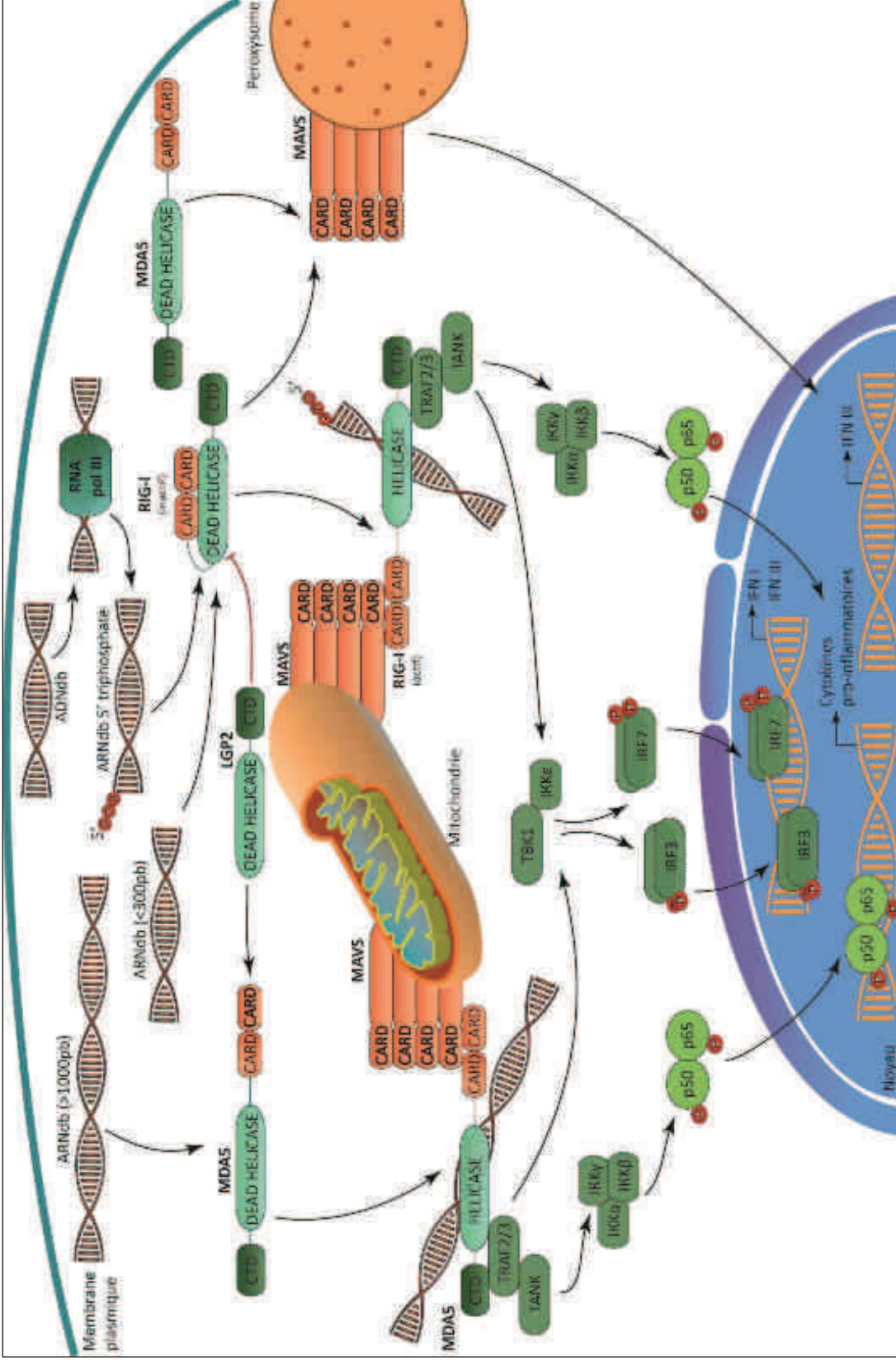
Les RLRs appartiennent à une famille d'hélicases à ARN, appelées DExH/D box hélicases, détectant de façon spécifique l'ARN cytosolique étranger issu de virus, présent dans le cytoplasme, et responsable de la mise en place d'une immunité anti-virale via l'induction d'IFN I. Cette famille compte trois membres que sont RIG-I, MDA5 et LGP2 (Yoneyama, 2008) (Tableau 7).

TABLEAU 7 : Les RLRs et leurs ligands

RIG-I-like Receptors (RLRs)			
RLRs	Localisation	Ligand	Origine du ligand
RIG-I	Intra-cytoplasmique	Petits ARNdb; ARNdb 5' triphosphate	Virus (ex. : VSV)
MDA5		Long ARNdb	Virus (ex. : Polio virus)
LGP2		Inconnu	Virus à ARN

Abréviations : **ARNdb**, Acide ribonucléique double brin ; **LGP2**, Laboratory of genetics and physiology 2 ; **MDA5**, Melanoma differentiation-associated gene 5 ; **RIG-I**, Retinoic acid inducible gene 1 ; **RLRs**, RIG-I like receptors.

Figure 13 : Voies de signalisation des RLRs



RIG-I et MDA5, bien qu'ayant des structures similaires, ne reconnaissent pas les mêmes sets d'ARN. En effet, alors que MDA5 détectera les longs ARNdb (>1000pb), RIG-I lui, permettra la reconnaissance des petits ARNdb (<300pb). De plus, après reconnaissance de l'ADNdb par l'ARN polymérase III, cette dernière catalysera la formation d'ARN 5' triphosphate qui sera à son tour reconnu par RIG-I. LGP2 ne possédant pas de domaine CARD, agira comme une molécule co-activatrice de MDA5, alors qu'elle inhibera RIG-I. Après activation, ces RLRs migreront jusqu'à la mitochondrie, ou au niveau du peroxysome, et activera la molécule adaptatrice MAVS. Ceci conduira à l'activation de TBK1 et des complexes IKK, régulant ainsi la transcription des facteurs IRF3, IRF7 et NF-κB, et conduisant finalement à la production d'IFN I et III, de cytokines pro-inflammatoires, et à la transcription des gènes stimulés par les IFNs.

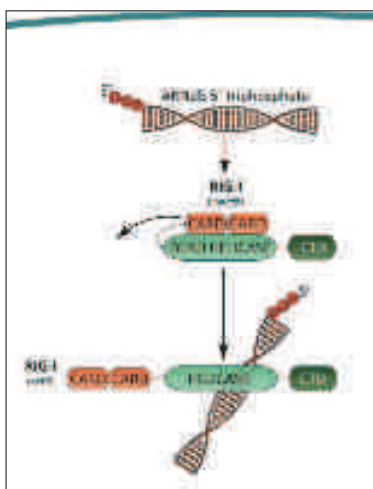
Abréviations : **ADNdb**, Acide désoxyribonucléique double brin ; **ARNdb**, Acide ribonucléique double brin ; **CARD**, caspase recrutement and activation domain ; **CTD**, Carboxy-terminal domain ; **IKK**, IκB kinase ; **IRF3/7**, Interferon regulatory factor 3/7 ; **LGP2**, Laboratory of genetics and physiology 2 ; **MAVS**, Mitochondrial antiviral signaling protein ; **MDA5**, Melanoma differentiation-associated gene 5 ; **RIG-I**, Retinoic acid inducible gene 1 ; **RNA pol III**, RNA polymerase III ; **TANK**, TRAF family member-associated NF-κB activator ; **TBK1**, TANK binding kinase ; **TRAF2/3**, TNF receptor associated factor 2/3.

Ces hélicases, sauf LGP2, possèdent une partie N-terminale appelée CARD, un domaine DExD/H-box responsable de l'activité hélicase, et un domaine C-terminal (CTD) (**Figure 12**).

En présence de son ligand, RIG-I va adopter une conformation permettant de libérer les domaines CARDS, conduisant au recrutement et à l'activation de la molécule adaptatrice MAVS (pour *Mitochondrial antiviral signaling protein alias IPS-1/ VISA/CARDIF*) après formation d'un filament autour de l'ARN (**Figure 12**) (Jiang, 2011).

Les domaines CARDS de la protéine MDA5 ne sont, quant à eux, pas séquestrés en l'absence de ligand (Kato, 2006 ; Reikine, 2014).

FIGURE 12 : Etat inactivé de RIG-I



En l'absence de ligand, RIG-I séquestre ses domaines CARD. Dès activation par l'ARN 5' triphosphate, RIG-I va adopter une conformation permettant de libérer les domaines CARDS, conduisant au recrutement et à l'activation de la molécule adaptatrice MAVS présente à la fois au niveau de la membrane mitochondriale et peroxysomale.

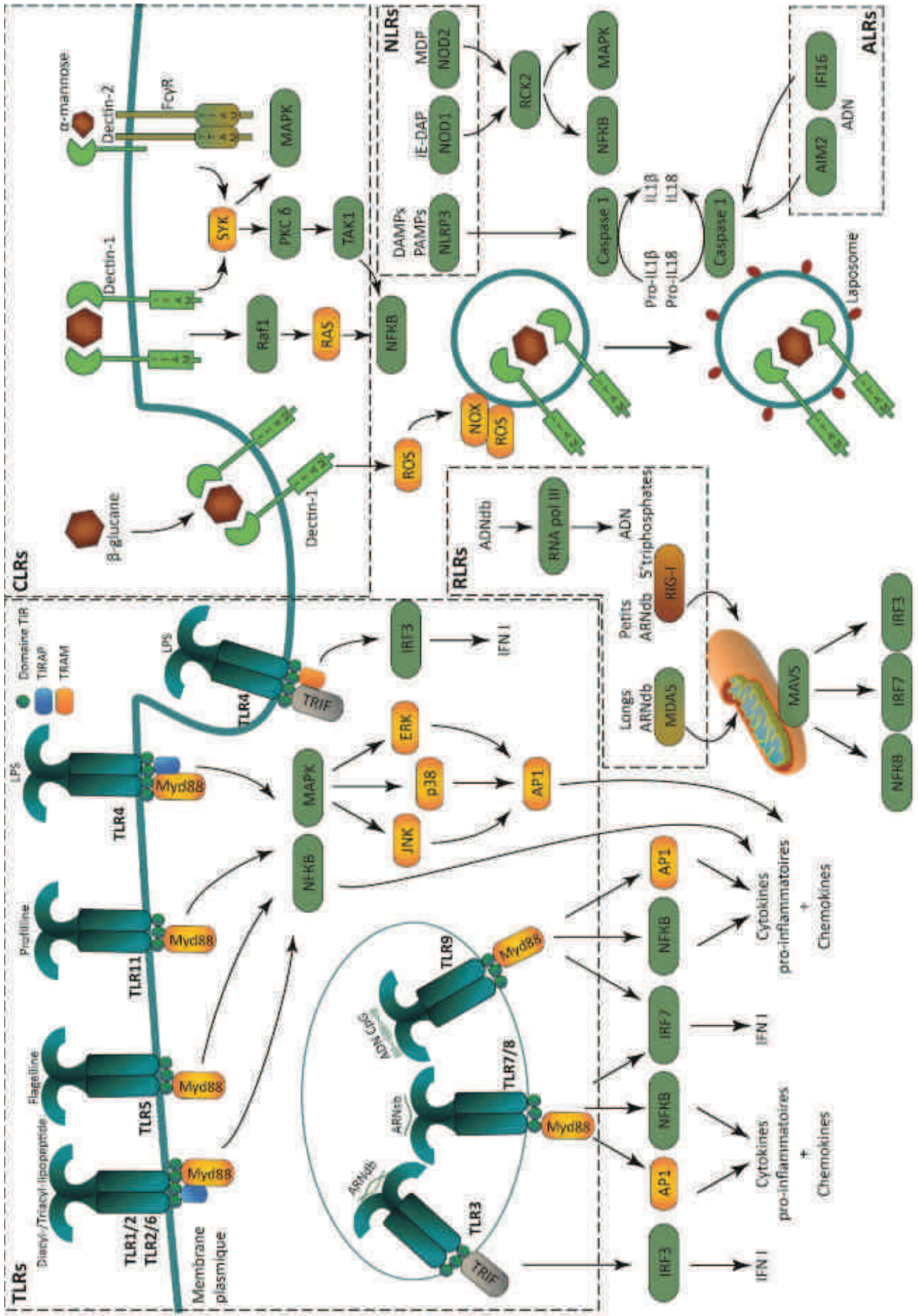
Abréviations : **ARNdb**, Acide ribonucléique double brin ; **CARD**, caspase recrutement and activation domain ; **CTD**, Carboxy-terminal domain ; **MAVS**, Mitochondrial antiviral signaling protein ; **RIG-I**, Retinoic acid inducible gene I.

Enfin, LGP2, ne possédant aucun domaine CARD, agira comme une molécule co-activatrice de MDA5, et inhibitrice de RIG-I (Yoneyama, 2005).

Une fois entré dans la cellule, le virus va générer, au cours de sa réplication, de l'ARNdb reconnu, comme mentionné plus haut, par les RLRs. De plus, RIG-I peut aussi permettre la mise en place d'une réponse anti-virale suite à la détection d'ADNdb. Plus spécifiquement, c'est **l'ARN polymérase III (RNA pol III) qui va reconnaître l'ADNdb, le convertir en ARN 5' triphosphate, qui va finalement activer RIG-I** (Chiu, 2009).

RIG-I et MDA5 vont avoir des actions complémentaires puisqu'ils ne reconnaissent pas les mêmes sets d'ARN viraux. En effet, tandis que **RIG-I se lie spécifiquement à l'ARNdb, incluant des ARN très petits (<300 paires de bases), ou possédant une extrémité 5' triphosphate, MDA5 se liera préférentiellement à de longs ARNdb (plus de 1000 paires de bases)** (Kato, 2006 ; Reikine, 2014).

Figure 14 : Récapitulatif des voies des PRRs



Ces molécules sont cytosoliques et des localisations spécifiques leur sont attribuées une fois l'ARN détecté. En effet, RIG-I ira se localiser préférentiellement à la limite de la membrane des mitochondries et du peroxysome (organelle à simple membrane responsable, tout comme la mitochondrie, de la β -oxydation, mais aussi de la dégradation de métabolites), où se situe MAVS, permettant l'activation et la polymérisation de cette molécule adaptatrice. **Une fois activée, celle-ci permettra à son tour l'activation de TBK1 et des complexes IKK, régulant ainsi la transcription des facteurs IRF3, IRF7 et NF- κ B respectivement, et conduisant finalement à la production d'IFN I et III, de cytokines pro-inflammatoires et des ISGs (Brubaker, 2014).** Il apparaît par ailleurs que la localisation de MAVS entraîne des différences dans la réponse anti-virale engendrée suite à la détection d'ARN viral. En effet, un signal en provenance de la membrane mitochondriale induira l'expression d'IFN I et III, alors qu'une signalisation peroxysomale entrainera l'expression d'ISGs résultant exclusivement de l'IFN III (Seth, 2005) (Figure 13).

De plus, alors que les RLRs sont particulièrement connus pour leur production d'IFN en réponse à une attaque virale, ces récepteurs sont aussi capables de limiter la réplication virale par l'induction de mort cellulaire via la voie des caspases et de l'inflammasome, le domaine CARD n'étant pas indispensable pour ce processus (Lei, 2009).

Ainsi, les PRRs jouent un rôle crucial dans la reconnaissance de nombreux pathogènes et signaux de danger (MAMPs et DAMPs), comprenant à la fois des motifs bactériens, viraux, fongiques ou des acides nucléiques. Ils sont majoritairement exprimés sur les DCs, les monocytes, les neutrophiles ou les cellules épithéliales et permettent la mise en place rapide d'une défense contre ces pathogènes.

Ces PRRs sont classés selon différentes catégories (ALRs, CLRs, NLRs, RLRs, TLRs) et peuvent être localisés à la fois à la membrane (TLRs et CLRs) ou être cytoplasmiques (ALRs, NLRs, RLRs).

Ils conduiront *in fine* à la transcription de facteurs à l'origine de la production notamment d'IFN et de cytokines pro-inflammatoires (Figure 14).

III-6. Autres senseurs d'ADN cytosoliques

III-6.1. DAI

En 2007 fut découvert un **autre senseur d'ADN cytosolique appelé DAI** (pour *DNA-dependent activator of IRFs*, alias ZBP-1). Takaoka et collaborateurs ont en effet mis en évidence son implication dans la production d'IFN I via l'activation des voies NF- κ B et IRF3, en réponse à une stimulation par

du poly(dA : dT), une séquence répétée synthétique d'ADNdb (Takaoka, 2007). Il jouerait notamment un rôle au niveau de la microglie et des astrocytes suite à une infection par le virus HSV-1 (pour *Herpes simplex virus-1*) (Furr, 2011), et dans les fibroblastes suite à une infection par le cytomégalovirus (DeFilippis, 2010). Néanmoins, il semblerait que son rôle soit **cellule-spécifique**, puisque Lipmann et collègues n'ont pu observer aucune réponse de DAI suite à une stimulation par de l'ADN ni dans les fibroblastes embryonnaires murins (ou MEFs), ni dans les monocytes et les macrophages humains (Unterholzner, 2010 ; Lippmann, 2008).

III-6.2. DDX41

Comme mentionné plus haut, les PRRs cités précédemment sont capables de détecter un seul type de PAMP.

Au contraire, DDX41, membre de la superfamille des hélicases DExD/H (appelée SF2 pour *helicase superfamily 2*) tout comme RIG-I, est unique en son genre. **Il est en effet capable de reconnaître deux types de ligands, à savoir l'ADNdb ainsi que les CDNs** (pour *cyclic dinucleotides*) (Omura, 2016 ; Parvatiyar, 2012).

Exprimé dans les cellules dendritiques myéloïdes et les monocytes, DDX41 est requis pour l'activation des facteurs NF- κ B et IRF3 en réponse à une stimulation par de l'ADNdb ou HSV-1, par association à STING et TBK1. En effet, une surexpression à la fois de DDX41 et STING aurait un effet synergique sur la production d'IFN β , alors qu'un KO de cette protéine bloquerait l'activation de TBK1 et la transcription des facteurs de transcription NF- κ B et IRF3 (Zhang, 2011).

c GAS et la voie STING constitue un autre senseur de l'ADN important que nous allons développer dans la partie suivante.

IV- LA VOIE DES RLRs ET LA VOIE cGAS/STING : A LA CROISEE DES CHEMINS

Alors que la plupart des ARN viraux sont reconnus par les RLRs, **l'ADN intracytoplasmique sera, quant à lui, majoritairement reconnu par cGAS, activant de fait la voie STING.**

Bien que ces deux voies de signalisation soient distinctes, nécessitant chacune leurs propres molécules adaptatrices, il est apparu que celles-ci s'entrecroisent. En effet, Brunette et collaborateurs ont pu mettre en évidence le fait que la réponse IFN I pouvait être quasiment abolie en cas de KO de STING et MAVS, mais pas dans le cas où seule l'expression de STING était abolie (Brunette, 2012).

De plus, Chiu et collègues ont été les premiers à mettre en évidence le lien entre la détection d'ADN et RIG-I. En effet, des ADNdb bactériens ou viraux peuvent être à la fois responsables de l'activation de STING via cGAS, mais aussi être la cible de l'ARN pol III, permettant la production d'ARNdb, pris en charge par RIG-I. En outre, STING va interagir avec RIG-I et MAVS via un complexe stable suite à la détection d'ARN viral (Chiu, 2009 ; Holm, 2016).

Il a d'autre part été observé qu'une déficience en STING dans des cultures primaires ou des modèles murins, était responsable d'une plus grande sensibilité aux virus à ARN (Ishikawa, 2009). Chen et collègues ont d'ailleurs montré que l'absence de STING était corrélée avec une diminution de la réponse IFN I médiée par RIG-I suite à la détection d'ARNdb intracytoplasmique (Chen, 2010).

Ceci démontre que bien que de nombreuses voies de signalisation, impliquant de nombreux récepteurs différents, s'entrecroisent et sont mises en place afin de répondre efficacement à une infection virale ou bactérienne, cette réponse est d'autant plus efficace que ces voies agissent en synergie et s'activent l'une l'autre. Nous allons maintenant plus particulièrement nous intéresser à la voie cGAS-cGAMP – STING.

PARTIE II- Identification et caractérisation de la voie cGAS- cGAMP – STING

I- STING

I-1. Découverte de STING

Comme mentionné précédemment, la défense de l'organisme contre l'invasion par des pathogènes implique la détection de motifs particuliers, les PAMPs (acide nucléique viral, motifs bactériens, souvent des composants membranaires tels que le LPS ou des protéines issues du flagelle). Cette reconnaissance se fera grâce aux PRRs précédemment mentionnées, tels que les TLRs ou autres senseurs, et permet ainsi l'activation de voies de signalisation conduisant à la transcription de facteurs de transcription tels que NF-κB ou les IRF3/7. Ces derniers mettront ainsi en place une réponse appropriée, incluant notamment la production des cytokines anti-virales, les IFN I (Ishikawa, 2008).

De façon à déterminer précisément les mécanismes mis en jeu au cours de cette réponse innée, différentes équipes, incluant celles de Ishikawa (Ishikawa and Barber, 2008), Cambier (Jin, 2008), Chen (Sun, 2009) et Shu (Zhong, 2008) ont réalisé un vaste screening par transfection de banques d'ADNc (pour ADN complémentaire), à la fois humains et murins, et ont mesuré l'induction de la production d'IFN β .

Ainsi, quelques milliers de cDNA ont été transfectés dans des HEK293T exprimant le gène de la luciférase sous le contrôle du promoteur de l'IFN β (IFN β -Luc). Pour cinq gènes, la surexpression engendrait une induction significative d'IFN β -Luc (avec un fold de 400). Parmi eux, MAVS (Ishikawa, 2008), ainsi qu'une molécule alors inconnue comme inducteur d'IFN β , STING. Une augmentation de la dimérisation (et donc de l'activation) du facteur de transcription IRF3 a d'autre part été observée dans des cellules HEK293T surexprimant STING. De plus, les cellules HEK293T ou des MEFs surexprimant STING devenaient très résistantes aux infections par VSV (pour *Vesicular stomatitis virus*) (Ishikawa, 2008). Au contraire, une suppression de l'expression de STING était responsable d'une diminution de la réponse aux ARN et ADNdb cytosoliques (Sun, 2009).

Bien que découverte en 2008 comme étant une molécule impliquée dans l'induction d'IFN β après stimulation par de l'ADN, et permettant la mise en place d'une réponse immunitaire suite à la détection d'ADN viral (Dempsey, 2015), **STING est aujourd'hui reconnu comme essentiel dans la détection d'ADN viral et bactérien, ADN du soi ou CDNs bactériens, et impliqué dans certaines pathologies autoinflammatoires** (Burdette, 2013).

I-2. Structure de la protéine STING

Associée au RE à l'état basal, mais aussi aux mitochondries et aux MAMs (pour *mitochondria-associated membranes*), la protéine STING (aussi connue sous les alias MPYS, MITA ou encore ERIS) est composée de 379 acides aminés chez l'Homme, 378 chez la souris. **Elle est ubiquitaire puisqu'exprimée dans de nombreux tissus par un large panel de types cellulaires** (cellules endothéliales, épithéliales, hématopoïétiques...) (Ishikawa and Barber, 2008).

STING contient 4 hélices transmembranaires (1-139, TM1 à TM4 pour *Transmembrane domain 1 à 4*) au niveau de sa partie N-terminale (NTD pour *N-terminal domain* ; 1-152), et un domaine carboxy-terminal nommé CTD (139-379). Celui-ci comprend le domaine de dimérisation (DD) de la protéine (155-180), qui est lui-même inclue dans le domaine de liaison au c-di-GMP appelé CBD (pour *c-di-GMP-binding domain* ou plus largement *CDNs binding domain*, 153-340), et la CTT (pour *c-ter tail*, 340-379) (Figure 15).

C'est via son extrémité N-terminale que STING est ancré au RE (Sun, 2009), partie structurale par ailleurs essentielle pour l'interaction avec certains de ses régulateurs, positifs ou négatifs (tels que ZDHHC1, AMFR ou encore TRIM32 et RNF5, développés plus loin) (Sun, 2009). Sun et collègues ont été les premiers à identifier un signal de rétention au RE, appelé RYR (76-78), situé entre les domaines transmembranaires TM2 et TM3 de la protéine STING, et un second domaine, RIR (178-180) après le domaine TM4. Ces domaines sont essentiels pour permettre la liaison de STING à son ligand puis son changement conformationnel, puisqu'il est d'autant plus aisé à la protéine de subir des modifications structurales lorsqu'elle est ancrée à la membrane du RE (Sun, 2009).

Sa région CBD quant à elle permettra à la protéine de former un homodimère par liaison hydrophobe d'une part, et lier les di-nucléotides cycliques d'autre part. En l'absence de ligand, STING se trouve dans un état latent d'auto-inhibition via l'interaction entre le CBD et la CTT (Tanaka and Chen, 2012), mais toujours sous forme de dimère (Ouyang, 2013). Le dimère est aussi consolidé par des liaisons hydrophobes et hydrophiles, rendant la structure très stable (Yin, 2012). Ainsi, **toute modification de séquence touchant le domaine de dimérisation de la protéine peut potentiellement engendrer un changement conformationnel risquant de déstabiliser la structure et de conduire donc à la production d'un analogue moins stable.**

Structurellement, après dimérisation, STING prend une conformation de corbeille parfaitement ajustée aux molécules de 17Å que sont les CDNs. Ces ligands de STING comprennent les c-di-GMP, c-di-AMP mais aussi c-GAMP (pour *cyclic GMP-AMP*), des CDNs produits naturellement par les bactéries ou à partir de fragments d'ADN viral ou bactérien, par l'enzyme cGAS (pour *c-GAMP synthase*). Cette poche est formée par les hélices $\alpha 1$ et 3 et une boucle formée par les feuillets $\beta 2$ et 3.

La liaison aux CDNs permettra ainsi un changement conformationnel de la protéine en déplaçant ainsi la CTT afin de permettre l'activation de la protéine, tandis que cette extrémité C-terminale interagira avec la kinase TBK1 (Figure 16) (Yin, 2012 ; Tanaka and Chen, 2012).

FIGURE 16 : Etat d'auto-inhibition de la protéine STING (Adapté de Burdette, 2013).



Abréviations : CBD, *CDN binding domain* ; CDNs, *cyclic-dinucleotides* ; CTT, *C-ter tail* ; TBK1, *TANK-binding kinase 1*.

Une fois activée, la protéine migre dans des vésicules périnucléaires où TBK1 est recrutée. Un signal de clivage existe en effet à l'extrémité N-terminale de STING, lui permettant de quitter la membrane du RE.

I-3. Activation et Migration de STING

Essentielle pour engendrer une réponse après reconnaissance d'ADN étranger viral (issu par exemple d'adenovirus, ou de HSV), bactérien (comme par exemple *Escherichia coli*) ou de CDNs, **STING contrôle la transcription de nombreux gènes impliqués dans la défense de l'organisme** incluant notamment les gènes codant pour les IFN I et des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 (Ishikawa, 2008 ; Ishikawa, 2009 ; Burdette, 2011 ; Sun, 2013).

De nombreuses études ont pu mettre en évidence le fait que STING était requis pour une production effective d'IFN I après exposition à de l'ADN étranger, tant dans les granulocytes, les macrophages et les DCs. En effet, afin de tester son rôle dans la réponse médiée par de l'ADN étranger, Ishikawa et collègues utilisèrent des MEFs déficientes pour STING. Une complète abrogation de la production d'IFN β fut observée après transfection avec de l'ADN viral, bactérien ou de l'ADN stimulant l'IFN (ISD pour *Interferon stimulatory DNA*, des oligonucléotides db de 45pb sans séquence CpG (Ishikawa, 2009).

I-3.1. STING, translocon et complexe d'exocytose

Les CDNs responsables de l'activation de STING sont des molécules produites par les bactéries afin de réguler la motilité bactérienne ou la formation du biofilm bactérien. **L'activation de STING entraîne sa migration du RE vers des vésicules périnucléaires, où se fera le recrutement de la protéine TBK1** (Ishikawa, 2009).

En effet, comme mentionné précédemment, STING est une protéine associée au RE et fait partie du complexe TRAP (pour *Translocon associated protein*), un complexe requis pour la translocation de protéines à travers la membrane du RE. Des études de co-immunoprécipitation ont en effet pu montrer une interaction entre STING et la protéine TRAP β (Ishikawa and Barber, 2008). Ce complexe serait par ailleurs en étroite connexion avec le translocon, un complexe multiprotéique permettant la translocation de polypeptides au travers des membranes biologiques, comme par exemple du cytosol vers le RE. Le translocon comprend 3 sous-unités : SEC61 α , SEC61 β et SEC61 γ .

Une colocalisation entre STING, TRAP β et SEC61 β suggère donc que le translocon soit impliqué dans les fonctions et l'activation de STING et que ceci influe donc sur l'induction des IFN I (Ishikawa

and Barber, 2008) : en effet, un KO des protéines TRAP β et Sec61 β altère significativement la production d'IFN I (Ishikawa, 2008).

Ishikawa et collègues démontrèrent d'ailleurs qu'en présence d'ADN, STING colocalise avec EEA1 (pour *Early endosome antigen 1*), un marqueur des endosomes précoces, de même qu'avec TFR (pour *Transferrin receptor*), récepteur à la transferrine et marqueur du recyclage des endosomes. De la même façon, STING interagirait avec Sec5. Sec5 est un composant du complexe d'exocytose ayant pour rôle de faciliter le transport vésiculaire en association aux compartiments endosomaux périnucléaires (Ishikawa and Barber, 2008 ; Heider, 2013). Ce complexe octamérique (composé de Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 et Exo84) est en effet responsable de l'ancrage de vésicules sécrétrices à la membrane plasmique, et facilite ainsi le relargage de protéines destinées à être sécrétées (Lipschutz, 2003).

Ce complexe d'exocytose avait d'ailleurs déjà été identifié en 2006 par l'équipe de White comme composant obligatoire à la machinerie permettant d'activer TBK1 en réponse à une infection par de l'ADN viral (Chien, 2006). Un KO de Sec5 diminue en effet l'habilité de STING à activer le promoteur de l'IFN β . STING nécessite donc des interactions à la fois avec le translocon et le complexe de l'exocyste pour permettre sa sortie du RE et sa migration consécutive dans des vésicules périnucléaires, et TBK1 elle-même serait associée à Sec5 (Ishikawa, 2008).

Ainsi, la présence d'ADN cytoplasmique conduit à l'activation de STING, responsable de son association avec TBK1 d'une part, et de son trafic périnucléaire via son interaction avec Sec5 et le complexe TRAP, d'autre part, le tout facilitant la production d'IFN I (voir FIGURE Régulation STING page 52) (Ishikawa 2009).

I-3.2. Activation par les virus

De nombreux ADN viraux sont à ce jour impliqués dans l'activation de la voie STING et notamment les adénovirus ou le virus de la vaccine (Ishikawa, 2009 ; Lam, 2014 ; Ma, 2016). De plus, STING est aussi essentiel dans la détection de rétrovirus comme par exemple HSV-1 ou HIV (Gao, 2013 ; Yoh, 2015 ; Kalamvoki et Roizman, 2014).

HSV-1 est d'ailleurs le premier virus décrit comme activateur de STING. En effet, les souris STING KO meurent beaucoup plus rapidement que les contrôles après infection par ce virus. En effet, alors que les KO meurent dans les 7 jours suivant l'infection, 80% de survie sont observés pour le groupe contrôle infecté de la même façon (Ishikawa et Barber, 2009).

STING permettrait par ailleurs d'entraver la réplication de virus à ARN tels que le VSV, le virus Sendai ou encore le virus de la Dengue, probablement en synergie avec RIG-I (Ishikawa et Barber, 2009 ; Aguirre, 2012).

De nombreux virus sont ainsi capables d'activer STING, bien que certains soient aussi capables de détourner la machinerie STING (Herpes virus, Papilloma virus, Flavivirus...) afin de favoriser leur propre réplication, ou encore de synthétiser des antagonistes de STING afin d'échapper aux mécanismes de détection (Ma, 2016). Kalamvoki et Roizman ont en effet pu observer que bien que la voie STING soit un important mécanisme de défense contre HSV-1, il est aussi nécessaire à sa réplication dans certains types cellulaires, et dans certains contextes (Kalamvoki et Roizman, 2014). D'autres, tel que le KSHV (pour *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*) produit des protéines virales (vIRF1 pour *viral IFN regulatory factor 1*) capables d'inhiber l'interaction STING/TBK1 et d'empêcher ainsi la production d'IFN β (Ma, 2015 ; Surpris, 2017).

I-3.3. Activation par les bactéries

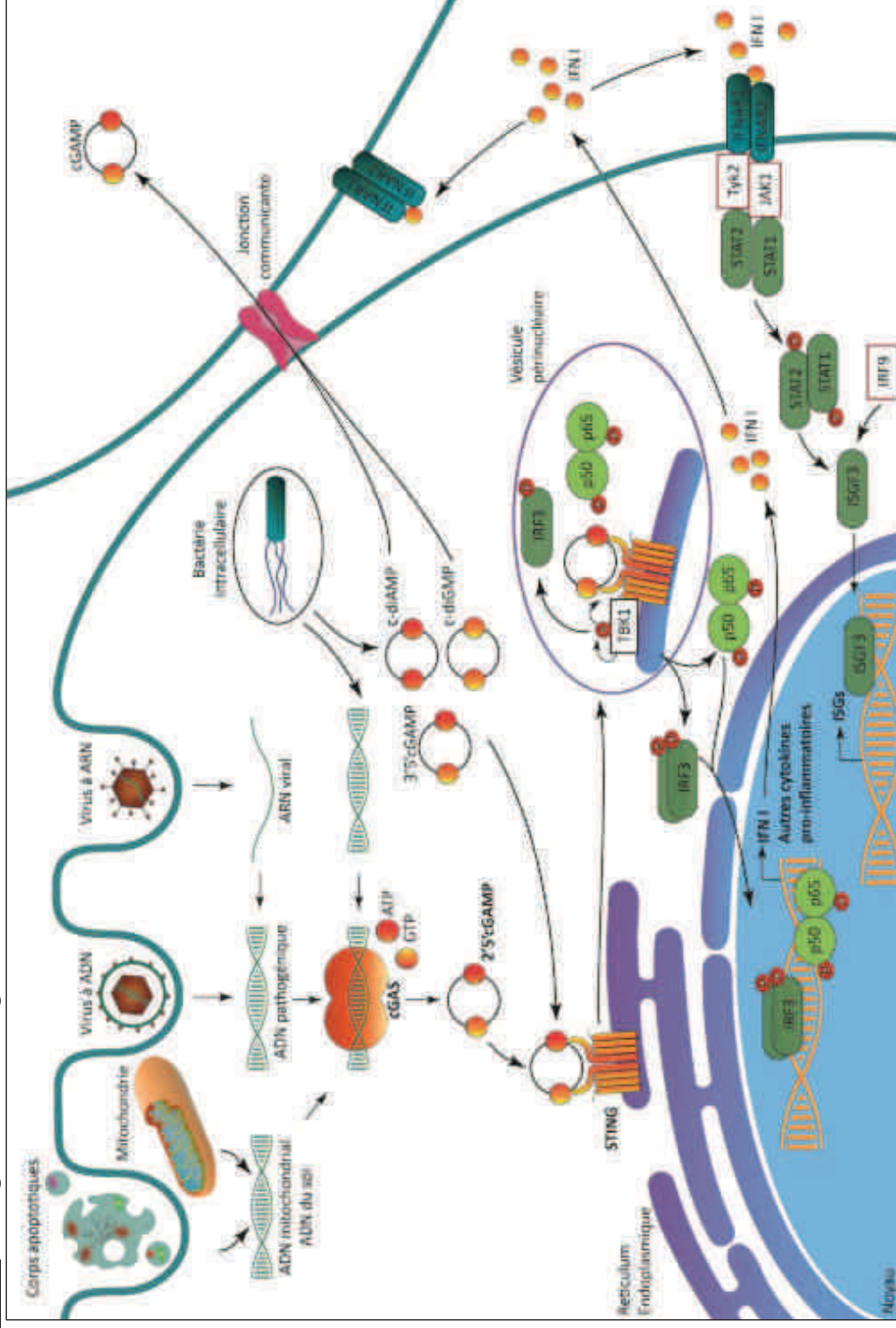
Comme mentionné précédemment, à la fois des bactéries Gram+ (*Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*...) et Gram- (*Legionella pneumophila*, *Chlamydia muridarum*...) sont en mesure d'activer directement la voie STING, majoritairement en produisant directement des CDNs. D'autres vont activer indirectement STING via cGAS qui va détecter leur ADN. **Bien que STING soit nécessaire à la détection de certaines bactéries, il s'avère qu'il est aussi capable, dans certains cas, de faciliter leur survie**, probablement en diminuant la réponse immunitaire de l'hôte, bien que les mécanismes mis en jeu ne soient pas à ce jour tout à fait élucidés (Dey, 2015 ; Archer, 2015 ; Marinho, 2017).

I-3.4. Voie de signalisation générale de STING

Il a été montré que STING est associé avec le micrososome, un complexe continu de membranes provenant à la fois du RE, de l'appareil de Golgi et de vésicules de transport. Plus précisément, il a été démontré que le trafic de STING du RE aux vésicules périnucléaires passe par le Golgi puisque la Brefeldine A (une molécule antivirale inhibant le transport protéique du RE au Golgi) était capable de bloquer ce processus (Ishikawa, 2009).

Après l'association de STING avec TBK1 et migration dans les vésicules périnucléaires, TBK1, après auto-phosphorylation, va phosphoryler STING sur sa sérine S³⁶⁶. C'est cette phosphorylation qui va permettre le recrutement de la protéine IRF3, qui sera à son tour phosphorylée par TBK1. Finalement, **après activation, IRF3 va se dimériser et être transloquée au niveau nucléaire, induisant de ce fait la production d'IFN I (notamment d'IFN β) qui pourra agir de façon autocrine ou**

FIGURE 17 : Voie générale de la signalisation de STING



Après reconnaissance d'ADN, qu'il soit d'origine virale, bactérien, mitochondrial ou du soi, cGAS va être activée et catalyser la synthèse de 2'5' cGAMP, ligand de STING. D'autres analogues à cGAMP (3'5' cGAMP, c-di-GMP) peuvent être produits directement par des bactéries et conduire à l'activation directe de STING au sein de la même cellule, ou des cellules adjacentes via les jonctions communicantes. Une fois activé, STING va migrer du réticulum endoplasmique vers des vésicules périnucléaires où sera recrutée TBK1. Cette dernière, après activation par auto-phosphorylation, va phosphoryler TBK1. TBK1 pourra ensuite phosphoryler à la fois IRF3, mais aussi NF-κB (p50/p65), conduisant à la dimérisation de IRF3, l'activation de NF-κB par relargage des sous-unités p65/p50, et translocation nucléaire de ces deux facteurs. Ceci permettra de conduire à la production de cytokines pro-inflammatoires et d'IFN I. Ces IFN I, majoritairement l'IFNβ, pourront ainsi être sécrétés, être reconnus par leur récepteur (IFNAR) et induire la cascade de signalisation à l'origine de la transcription de nombreux gènes dits « stimulés par l'IFN I » (ISGs). En effet, l'activation de Tyk2 (sur la sous-unité IFNAR1 du récepteur aux IFNs I) et Jak1 (sur IFNAR2) conduira à l'activation consécutive des facteurs STAT1/2 qui formeront alors un hétérodimère. Après association avec IRF9, ce complexe (alors appelé ISGF3) sera transloqué au niveau nucléaire et induira la transcription des ISGs.

Abréviations : **ADN**, Acide désoxyribonucléique ; **AMP**, Acide ribonucléique ; **ARN**, Acide ribonucléique ; **CGAMP**, cyclic-GMP-AMP ; **CGAS**, cGAMP synthase ; **GMP**, Guanosine monophosphate ; **GTP**, Guanosine triphosphate ; **IFN**, Interferon ; **IFNAR**, Type I IFN receptor ; **IRF3/9**, Interferon regulatory factor 3/9 ; **ISG**, Interferon stimulated genes ; **ISGF3**, Interferon-stimulated transcription factor 3 ; **Jak1**, Janus kinase 1 ; **NF-κB**, Nuclear factor-κB ; **STAT1/2**, Signal transducer and activator of transcription 1 ; **STING**, Stimulator of IFN genes ; **TBK1**, TANK binding kinase 1 ; **Tyk2**, Tyrosine kinase 2.

paracrine en se fixant sur son récepteur IFNAR et induisant une réponse IFN I. Cette dernière consiste en l'expression d'un ensemble de gènes appelés ISGs via la voie Jak1/Tyk2 (voir Partie I – II.1 Les IFN) (Figure 17) (Barber, 2014 ; Liu, 2015 ; Ma, 2016). STING sera ensuite rapidement recyclé de façon à prévenir une activation soutenue de la voie qui pourrait potentiellement conduire à un mécanisme auto-inflammatoire en cas de non régulation.

Cet axe STING-TBK1 engage par ailleurs la voie de signalisation NF- κ B. Cette signalisation requiert des molécules de la famille TRAF, généralement impliquées dans la signalisation des TLRs. En effet, la partie C-terminale de STING contient des motifs de liaison à la protéine TRAF2 (Jin, 2011). De plus, Abe et collaborateurs ont pu démontrer que TRAF6 intervient en amont de la liaison de STING avec TBK1 (Abe, 2014).

Ainsi, après phosphorylation de STING par la kinase TBK1, cette dernière va permettre la phosphorylation de I κ B, résultant ainsi en un relargage de NF- κ B (composé, pour la voie canonique, des sous-unités p50, p65 et de I κ B α , I κ B α étant relargué du complexe par phosphorylation puis dégradé par le protéasome, permettant la translocation de p50/p65), la translocation nucléaire du dimère p50/p65 et donc l'expression de gènes dépendants de ce facteur de transcription, notamment impliqués dans le stress cellulaire, la progression tumorale, l'inflammation et l'immunité (Figure 17) (Panday, 2016).

De plus, la sous-unité NEMO (pour *NF- κ B essential modulator*) pourrait être elle-même nécessaire à l'activation de TBK1 qui en retour phosphorylerait IKK β afin d'activer NF- κ B (Fang, 2017).

Comme évoqué précédemment, un KO de STING dans des MEFs résulte en effet en une complète abrogation de l'expression de l'IFN β , ainsi que de l'absence de translocation des facteurs IRF3/7 dans le noyau. Des défauts dans la voie de signalisation de NF- κ B ont aussi été observés dans des MEFs *Sting*^{-/-} (Ishikawa, 2009).

I-3.5. STING, microbiote et homéostasie lymphocytaire

De récentes études ont permis de mettre en évidence le rôle crucial de STING dans la régulation de l'inflammation intestinale. En effet, on peut retrouver à la fois de l'ADN et des CDNs au niveau des cellules intestinales, contribuant ainsi à l'activation de STING (Rudlaff, 2014).

Ceci est dû au fait que des milliards de microorganismes, dont des bactéries, participent à cette immunité mucoale (Mayer, 2005). En outre, afin de maintenir cette homéostasie, notre organisme doit être capable de discriminer les antigènes en provenance de pathogènes sans se diriger contre les commensaux tout en maintenant une activation constitutive basale du système immunitaire intestinal (Hill, 2010).

D'autre part, les cellules de l'épithélium intestinal sont parmi celles qui se renouvellent le plus et le plus vite, créant ainsi de nombreux corps apoptotiques avec risque de relargage d'acides nucléiques, autant de sources d'ADN pouvant stimuler les cellules du système immunitaire.

Une régulation fine doit ainsi être mise en place afin de maintenir un équilibre constant entre les mécanismes pro- et anti-inflammatoires (Fukata, 2013), la production d'IFN I au niveau intestinal étant l'un des mécanismes majeurs de régulation (Tschurtschenthaler, 2014). **Il a en effet été observé qu'une dérégulation du microbiote intestinal chez l'Homme était responsable d'une production anormale de cytokines pro-inflammatoires (Schirmer, 2016).**

D'autre part, il a été montré que des souris élevées dans un environnement sans pathogènes (« germ-free ») développent plusieurs anomalies intestinales (immaturité cellulaire, villi plus importants, cryptes plus petites), avec un risque accru de développement de colites (Petersonn, 2010 ; Round, 2009), ainsi qu'une production diminuée de mucus et d'IgA protectrices (Canesso, 2017). Or ces deux derniers facteurs ont un rôle très important dans la protection contre les bactéries provenant du milieu extérieur, et limitant l'entrée vers la muqueuse intestinale des bactéries de la flore commensale (Pabst, 2016). En outre, Josefsdottir et collègues démontrèrent que des souris sauvages traitées par antibiotiques, non seulement développent un phénotype très délétère (anémie, thrombocytose, leucopénie, pan-lymphopénie), mais aussi une forte diminution du nombre de cellules souches hématopoïétiques au niveau médullaire (Josefsdottir, 2016). Ainsi l'activité du microbiote a un impact important sur l'hématopoïèse.

Les souris STING KO présentent un changement de microbiome comparé à des souris WT, et un profil plus inflammatoire avec augmentation de la concentration d'IL-17, et développement accru de colites. En effet, ces souris présentent des villosités intestinales plus allongées que les WT (pour *wild-type*, c'est-à-dire sauvages), ainsi que des cryptes plus courtes. Après coloration à l'acide périodique de Schiff, Canesso et collaborateurs purent par ailleurs observer une diminution du nombre de cellules caliciformes responsables de la production de mucine. La mucine est nécessaire à la protection de la muqueuse intestinale puisqu'elle empêche la colonisation bactérienne. Ce phénotype ressemble en outre à celui observé précédemment pour des souris élevées dans des animaleries dites « germ-free ».

Canesso et collègues ont enfin observé chez les souris STING KO une diminution des LT présents au niveau de l'épithélium intestinal, qui constituent une première ligne de défense contre les pathogènes, et notamment des LT régulateurs (Treg), en cohérence avec le développement accru de colites (Canesso, 2017).

Concernant l'homéostasie lymphocytaire, il a été observé que les ILCs (pour *Innate Lymphoid cells*), une population cellulaire dérivé du progéniteur lymphoïde commun mais distincte des lignées B et T (voir **Partie IV, II-3. Les lymphocytes innés, page 89**), seraient complètement dérégulés dans les STING KO (Canesso, 2017). Or il a déjà été démontré qu'une activation inappropriée de ce type de cellules était corrélée à un profil inflammatoire (Klose, 2016).

Ces cellules sont particulièrement importantes au niveau des muqueuses, notamment intestinales, puisqu'elles permettent d'engendrer une réponse rapide contre les pathogènes (bactéries intra- et extra-cellulaires, parasites, champignons..). Elles vont en effet coordonner une réponse immunitaire précoce puisque sensibles au moindre signal de stress (Vermijlen, 2014 ; Geremia, 2017). En outre, des souris KO conditionnelles pour T-bet (qui joue un rôle crucial dans le développement des ILCs) dans les ILC développent spontanément une colite déclenchée par *Helicobacter typhlonius* (Geremia, 2017).

Parmi ces ILCs, on distingue 3 groupes : les ILC1 comprenant les cellules NK, les ILC2 et les ILC3 (voir **Partie IV, II-3. Les lymphocytes innés, page 89**).

Canesso et collaborateurs ont pu observer que dans les souris STING KO, la fréquence des ILC1 et 3 était augmentée alors que celle des ILC2 était diminuée (Canesso, 2017). Ce suggère donc qu'**une perte de STING occasionne un déséquilibre dans l'homéostasie cellulaire intestinale, pouvant engendrer, en plus d'un phénotype intestinal inflammatoire, un déséquilibre à plus grande échelle, notamment en terme d'organogénèse et de développement lymphocytaire.**

Exprimées différemment tout au long de l'intestin, elles possèdent chacune un rôle protecteur qui leur est propre. Les ILC1 sont majoritairement présentes au niveau du tractus supérieur tandis que les ILC2 sont présentes en petites quantité dans tout l'intestin, et finalement, les ILC3 sont principalement retrouvées au niveau du colon (Geremia, 2017).

Ainsi, en plus d'être acteur central dans la détection d'ADNdb, STING est aussi un régulateur clé du microbiote intestinal, un léger déséquilibre pouvant entraîner des conséquences délétères pour l'hôte.

I-3.6.Activation via l'ADN mitochondrial

Considérées comme les génératrices énergétiques de la cellule, les mitochondries possèdent de nombreuses autres fonctions et notamment en cas d'infection bactérienne ou virale et d'inflammation. Comme mentionné précédemment, les DAMPs sont les signaux de danger qui permettent la mise en place d'une réponse immunitaire chez l'hôte. Ces DAMPs sont issus des

cellules de l'hôte, infectées ou mourantes. L'ADN relargué par la mitochondrie (ADNmt pour *ADN mitochondrial*) fait partie des DAMPs (Liu, 2016). **Le relargage d'ADNmt est un processus mis en place en cas de stress, notamment en réponse à une infection virale (par HSV-1 par exemple) et permet l'activation de la voie STING.** Ce relargage est médié par le facteur de transcription Tfam (pour *Transcription factor A mitochondrial*) codant pour une protéine mitochondriale responsable entre autre du maintien de l'architecture mitochondriale. Un stress, provoqué par exemple par une infection virale, conduit à une diminution de Tfam, résultant en une perte de stabilité de l'ADNmt et le relargage de fragments d'ADNmt (Fang, 2016 ; Surpris, 2016).

Cet ADNmt est ensuite reconnu par cGAS et conduit alors à l'activation de la voie cGAS/STING et la production d'IFN I. Au contraire, des souris KO pour cGAS, STING ou IRF3 ne sont plus capables de produire des IFN I en réponse à de l'ADNmt.

Outre ce mécanisme bénéfique à la cellule hôte, **une accumulation trop importante de mitochondries endommagées peut aussi résulter en le relargage d'ADNmt dans le cytoplasme et être alors responsable de pathologies inflammatoires** (polyarthrite rhumatoïde, athérosclérose..) (Liu, 2016).

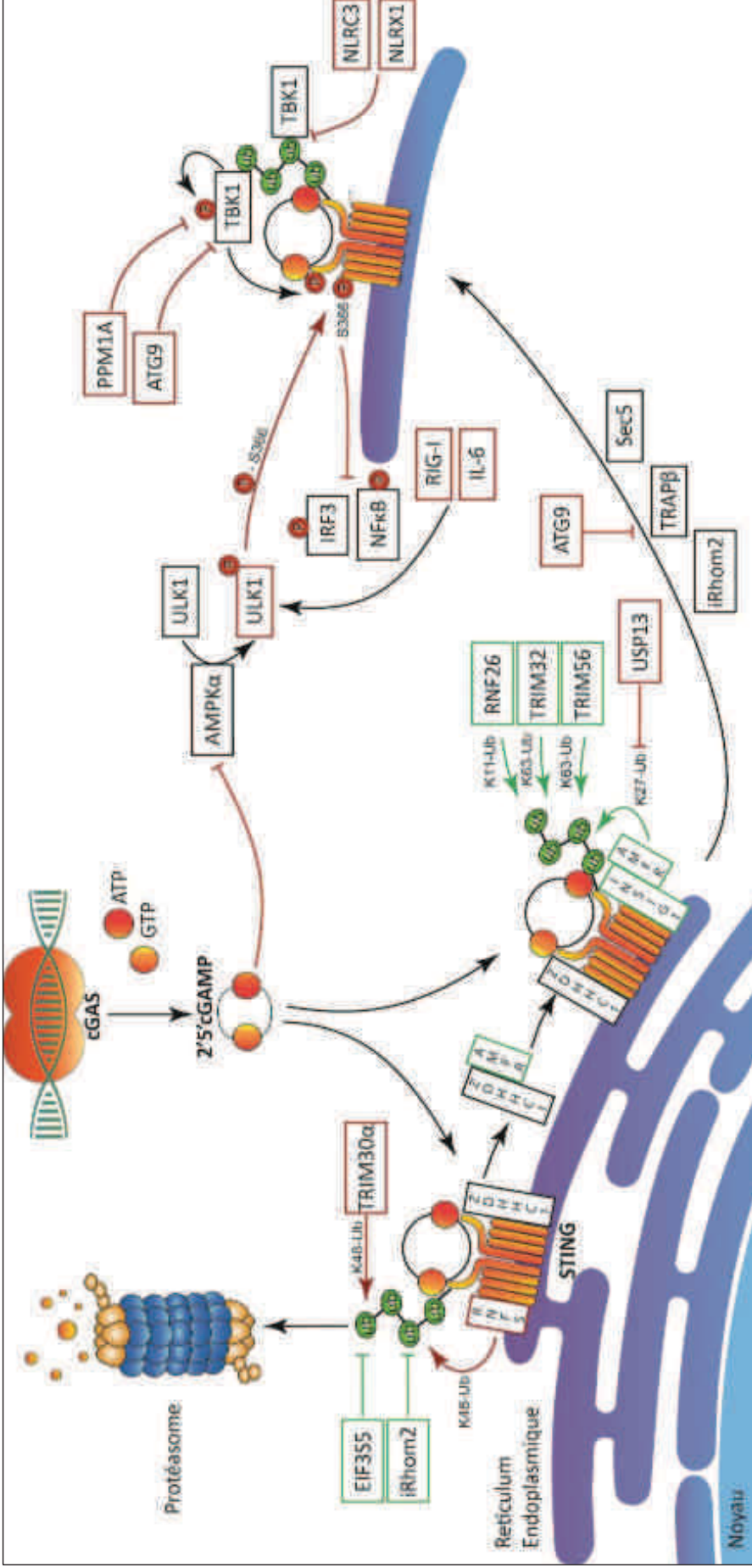
I-4. Régulation de STING

Une activation normale de la voie de STING après détection d'ADN cytosolique permet une défense appropriée de l'hôte. Au contraire, toute stimulation incontrôlée par cet ADN peut conduire à une sécrétion excessive de cytokines pro-inflammatoires et d'IFN I. Ceci pouvant être responsable, à terme, du développement de pathologies autoinflammatoires, comme le SAVI (pour *STING-associated vasculopathy with onset in infancy*, développé plus loin).

De façon à assurer une signalisation optimale, rapide et efficace, STING va donc être régulé via différentes boucles de rétrocontrôle et sera vite dégradé (en 12 heures) après activation (**Figure 18**). Il est communément admis que translocation, phosphorylation et ubiquitination sont des caractéristiques de la voie STING, assurant son activation, la propagation du signal puis sa dégradation rapide, le tout sous le contrôle de nombreuses molécules.

La modification majeure permettant cette régulation est sans aucun doute l'ubiquitination de la protéine sur la lysine (K) en position 150 de la protéine STING, assurant son activité (ubiquitination K11, K63) ou favorisant un recyclage permanent par le protéasome (K48).

FIGURE 18 : Régulation de STING



Les cadres noirs représentent les acteurs de la voie STING. Cette voie possède de nombreux points de contrôle. Les régulateurs négatifs de STING sont ici représentés en rouge, les régulateurs positifs apparaissent en vert. La liaison de STING aux CDNs sera facilitée par la molécule ZDHHC1, qui va d'autre part permettre le recrutement de la protéine AMFR avec l'aide de INSIG1. Ces deux ubiquitine ligases permettront l'ajout d'une queue polylysine K27 à STING, responsable de son activation. Il en va de même pour les protéines RNF26, TRIM32 et TRIM56, responsables de l'ajout d'une queue polylysine K11 ou K63. A l'inverse, RNF5 et TRIM30α vont greffer une queue polyubiquitine K48, à l'origine de l'adressage de STING au protéasome, et donc conduisant à sa dégradation. Finalement, EIF355 et iRhom2, deux régulateurs positifs de STING, sont eux capables de déubiquitiner la queue polyubiquitine K48 de STING, évitant donc qu'il soit dégradé. De la même façon, USP13 va déstabiliser la queue polyubiquitine K27 de STING, empêchant donc son activation. Une fois activé, STING migrera du RE à des vésicules pérucléaires où il se fixera à son partenaire TBK1, et au facteur de transcription IRF3. Cette translocation serait rendue possible grâce à la molécule iRhom2, responsable du recrutement de la protéine associée au transloco TRAPB, ainsi que du complexe de d'exocytose (et notamment Sec5). La molécule ATG9a pourra ici empêcher cette migration. La phosphorylation de STING étant nécessaire pour le recrutement de IRF3, elle fait l'objet d'un autre point de contrôle. En effet, ULK1, après activation suite à l'inhibition de l'AMPK par les CDNs, pourra phosphoryler STING. RIG-I et l'IL-6 activeront ULK1 et inhiberont donc STING. Enfin, PPM1A, une phosphatase, pourra empêcher l'activation de STING et le recrutement de IRF3, en empêchant la phosphorylation médiée par TBK1. Enfin, ATG9a, NLRX1 ou NLRX3, vont être impliquées dans la régulation négative de STING en empêchant la complexation STING-TBK1 ou en affaiblissant l'interaction entre STING et TBK1 (pour NLRX1 et NLRX3).

Abréviations : AMFR, Autocrine motility factor receptor ; AMPK, AMP-activated protein kinase ; ATG, Autophagy-related gene ; ATP, Adenosine triphosphate ; EIF355, Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 5 ; GTP, Guanosine triphosphate ; INSIG1, Insulin-induced gene 1 ; IRF3, IFN regulatory factor ; iRhom2, inactive rhomboid protein 2 ; NF-κB, Nuclear factor-κB ; NLR, NOD-like receptors ; PPM1A, protein phosphatase, Mg2+ /Mn2+-dependent, 1A ; RIG-I, Retinoic acid inducible gene 1 ; RNF, Ring finger protein ; Sec5, alias EXOC2, exocyst complex component 2 ; TBK1, TANK-binding kinase 1 ; TRAPB, Transloco associated protein ; TRIM, Tripartite motif-containing protein ; ULK1, UNC51-like kinase 1 ; USP13, Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase 13 ; ZDHHC1, zinc finger DHHC domain-containing protein 1.

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle responsable de la liaison covalente de motifs ubiquitines à des résidus lysine de protéines cibles. Ce processus est catalysé par une cascade d'enzymes appelées E1-, E2- et E3-ligases, permettant respectivement l'activation, la conjugaison et la ligation de ces queues ubiquitine (Hershko, 1998). Etant donné la présence de 7 résidus lysines sur l'ubiquitine, cela permet la formation d'une variété de chaînes incluant K6, K11, K27, K29, K33, K48 et K63, en fonction de la lysine via laquelle les motifs ubiquitine sont liés entre eux. Il n'existe qu'une seule enzyme E1-, plus d'une trentaine d'E2-, et de très nombreuses ubiquitine E3-ligases (plus de 700) (Hu, 2016).

I-4.1. Régulation positive de la voie de STING

I-4.1.1. Tripartite motif-containing protein (TRIM) 56 et TRIM32

TRIM56, une ubiquitine E3-ligase, va se lier à STING et permettre son ubiquitination par ajout d'une queue polylysine K63 sur la lysine 150 de STING, dans le but de faciliter à la fois sa dimérisation mais aussi sa liaison à TBK1 (Figure 18). En effet, un KO de TRIM56 diminue de façon drastique la production d'IFN β et l'activation du promoteur ISRE à l'origine de l'expression des ISGs. Ainsi, c'est l'ubiquitination de STING qui va permettre d'activer TBK1 et la voie des IFN I. En surexprimant STING et TBK1 dans une lignée cellulaire, en présence ou non de TRIM56, Tsuchida et collègues ont constaté (par études de co-immunoprécipitation) que malgré l'absence de TRIM56, STING et TBK1 s'associaient, mais moins efficacement.

En présence de TRIM56, par contre, la formation du complexe STING-TBK1 est favorisée, suggérant donc que cette E3-ligase facilite cette interaction. En remplaçant la lysine 150 par un autre acide aminé (R), et en observant qu'alors STING ne coprécipitait ni ne migrerait plus dans des vésicules périnucléaires vers TBK1, les chercheurs ont pu conclure que l'ubiquitination de STING est un prérequis nécessaire à l'activation et à la complexation avec TBK1. Néanmoins, ils constatèrent que cette modification n'est cependant pas nécessaire à la translocation dans des vésicules périnucléaires, puisque tant STING que STING K150R en étaient capables (Tsuchida 2010).

Il en va de même pour TRIM32 (une autre E3-ligase), pour laquelle les mêmes conclusions ont pu être tirées par Zhang et collaborateurs, bien que cette voie ne semble pas majoritaire. En effet, la mutation K150R de STING ne diminue que partiellement l'ubiquitination par cette dernière. Elle semble néanmoins requise pour les interactions STING-TBK1 en cas d'infection par le HSV-1 ou le virus Sendai (Zhang, 2012).

I-4.1.2. Ring finger protein 26 (RNF26)

RNF26, quant à elle, exerce un rôle particulier. Elle a tout d'abord été identifiée comme **E3-ligase responsable d'une polyubiquitination au moyen de résidus sérine K11**, en fixant cette queue polylysine sur le motif K150 de STING (**Figure 18**), **permettant donc d'améliorer l'association avec TBK1**. Mais au contraire, **elle aurait aussi pour rôle d'atténuer l'ubiquitination K48 de STING** (conduisant à sa dégradation par le protéasome) **médiée par RNF5** (pour *Ring finger protein 5*, décrite plus loin), sans pour autant déstabiliser celle en K63 qui permet par contre l'activation de STING. Ceci suggère de ce fait une régulation positive de la voie de signalisation STING. En effet, Qin et collaborateurs ont pu observer que la polyubiquitination de STING par RNF5 via les sérines K48, et donc la dégradation de STING, était partiellement inhibée en cas de co-expression avec RNF26. En accord avec ces résultats, ils notèrent qu'en infectant des cellules avec les virus Sendai ou HSV1, STING était plus vite dégradé lorsque l'expression de RNF26 était abolie (Qin, 2014 ; Ma, 2016). Curieusement, cette protéine régulerait aussi négativement la réponse immunitaire innée puisqu'un knock-down de la protéine est à l'origine de l'inhibition de la réplication des virus VSV et HSV-1, suggérant ici une activité de régulateur négatif de la réponse antivirale (Qin, 2014).

I-4.1.3. Inactive rhomboid protein 2 (iRhom2) et Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 5 (EIF3S5)

iRhom2, une autre protéine responsable de la régulation positive de STING, est une protéine à sept domaines transmembranaires, tout comme STING.

Les rhomboïdes sont une famille de sérines protéases intramembranaires. Elles ne possèdent pas de résidus catalytiques mais sont impliquées dans de nombreuses voies de signalisation, tant dans la croissance cellulaire, que le remodelage mitochondrial, en passant par l'apoptose et la sécrétion protéique (Freeman, 2008 ; McIlwain, 2012). iRhom2 est notamment connue pour entraîner la production de TNF α (pour *Tumor necrosis factor α*) après induction par le LPS ou *Listeria monocytogenes*, en permettant la maturation et le trafic de l'enzyme responsable de la synthèse du TNF α , TACE (pour *TNF α converting enzyme*) (McIlwain, 2012).

Par screening d'une banque de cDNA en fonction de l'habilité des protéines codées à réguler ou non ISRE, Luo et collègues ont pu identifier iRhom2 comme **régulateur positif de la réponse immunitaire innée suite à la détection d'ADN viral**. En effet, **la phosphorylation tant de TBK1, d'IRF3 que d'I κ B α apparaît inhibée suite à un KO de iRhom2**. D'autres arguments lient ce régulateur à STING, et notamment le fait qu'il soit majoritairement localisé au niveau du RE et de l'appareil de Golgi. Luo et collaborateurs ont en effet pu remarquer, qu'après infection de cellules HeLa par HSV-1, iRhom2 se dissocie du RE pour migrer vers l'appareil de Golgi et les lysosomes. De plus, un traitement par

Brefeldin A (capable d'inhiber le transport protéique du RE au Golgi) est capable d'inhiber l'effet positif obtenu entre iRhom2 et l'activation du promoteur à l'IFN β , suggérant donc que iRhom2 est nécessaire au trafic de STING vers les vésicules périnucléaires.

Etant associé avec les protéines TRAP β et Sec5, molécules impliquées dans la translocation de STING du RE vers les vésicules périnucléaires, **iRhom2 permettrait donc l'activation de STING en recrutant les protéines du complexe d'exocytose et du translocon (Figure 18).**

Enfin, Luo et collaborateurs ont pu démontrer qu'iRhom2 était responsable de la déubiquitination en K48 de STING, sans pour autant posséder une activité de déubiquitinase, ainsi ces auteurs ont cherché quels étaient les partenaires d'iRhom2 responsables d'une telle activité. Il s'agirait d'EIF3S5. **iRhom2 permet donc le recrutement de EIF3S5 vers STING au niveau du RE et de l'appareil de Golgi, et est impliqué dans sa stabilisation puisqu'elle permettrait, via EIF3S5, la déubiquitination des motifs ubiquitine liés à la lysine K48 responsable de la dégradation de STING par le protéasome (Luo, 2016).**

I-4.1.4. Zinc finger DHHC domain-containing protein 1 (ZDHHC1), Autocrine motility factor receptor (AMFR) et Insulin-induced gene 1 (INSIG1)

Enfin, la molécule **ZDHHC1** a été découverte par Zhou et collègues par un screening de protéines capables d'activer le promoteur de l'IFN β . En effet, un KO de ZDHHC1 chez la souris altère la production d'IFN I et d'autres cytokines pro inflammatoires en réponse à une infection par un virus à ADN. En outre, ces souris semblent plus sensibles aux infections léthales par HSV1. **Constitutivement associée à STING, ZDHHC1 est donc nécessaire à sa dimérisation et ainsi au recrutement de TBK1** puisqu'un déficit d'expression de ZDHHC1 entraîne une diminution de la dimérisation de STING. Ce régulateur agirait donc en amont de la cascade de signalisation de STING (Zhou, 2014).

Cette liaison de STING avec ZDHHC1 permettrait enfin le recrutement de AMFR via INSIG1 (Figure 18).

Initialement connu comme promoteur de la dégradation de l'HMG-CoA réductase (Goldstein, 2006), INSIG1 fut identifiée par l'équipe de Wang et collaborateur comme nécessaire à l'interaction entre AMFR et STING après infection par HSV-1.

Des cellules KO (BMDMs pour *Bone marrow derived macrophages*) pour la protéine INSIG1 présentent une ubiquitination moins importante de STING, un recrutement et une translocation de

TBK1 dans des vésicules périnucléaires moins efficace et en conséquence, une production moindre d'IFN β . Des souris KO pour *Insig1* seraient ainsi plus sensibles aux infections par HSV-1.

En 2014, Wang et collègues ont montré qu'AMFR serait recrutée par INSIG1 afin de catalyser la polyubiquitination K27 de STING, responsable de son activation. D'autre part, sa localisation semble primordiale puisqu'une localisation au RE est essentielle pour permettre l'activation de la voie STING. INSIG1 servirait donc de pont entre STING et AMFR (Wang, 2014).

I-4.2. Régulation négative de la voie de STING

De nombreux régulateurs négatifs de STING, voie majeure dans l'immunité antivirale, ont eux aussi été identifiés. Tandis que des motifs ubiquitines liés entre eux selon une certaine configuration (K11, K63..) vont être responsables de l'activation de STING, d'autres vont au contraire promouvoir sa dégradation (K48). Ainsi, il existe un type d'enzymes, les déubiquitinases, dont le rôle sera d'ôter les motifs ubiquitine activant STING. D'autres enzymes (telles que PPM1a ou NLRC3, développées plus loin), vont agir plus tardivement, au niveau du complexe STING/TBK1.

I-4.2.1. TRIM30 α (pour Tripartite motif-containing protein) et RNF5 (pour Ring finger protein 5)

Comme mentionné précédemment, certaines ubiquitine ligases vont mettre en place une boucle de rétrocontrôle négatif et inhiber STING.

C'est le cas par exemple de **TRIM30 α** , décrite récemment comme régulateur négatif de STING (Wang, 2015). En effet, cette ligase est connue pour réguler négativement la signalisation du TLR4 en ciblant les protéines TAB (pour *TAK1-binding protein*) 2 et 3 du complexe TAB2-TAB3-TAK1, responsable de l'activation du facteur de transcription NF- κ B (Shi, 2008). C'est pourquoi Wang et collègues ont voulu déterminer son rôle dans le contrôle de la réponse immunitaire innée en se focalisant notamment sur STING.

Ils ont en effet pu observer qu'un knock-down de TRIM30 α dans une lignée cellulaire murine augmentait la production d'IFN I et d'IL-6, ainsi que la phosphorylation des facteurs de transcription IRF3 et NF- κ B après traitement par de l'ADN viral. Une déficience en TRIM30 α octroie donc une meilleure protection contre des infections virales à ADN chez la souris. Après avoir vérifié qu'une colocalisation existait bien entre TRIM30 α et STING, les auteurs ont pu observer que l'interaction entre ces deux protéines était responsable d'une dégradation de STING via le protéasome, puisque qu'une surexpression de la ligase améliorait l'ubiquitination via la sérine K48 mais pas K63. Or l'ubiquitination liée à la protéine K48 est généralement associée à une dégradation par le

protéasome. **TRIM30 α** est donc aujourd'hui considérée comme un régulateur négatif de la réponse immunitaire innée suite à la détection d'ADNdb, et ce, en promouvant l'ubiquitination liée à la sérine K48 de la protéine STING (Figure 18) (Wang, 2015).

L'ubiquitine E3 ligase RNF5 a elle aussi été classée au rang de régulateur négatif de STING. En effet, cette protéine transmembranaire, localisée au niveau de la mitochondrie et du RE, va, elle aussi, fixer des résidus ubiquitine liés à la lysine K48 sur STING. Ceci dans le but de permettre une reconnaissance par le protéasome et, en conséquence, la dégradation de STING (Zhong, 2009).

I-4.2.2. Ubiquitin-specific protease 13 (USP13)

A l'inverse des molécules précédemment citées qui fixent des motifs ubiquitine sur STING, la protéine **USP13 va déubiquitinyler STING**. Cette modification ne fragilise toutefois pas l'association de STING avec AMFR ou TRIM32, responsables respectivement de l'ubiquitination K27 et K63 de STING. Elle va cependant ôter les résidus K27 (mais pas K63), empêchant en conséquence le recrutement de TBK1 par STING. **Ainsi, USP13 est nécessaire à la régulation négative de la réponse anti-virale via une déubiquitination de STING (Figure 18)**.

On peut donc aisément comprendre qu'un KO de cette protéine sera responsable de l'activation des facteurs de transcription IRF3 et NF- κ B suite à une infection par HSV-1, et ainsi de la mise en place d'une réponse antivirale efficace avec l'induction de cytokines pro-inflammatoires et des IFN I. En effet, il a été démontré que des cellules déficientes pour USP13 étaient capables d'empêcher la réplication du virus HSV1 et que des souris déficientes pour cette protéine étaient plus résistantes que des souris contrôles à une infection létale par ce virus.

Ainsi, USP13 jouerait un double rôle, assurant à la fois une réponse immunitaire de base dans des conditions physiologiques, de même qu'évitant une réponse inflammatoire excessive qui pourrait être engendrée en cas d'infection virale, puisque cette déubiquitination de STING par USP13 se produit à la fois en présence et en l'absence de pathogènes (Sun, 2017).

I-4.2.3. RIG-I et IL-6

Compte tenu de la complexité de la voie STING, de nombreux régulateurs sont sûrement encore à découvrir.

Récemment, Wu et collègues ont pu mettre en évidence le rôle de RIG-I dans cette voie (Wu, 2017). RIG-I, comme évoqué précédemment, est une hélicase permettant la reconnaissance d'ARNdb viral. Elle est associée à la protéine MAVS et conduit, tout comme STING, à l'activation de TBK1 et NF- κ B afin d'engendrer la production d'IFN I (Kato, 2006 ; Kato, 2008). Compte tenu du lien étroit entre les

2 voies, il n'est pas étonnant de constater que **STING est en réalité un co-facteur de la réponse médiée par RIG-I suite à une infection par un virus à ARNdb** (Yonemaya, 2009), et que suite à la présence d'ARN triphosphate, ligand direct de RIG-I, **RIG-I permet d'induire l'augmentation de l'expression de STING** (Liu, 2016).

Cependant, en présence d'ADNdb, RIG-I fonctionne comme régulateur négatif de STING. En effet, Wu et collègues ont pu mettre en évidence, dans une lignée de cellules diploïdes humaines appelées MRC-5, qu'une augmentation de l'expression de RIG-I était corrélée à une diminution de l'expression de STING, et vice versa. Cette diminution n'étant que partielle, d'autres acteurs seraient impliqués dans cette régulation. En effet, l'IL-6, cytokine clé dans la régulation de l'inflammation, jouerait avec RIG-I le rôle de co-régulateur négatif de STING, afin d'empêcher une réponse excessive suite à une infection virale. Par ailleurs, Wu et collègues démontrèrent que la déficience pour l'une ou l'autre de ces molécules était responsable de la déphosphorylation, et donc de l'inactivation d'ULK1 (voir paragraphe suivant). Ainsi, cette dégradation de STING via l'action de RIG-I et de l'IL-6 passerait par l'activation de ULK1 (**Figure 18**) (Wu, 2017).

I-4.2.4. STING et la machinerie autophagique

L'autophagie, un processus permettant de dégrader des composants cytoplasmiques dans des vésicules à double membrane afin de maintenir l'homéostasie cellulaire, joue un rôle majeur dans la défense de l'organisme. Ce processus va permettre d'éliminer les pathogènes et d'induire la réponse immunitaire acquise (Deretic, 2005 ; Levine, 2009). Certains autophagosomes pouvant contenir des bactéries se forment notamment grâce à la protéine Rab7, engendrant donc la destruction de ces dernières, telles que dans les cas d'invasion par *Streptococcus pyogenes* et *Coxiella burnetii*. Cette autophagie antibactérienne particulière est connue sous le nom de xénophagie (Saitoh, 2010).

L'autophagie est généralement mise en place suite à l'inhibition de la kinase mTOR (pour *mammalian target of rapamycin*). Cette dernière inhibe en effet ULK1 (pour *UNC51-like kinase 1*, ou ATG1) en le phosphorylant. Son inhibition active ULK1 qui pourra alors à son tour phosphoryler ses substrats et permettre leur translocation du cytosol vers le RE et conduisant alors au recrutement du complexe PI3K (pour *phosphatidylinositol 3-kinase*) incluant VPS34, VPS15, Beclin1 et ATG14L. Ce complexe sera ensuite responsable du recrutement d'effecteurs permettant finalement la formation de l'autophagosome (Levine, 2009).

Comme mentionné précédemment, ULK1 est une sérine/thréonine kinase dont l'un des rôles est de phosphoryler STING après activation sur sa sérine S366 (S365 chez la souris). Konno et collègues ont en effet démontré que cette phosphorylation n'affectait en rien le trafic de STING vers le Golgi,

confirmant là une modification survenant après migration vers l'appareil de Golgi. Ceci atténuerait l'activation d'IRF3, suggérant ici une boucle de rétrocontrôle négative. En effet, la même équipe a pu démontrer que cette phosphorylation affectait spécifiquement IRF3 et la production d'IFN β , mais pas fortement celle de NF- κ B (Konno, 2013). La sérine 366 sert en effet de site d'ancrage (avec la lysine 374) à IRF3. **Une phosphorylation de STING par ULK1 empêcherait donc cette interaction STING/IRF3 (Figure 18).**

Il faut tout de même noter qu'alors que certaines équipes ont mis en évidence que cette phosphorylation sur la sérine S³⁶⁶ permettait la dégradation de STING, d'autres démontrèrent qu'elle était nécessaire au recrutement de IRF3, et à son activation consécutive par TBK1 (Liu, 2015).

La régulation de la kinase ULK1 implique en outre la voie AMPK (pour *AMP-activated protein kinase*) et mTOR (Alers, 2012). L'AMPK, un senseur métabolique clé de la cellule permettant de maintenir son homéostasie énergétique, est notamment activé en cas de stress environnemental, comme par exemple un efflux de calcium ou une consommation d'ATP. En condition basale, l'AMPK maintient ULK1 dans un état inactif. En cas de stress, ULK1 sera alors phosphorylé et libéré de son association avec l'AMPK, lui permettant alors de phosphoryler à son tour ses protéines cibles, dont STING.

Une étude plus fine a permis de mettre en évidence le fait qu'après traitement par de l'ADNdb, la phosphorylation de ULK1 en S758 ne semblait pas affectée tandis que celle de l'AMPK était significativement réduite, diminuant en conséquence la phosphorylation de ULK1 (effet retrouvé lors d'une infection par HSV1). Ceci suggère que la régulation de ULK1 impliquée dans la voie STING passe uniquement par l'AMPK. Ceci fut confirmé lorsqu'ils inhibèrent l'AMPK au moyen du composé C (inhibiteur pharmacologique) dans une lignée immortalisée de fibroblastes humains (hTERT-BJ1), la production d'IFN I étant abolie à la suite de l'injection d'ADNdb, confirmant l'inhibition de ULK1 par l'AMPK. De plus, une inhibition de l'AMPK, de même qu'une délétion d'ULK1, semblent stabiliser la protéine STING, indiquant cette fois que la phosphorylation de la protéine par ULK1 entraîne sa dégradation (Konno, 2013 ; Saleiro, 2015).

De façon surprenante, Konno et collaborateurs ont pu identifier cGAS comme étant essentielle pour la dégradation de STING via l'activation de la voie AMPK/ULK1. De la même façon, **cGAMP est lui aussi responsable de la déphosphorylation de l'AMPK et donc du relargage de ULK1, conduisant là aussi au recyclage de STING. Ainsi, les di-nucléotides cycliques, alors même à l'origine de l'activation de STING, permettent de réguler son activité via une boucle de rétrocontrôle négatif mettant en jeu des protéines de la machinerie autophagique (Konno, 2013).**

Ainsi, via une boucle de rétrocontrôle, les CDNs sont capables d'inhiber l'AMPK, activant alors ULK1. Cette dernière sera ensuite à l'origine de l'inhibition de STING par phosphorylation.

Il a en outre été précédemment démontré que la translocation de STING vers les vésicules périnucléaires était nécessaire à l'activation de sa cascade de signalisation (Saitoh, 2009 ; Burdette, 2013). Néanmoins, la dégradation de STING suite à son activation ne nécessite pas la formation d'autophagosomes puisqu'aucune structure à double membrane n'a été observée après stimulation par de l'ADNdb. De plus, Atg (pour *Autophagy related genes*) 7, nécessaire à la formation de l'autophagosome, ne semble pas jouer de rôle important dans la régulation de la réponse immunitaire induite par l'ADNdb, puisque la production de cytokines pro-inflammatoires, de même que la translocation de STING, se fait normalement dans des MEFs KO pour ce gène. La même conclusion a pu être établie pour Atg16L1. Par ailleurs, il a été démontré que les vésicules contenant STING à la sortie du Golgi étaient en réalité des endolysosomes (Saitoh, 2009). Enfin, Gonugunta et co-auteurs ont pu observer que le trafic cellulaire de STING n'était pas altéré en cas de KO du cœur autophagique (Atg3, Atg5 et Atg9a), suggérant donc que certaines protéines de la machinerie autophagique sont impliquées dans la régulation de la voie STING, mais que la machinerie autophagique en soi n'est pas impliquée dans ce processus (Gonugunta, 2017). **Tout ceci démontre ainsi que les protéines de la machinerie autophagique nécessaires à la translocation de STING agissent indépendamment du processus autophagique (Xie, 2007).**

ULK1 (précédemment décrit), p62 (alias SQSTM1 pour *Sequestosome 1*), LC3 et Atg9 notamment, régulent cette voie afin de maintenir un niveau basal de STING tout en empêchant une réponse excessive aux pathogènes (Saitoh, 2009 ; Konno, 2013). En effet, LC3 et Atg9 colocalisent avec STING après stimulation par de l'ADNdb.

Si l'on s'intéresse de plus près à Atg9, il apparaît que la migration de STING du RE vers l'appareil de Golgi se fait normalement dans des MEFs KO pour Atg9. Cependant, tant sa migration du Golgi vers les vésicules périnucléaires, que l'association avec TBK1 et la phosphorylation du facteur de transcription IRF3, sont fortement favorisées en cas de KO pour la protéine autophagique, laissant donc supposer que **Atg9 joue le rôle de régulateur négatif de la voie STING (Saitoh, 2009 ; Saitoh, 2010).**

Alors que l'autophagie peut être non sélective, certains récepteurs peuvent se lier à des molécules spécifiques et entraîner leur dégradation suite à l'incorporation dans des autophagosomes (Levine, 2011). Ces récepteurs sont en effet capables de cibler des protéines ubiquitinylées et de les entraîner vers les autophagosomes via interaction avec LC3. Dans la mesure où cette modification protéique

est majoritaire en cas d'activation par les PRR, on comprend aisément le lien pouvant exister entre la réponse immunitaire et la machinerie autophagique.

Prabakaran et collaborateurs ont d'ailleurs démontré que le récepteur autophagique spécifique des résidus ubiquitine p62/SQSTM1 était essentiel pour la dégradation de STING suite à une stimulation par de l'ADN ou cGAMP. En effet, **après son ubiquitylation via les sérines K63, STING sera recruté au niveau de compartiments positifs pour p62**. Cette protéine semble somme toute importante pour la régulation de la signalisation STING et, en corolaire, l'ubiquitination de STING paraît importante pour son interaction avec p62, suggérant donc que la machinerie autophagique, et plus précisément p62, est essentielle à la dégradation de STING après stimulation (Prabakaran, 2018). Finalement, **ces structures positives pour STING-p62 se trouvent être aussi fortement positives pour les protéines LC3 et LAMP1** (pour *lysosome-associated membrane protein 1*), marqueur lysosomal, mettant donc la machinerie autophagique au cœur de la migration de STING vers des compartiments de type lysosomaux après stimulation de STING.

Une stimulation par de l'ADN ou le ligand cGAMP serait ainsi responsable de la conversion de la protéine LC3-I en LC3-II et ainsi du recrutement de LC3 au niveau de STING (Saitoh, 2009 ; Konno, 2013). Ces vésicules STING-LC3 s'accumulent en effet après activation de STING et **une inhibition de l'autophagie permettrait d'empêcher la dégradation de STING suite à son activation**. En effet, Prabakaran et collègues ont mis en évidence ce fait en inhibant la machinerie autophagique au moyen d'un KO des gènes Atg3 ou ULK1, mais observèrent aussi ce phénomène grâce à une inhibition pharmacologique au moyen de la 3-méthyladénine qui cible le complexe PI3K de classe 3 (composé de Vps34 et Vps15), ou la bafilomycine qui empêche la fusion de l'autophagosome avec les lysosomes (Prabakaran, 2018).

La machinerie autophagique agirait donc comme un rétrocontrôle négatif de l'activation de STING, en plus de participer à sa migration hors du RE.

Finalement, Konno et collaborateurs ont alternativement délété VPS34 (PI3K de type 3), Beclin-1 ou ULK1 dans une lignée de fibroblastes. Ces trois composants sont en effets des acteurs majeurs du processus autophagique en cas de carence en nutriments (Yu, 2017). De façon intéressante, **seule la délétion de VPS34 inhibe le trafic de STING**, indiquant de ce fait un processus indépendant de ULK1. De la même façon, la seule suppression de VPS34 était capable d'empêcher la production d'IFN I par STING en présence d'ADNdb, alors qu'au contraire, de façon logique, la délétion de ULK1 permettait d'augmenter cette production. VPS34 serait donc un régulateur, mais cette fois positif, de la signalisation de STING, mettant en évidence la dualité du rôle autophagique dans le contrôle de cette voie (Konno, 2013).

Ainsi, la machinerie autophagique est fortement liée à l'activité de STING. Elle permet, outre sa translocation dans les vésicules périnucléaires, de réguler finement sa signalisation.

ULK1, p62, LC3 et Atg9 vont mettre en place une régulation négative de STING en favorisant sa dégradation tandis que VPS34 permet d'augmenter la production d'IFN β via STING.

I-4.2.5. NLRC3 et NLRX1 (pour NOD-like receptor C3 ou X1)

Finalement, alors que la plupart des régulateurs agissent directement sur la protéine STING, d'autres vont plutôt agir sur le complexe STING/TBK1.

La plupart des NLRs, comme évoqué précédemment, participent à la mise en place de la réponse inflammatoire de façon à permettre une défense efficace contre les pathogènes.

De nombreuses études ont cependant montré une régulation négative de cette réponse immunitaire par les NLRs (Allen, 2011 ; Anand, 2012 ; Schneider, 2012). Pour exemple, Zhang et collègues ont démontré que NLRC3 était responsable de la diminution de l'activation de NF- κ B en inhibant TRAF6 (Schneider et al., 2012).

Néanmoins, peu de choses sont décrites à l'heure actuelle concernant l'association entre les NLRs et les senseurs d'ADN. Zhang et collaborateurs ont cependant pu démontrer qu'un défaut de NLRC3 conduisait à une augmentation de la réponse immunitaire innée en réponse à de l'ADN intracellulaire et du c-di-GMP, à la fois dans les cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques. Ceci suggère donc un lien entre STING et les NLRs, en particulier avec NLRC3 et NLRX1. Ce n'est cependant pas valable pour d'autres molécules de la même famille telles que NLRP3, NLRP11, NLRC5 ou NOD2. En effet, un KO de *Nlr3* dans des cellules infectées par du c-di-GMP conduisait à une augmentation d'IFN β , et NLRC3 réduisait significativement l'activation du promoteur de l'IFN β .

N'ayant pas d'effet direct sur IRF3, il fut donc suggéré que NLRC3 jouerait un rôle en amont du complexe STING/TBK1. En effet, ils observèrent qu'en présence de NLRC3, le trafic cellulaire de STING vers les régions périnucléaires était fortement diminué. En outre, **NLRC3 interagissait avec STING et TBK1 et amoindrirait leur interaction à l'état basal**, cette inhibition étant encore plus prononcée après infection par HSV-1 (Zhang, 2014).

De la même façon, des cellules de type MEFs KO pour *Nlr1* ont montré une production accrue d'IFN β et d'IL-6 en présence d'ADN, de GMP cyclique ou de cGAMP, ainsi qu'une phosphorylation plus importante de TBK1, cohérent avec les résultats cités puisque cette phosphorylation est nécessaire à la production d'IFN I et de cytokines proinflammatoires après activation de STING. Des concentrations croissantes de NLRX1 engendrent une interaction amoindrie entre STING et TBK1,

permettant à l'équipe de Guo de classer NLRX1 comme régulateur négatif de STING (Dempsey, 2015 ; Guo, 2016).

Enfin, Guo et collaborateur ont pu montrer qu'en l'absence de STING, l'expression d'IFN β et de certains ISGs est abrogée suite à une infection par HIV, que NLRX1 soit exprimé ou non. Au contraire, un knock-down de NLRX1 en présence de STING permet une augmentation de l'expression à la fois de l'IFN β et des ISGs. NLRX1 favorise donc l'infection à HIV-VSV en permettant l'augmentation de la charge virale, via la réduction de l'expression d'IFN β suite à une régulation négative de la réponse immunitaire médiée par STING (Guo, 2016).

l-4.2.6. Protein phosphatase, Mg²⁺ /Mn²⁺-dependent, 1A (PPM1A)

Pour finir, un autre groupe identifia **PPM1A** comme protéine régulatrice de la voie STING, interagissant avec la partie C-terminale de STING (Li, 2015). PPM1A est un membre de la famille des PP2C (pour *Protein phosphatase 2C*), connue pour réguler négativement les voies induites en cas de stress cellulaire (Tatekawa, 1998), et impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire en déphosphorylant les kinases dépendantes des cyclines (CDK pour *Cyclin dependent kinase*) (Cheng, 1999), et finalement en inhibant la translocation de NF- κ B par une déphosphorylation d'IKK β et de p65 (Sun, 2009). Une précédente étude avait déjà pu mettre en évidence l'association entre PPM1B et TBK1, régulant négativement l'activation de cette dernière (Zhao, 2012). Il n'est donc pas surprenant de constater que **PPM1A régule négativement la voie STING**. En effet, une inhibition de PPM1A dans des HEK293T (via l'utilisation de siRNA) montre une exacerbation de la voie STING avec une augmentation de la phosphorylation de TBK1 et en conséquence de la dimérisation d'IRF3 (Li, 2015).

En outre, Li et co-auteurs purent mettre en évidence que STING et TBK1 s'inter-réguleraient : en effet, STING, via son interaction avec TBK1, permet sa relocalisation et ainsi son activation, tandis que TBK1 facilite, via son activité kinase, l'agrégation de STING. PPM1A agit quant à lui sur les deux fronts en conduisant à la déphosphorylation à la fois de STING, mais aussi de TBK1 elle-même, sensée s'autophosphoryler afin de conduire à l'activation de la voie STING (Li, 2015).

Comme mentionné plus haut, de nombreux senseurs d'ADN vont permettre l'activation de la voie STING, et notamment RIG-I, IFI16 ou encore DDX41. Néanmoins, la voie la mieux caractérisée à ce jour reste l'activation de STING via cGAS (alias Mb21d1).

II- cGAS

II-1. Découverte et description de la c-GMP-AMP synthase

Identifiée pour la première fois en 2012 par le groupe de Zhijian Chen ([Sun, 2013](#) ; [Wu, 2013](#)), la cyclique-GMP-AMP synthase (cGAS aussi appelée MB21D1, pour *Mab-21 domain containing 1*) fait aujourd'hui partie des plus importants senseurs d'ADN impliqués, entre autres, dans la réponse antivirale. Etant localisée à la fois dans le cytosol et au niveau de petites vésicules, **elle est responsable de la détection d'ADN cytosolique (simple ou double brin) d'origine microbienne, et permet de catalyser la synthèse de cGAMP en réponse à une stimulation par de l'ADN** ([Tao, 2016](#)).

Structurellement, cGAS possède une conformation bilobée alternant des structures en hélices α et feuilletts β ([Zhang, 2014](#)). Elle possède un domaine catalytique nucleotidyltransférase, situé au centre des feuilletts β , ainsi que 2 domaines de liaison à l'ADN situés sur la face opposée de la protéine ([Yin, 2015](#) ; [Chen, 2016](#)). En l'absence d'ADN, cGAS se trouve (comme STING) dans un état d'auto-inhibition et subit un changement conformationnel après liaison avec l'ADN, augmentant son activité catalytique de dinucléotide cyclase ([Chen, 2016](#)). Ceci permettra la synthèse de 2'3'-cGAMP après cyclisation d'un résidu 2'-5' au moyen de ponts phosphodiester entre le GMP et l'AMP (**Figure 17, page 48**) ([Ablasser, 2013](#)). Il a par ailleurs été observé une homologie de structure entre cGAS et OAS1, responsable quant à elle de la destruction de l'ARN viral et cytosolique ([Wu, 2014](#)) : ces deux protéines présentent cependant une différence de séquence dans la région de liaison au substrat, conférant à cGAS une affinité à l'ADN plutôt qu'à l'ARN ([Civril, 2013](#)).

Gao et collaborateurs ont démontré qu'une abolition de la production d'IFN β était observée en cas de knock-down (via l'utilisation de siRNA) de cGAS dans une lignée de fibroblastes murins (L929) en réponse à de l'ADN, mais que cette inhibition n'avait pas lieu en cas de stimulation par le virus Sendai, virus à ARN ([Gao, 2013](#)). Ainsi cGAS est bien spécifique de la détection d'ADN, et non d'ARN. La même observation a pu être faite dans des cellules humaines, les THP1 ([Sun, 2013](#)). De plus, Shoggin et collègues démontrèrent que des cellules issues de souris KO pour cGAS ne sont plus en mesure de produire des IFN I en réponse à une stimulation par de l'ADN viral, et qu'en conséquence ces souris sont beaucoup plus sensibles que les souris contrôles à une infection létale par un virus à ADN ([Schoggins, 2013](#)).

Enfin, cette enzyme, bien que spécifique de l'ADN en général, n'a cependant pas d'affinité particulière pour une séquence donnée. En effet, cGAS se lierait au niveau de la structure sucre-phosphate de l'ADN et non à ses bases ([Li, 2013](#)). C'est pour cette raison que des modifications de l'ADN, telles qu'une oxydation causée par une irradiation aux UV (pour *Ultra-violets*), n'améliore ni

n'affaiblit la liaison de cGAS à l'ADN. Par contre, cette oxydation rendrait l'ADN plus résistant aux nucléases telle que TREX1 (pour *3' repair exonuclease 1*), et donc augmenterait la quantité d'ADN présente dans le cytoplasme, augmentant ainsi l'activité de cGAS et ainsi la production accrue d'IFN I (Gehrke, 2013).

II-2. Activation de l'enzyme cGAS

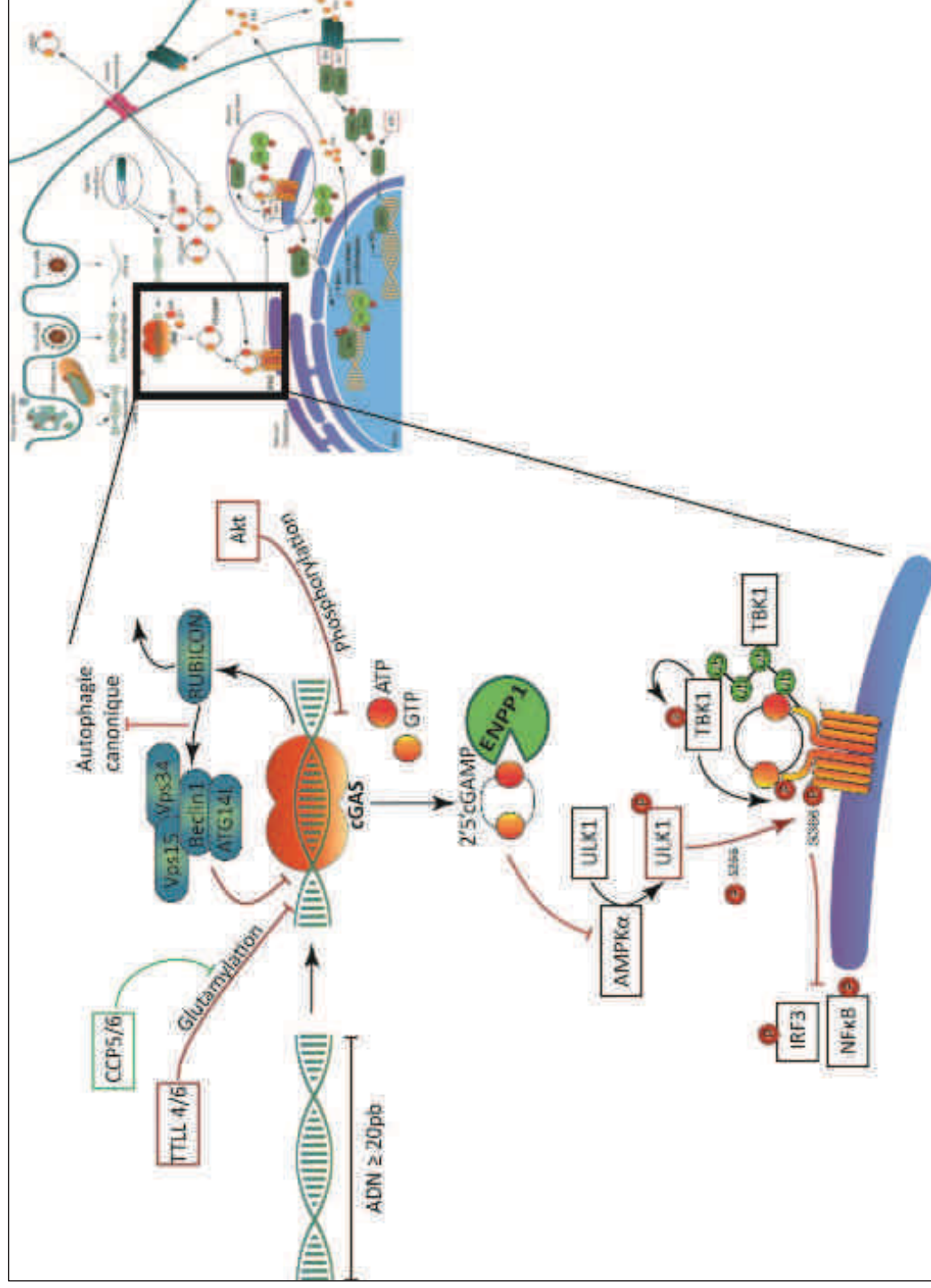
De façon intéressante, Ablasser et collaborateurs ont mis en évidence le fait que, outre son activation dans une cellule donnée suite à une infection, cGAS était capable d'activer ses homologues dans les cellules adjacentes. En effet, ils ont pu constater que l'infection d'une cellule conduit à la production de cGAMP suite à l'activation de cGAS, mais que cela se répercutait sur les autres cellules voisines au moyen des jonctions communicantes. Ceci permet alors de conduire à l'activation de STING et la production massive des IFN I, et donc de permettre une réponse anti-virale ou bactérienne rapide (**Figure 17, page 48**) (Ablasser, 2013).

En conditions physiologiques, cGAS est donc un senseur permettant la détection d'un large panel d'ADNs microbiens. De nombreuses études ont en effet mis en évidence une production d'IFN I dépendante de la voie cGAS-STING après infection par les virus de la vaccine, le cytomégalovirus, le virus HSV ou encore le MHV68 (pour *mouse hepatitis virus 68*) (Lio, 2016 ; Zhang, 2015 ; Wu, 2015 ; Ma, 2016).

Par ailleurs, **cGAS serait aussi un senseur clé des rétrovirus**, bien qu'en théorie ces derniers ne passent pas par le cytoplasme. En effet, dans des conditions physiologiques, une réaction de transcription réverse a lieu directement dans la capsid virale, permettant au virus d'injecter son ADN complémentaire dans le noyau afin qu'il soit intégré au génome de la cellule hôte. Dans des cas pathologiques, tels qu'une perte de fonction des exonucléases SAMHD1 (pour *SAM domain- and HD domain-containing protein 1*) ou TREX1, de l'ADN « rétroviral » peut être détecté dans le cytoplasme et activer ainsi cGAS (Rasaiyaah, 2013 ; Lahaye, 2013 ; Gao, 2013). Néanmoins, une régulation particulière existe pour les rétrovirus. En effet, la protéine PQBP1 (pour *polyglutamine-binding protein*) a récemment été identifiée comme facilitant la détection de cet ADN rétroviral (par exemple HIV-1) par cGAS. Cette protéine se lie directement à l'ADN rétrotranscrit et interagit avec cGAS afin d'initier la réponse immunitaire via STING et IRF3. PQBP1 et cGAS forment ainsi un complexe à fonction de PRR permettant la mise en place d'une réponse spécifique aux rétrovirus. Un KO de PQBP1 inhibe ainsi la production d'IFN I suite à une infection par HIV-1 (Yoh, 2015).

Enfin, **de nombreuses bactéries sont responsables de l'activation de cGAS suite à l'entrée d'ADN bactérien au niveau cytoplasmique.** Parmi elles, *Mycobacteria*, *Legionella*, *Shigella*, *Francisella*,

FIGURE 19 : Régulation de cGAS – cGAMP



De la même façon que STING, cGAS est régulée par de nombreuses protéines. En particulier, **Beclin-1**, impliquée dans le complexe PI3K à l'origine de la formation de l'autophagosome, interagit directement avec cGAS afin d'inhiber son activité catalytique. Ceci permettrait en outre le relargage de **Rubicon** du complexe Beclin-1. Rubicon étant un régulateur négatif de l'autophagie, son relargage du complexe Beclin-1 activerait celui-ci et la machinerie autophagique. cGAS peut aussi être inhibée par glutamylation, une modification permettant la liaison covalente avec un acide glutamique. Elle est catalysée par des glutamylases, **TLL4** et **6**. Ce phénomène de glutamylation peut être réversé par des carboxypeptidases, **CCP5** et **6**. De plus, Akt régule négativement la voie STING en phosphorylant cGAS, en supprimant ainsi l'activité enzymatique de la protéine. Enfin, une certaine longueur de séquence est nécessaire à l'activation de cGAS puisque de petits ADN d'environ 15 paires de base sont suffisants pour se lier mais pas pour permettre son activation. A l'identique, cGAMP est recyclé par l'enzyme ENPP1, une phosphodiesterase responsable du clivage des ponts phosphodiesters entre les molécules d'AMP et GMP.

Abréviations : **ADN**, Acide désoxyribonucléique ; **AMP**, Adénosine monophosphate ; **AMPK**, AMP-activated protein kinase ; **ATG14L1**, Autophagy-related gene 14L ; **CCP**, cytosolic carboxypeptidase ; **cGAMP**, cyclic GMP-AMP ; **cGAS**, cyclic GMP-AMP synthase ; **ENPP1**, Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase ; **IRF3**, Interferon regulatory factor 3 ; **IRF3**, IFN regulatory factor ; **NF-κB**, Nuclear factor-κB ; **Rubicon**, Run domain- and cysteine-rich domain-containing beclin-1-interacting protein ; **TBK1**, TANK-binding kinase 1 ; **TLL**, Tubulin tyrosine ligase-like ; **ULK1**, UNC51-like kinase 1 ; **Vps**, alias **PIK3C3**, Phosphatidylinositol 3-kinase, class 3.

Chlamydia, *Neisseria* ou encore le groupe B des Streptocoques (Marinho, 2017), tandis que d'autres, telles que *Listeria monocytogenes* induisent à la fois une production d'IFN I, dépendante de la voie cGAS/STING, mais aussi une production indépendante de cGAS, puisque cette bactérie produit directement des dinucléotides cycliques à l'origine de l'activation de STING (Hansen, 2014).

II-3. Régulation

De la même façon que STING, et afin de protéger l'organisme contre une réponse inflammatoire excessive, cGAS est finement régulée (Figure 19).

II-3.1. Régulation par l'autophagie

Nous avons vu précédemment que l'autophagie, outre son rôle dans la translocation de STING du RE vers des vésicules périnucléaires, était aussi largement impliquée dans sa régulation. Il en va de même pour cGAS puisque **Beclin-1, par exemple, impliquée dans la formation de l'autophagosome, interagit directement avec cGAS afin d'inhiber son activité catalytique.** De plus, la liaison de cGAS à Beclin-1 permettrait le relargage de Rubicon du complexe Beclin-1. Rubicon est un régulateur négatif de l'autophagie, et cGAS et Rubicon entrent en compétition pour la liaison à Beclin-1. Ainsi, le relargage de Rubicon activerait le complexe Beclin-1 et faciliterait la dégradation sélective de l'ADN cytosolique via la machinerie autophagique. En conclusion, **après stimulation par de l'ADNdb, Rubicon se dissocie progressivement du complexe Beclin-1-PI3K, à mesure que cGAS s'y lie** (Liang, 2014). Ainsi, la liaison de cGAS au complexe Beclin-1 conduit à l'inhibition de cGAS (Figure 19). Cette inhibition, bien que délétère pour la mise en place d'une forte réponse IFN, et donc anti-virale, serait donc compensée par la dégradation directe de matériel viral au sein de l'autophagosome et privilégierait ainsi la voie des TLRs (endosomaux).

II-3.2. Régulation par des modifications post-traductionnelles

Comme évoqué précédemment, les modifications post-traductionnelles des protéines telles que la phosphorylation, l'acétylation, l'ubiquitination, la glutamylation ou encore la glycosylation, permettent une régulation fine de leur activité.

La glutamylation est une modification permettant la liaison covalente d'un acide glutamique sur une protéine. La glutamylation de cGAS est catalysée par des enzymes appelées glutamylases, et nommées TTL (pour *Tubulin tyrosine ligase-like*) 4 et 6 (Janke, 2005). Cette régulation de cGAS a été découverte par Xia et collègues, qui ont montré que des souris déficientes pour les gènes *Ccp5* ou *6*, codant pour les enzymes CCP5 et CCP6 respectivement, étaient plus vulnérables à une infection par

HSV ou le virus de la vaccine (Xia, 2016). Ces carboxypeptidases (CCP pour *cytosolic carboxypeptidase*) sont en effet des enzymes permettant la réversion du phénomène de glutamylation car elles vont permettre d'ôter ces résidus glutamate (Rogowski, 2010). Par ailleurs, ces souris Ccp5^{-/-} produisent des concentrations plus faibles d'IFN I avec en particulier une diminution de la production d'IFN β , et montrent un défaut d'activation d'IRF3. Ceci suggère donc un rôle de cette modification dans la régulation de la voie cGAS-STING.

En effet, en recherchant des partenaires associés aux enzymes CCP5 et 6, Xia et collègues identifièrent cGAS. Une déglutamylation de cGAS permettrait son activation. Et alors que TTL4 est responsable d'une monoglutamylation de cGAS sur le résidu Glu302, inhibant l'activité synthase de cGAS, TTL6 est lui responsable d'une polyglutamylation sur le résidu Glu 272, abolissant sa capacité à lier l'ADN. Ce phénomène de glutamylation est donc à l'origine d'une régulation négative de cGAS en réponse à une infection virale par de l'ADN (Xia, 2016).

Enfin, de la même façon que la glutamylation, la phosphorylation est elle aussi responsable de la régulation fine de protéines.

Identifiée à la fois comme acteur dans le métabolisme, la survie cellulaire, la prolifération et la migration cellulaire, la voie de signalisation Akt joue un rôle central dans la cellule (Manning, 2017). Elle est activée par la PI3K, elle-même activée par les récepteurs aux IFN I et II (respectivement IFNAR et IFNGR) (Kaur, 2009), et active la protéine mTOR, un régulateur situé en amont de la traduction des ISGs (Kaur, 2008) : ainsi on peut supposer qu'elle joue aussi un rôle central dans la régulation de la production d'IFN I. En particulier, Akt régule négativement la voie STING en phosphorylant cGAS sur sa sérine 305 (chez l'Homme, 291 chez la souris), supprimant ainsi l'activité enzymatique de la protéine (Seo, 2015).

II-3.3. Régulation de cGAS via des mécanismes épigénétiques et boucle d'auto-régulation

Il a été démontré que, dans certaines lignées tumorales qui perdent l'expression de cGAS, l'utilisation d'inhibiteurs de la méthylation de l'ADN permettait de restaurer l'expression de cGAS suggérant donc une régulation via des mécanismes épigénétiques (Ma, 2015).

D'autre part, **les IFN I eux-mêmes exerceraient un rétrocontrôle positif et une amplification de la voie cGAS/STING**. En effet, il est admis aujourd'hui que cGAS fait partie des ISGs, induit donc par les IFN I, et que son expression est régulée par IFNAR. cGAS possède en effet un élément de réponse à l'IFN I dans son promoteur (ISRE). Enfin, Ma et collègues purent mettre en évidence le fait que dans

des macrophages médullaires (BMMs pour *Bone marrow macrophages*) IFNAR KO, cGAS n'était pas induit suite à une stimulation par cGAMP ou polydA:dT (Ma, 2015) suggérant donc que les IFN I régulent l'expression de cette enzyme.

II-3.4. Régulation par l'ADN

Etant activé exclusivement par de l'ADN, il paraît logique d'envisager un contrôle de l'activation de cGAS par l'ADN lui-même. Comme mentionné plus haut, **cGAS n'est pas activé par une séquence particulière de l'ADN. En revanche, une certaine longueur de séquence est nécessaire à son activation** puisque de petits ADN d'environ 15 paires de base ont une longueur suffisante pour se lier à cGAS mais pas pour permettre son activation.

En effet, outre la préférence de cGAS pour la forme B de l'ADN (Civril, 2013), la plus commune des doubles hélices retrouvées à pH neutre dans des conditions physiologiques, la réponse IFN I suite à la détection d'ADN cytosolique se trouve être dépendante de la longueur de l'ADN. Ainsi, il a été démontré qu'un minimum de 40 paires de bases était nécessaire à la mise en place d'une telle réponse. Luecke et collaborateurs ont pu montrer qu'à la fois la phosphorylation de TBK1, mais aussi la dimérisation de STING, étaient favorisées lorsque la taille de l'ADN augmente. Ils supposèrent que cette activation pouvait être liée à TREX1. En effet, cette exonucléase permet de dégrader dans le cytoplasme l'ADN potentiellement néfaste pour la cellule, qui pourrait engendrer une réponse IFN I excessive. Cette enzyme pourrait être plus efficace dans la dégradation des petits ADNs. Cependant, après transfection d'ADN de différentes tailles dans des cellules TREX1 KO, ces dernières se comportent de la même façon que des cellules WT, montrant que la dépendance à la longueur de l'ADN ne dépend finalement pas de TREX1. Luecke et collaborateurs démontrèrent ainsi que l'accumulation de cGAMP dépendante de la longueur du brin d'ADN après stimulation, était due à des propriétés intrinsèques à cGAS. **Ceci suggère donc que cGAS est bien activé par de longs ADNs**, notamment de façon à éviter une activation excessive liée à la présence de petits ADNs qui pourraient s'accumuler dans le cytoplasme des cellules comme sous-produit issu d'une division cellulaire, ou suite à la réparation de l'ADN par exemple, et qui pourrait conduire à une pathologie inflammatoire (Luecke, 2017).

III- cGAMP

III-1. Description

Les CDNs produits par les bactéries, tels que le c-di-GMP, c-di-AMP et 3'5'-cGAMP, diffèrent quelque peu du ligand 2'3'-cGAMP produit par l'enzyme cGAS à partir de l'ADN bactérien, et découvert par le groupe de Zhijian Chen (**Figure 17, page 48**) (Wu, 2013).

cGAS catalyse en premier lieu un résidu linéaire 2'5', qui subit par la suite une cyclisation via des liens phosphodiester 3'5' (Ablasser, 2013 ; Zhang, 2013). Ce résidu 2'5' est unique et rare, puisque les dinucléotides cycliques bactériens possèdent, pour leur part, 2 ponts 3'-5'-phosphodiester, et sont alors appelés 3'5' CDNs (Kranzusch, 2015).

D'autres analogues de ce second messenger existent, tel que le 3'3'-cGAMP (ou 3'3' CDN), découvert initialement dans la bactérie Gram- *Vibrio cholerae* (Davis, 2012) ou encore les 2'2'-cGAMP et 3'2'-cGAMP, ces derniers étant des analogues de synthèse et non des ligands existant à l'état naturel. De plus, bien que les cGAMPs se lient de façon équivalente à STING, le ligand naturel 2'5'-cGAMP est celui reconnu par STING avec la plus haute affinité (Gao, 2013).

III-2. Régulation

Outre sa capacité à l'activer, cGAMP permet aussi de réguler STING puisqu'il agit sur l'AMPK afin d'activer ULK1, responsable d'un contrôle négatif de la protéine STING (**Figure 18, page 52**) (Konno, 2013).

La voie cGAS-cGAMP-STING étant constamment et finement régulée, il existe également un turnover de cGAMP. En effet, l'enzyme **ENPP1** (pour *Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase*) a été identifiée comme étant **une phosphodiesterase responsable du clivage des ponts phosphodiester existant entre les molécules d'AMP et GMP, afin de recycler cGAMP**. Cette hydrolase est exprimée dans de nombreux tissus mais son activité n'est pas retrouvée au niveau cytosolique. C'est en effet une enzyme transmembranaire, suggérant donc que 2'3'-cGAMP doit être transporté jusqu'à la membrane afin d'être dégradé (**Figure 19, page 65**) (Li, 2014).

De la même façon que cGAMP régule STING, l'inverse est vrai aussi. En effet, il a été démontré que les concentrations de cGAMP étaient presque 10 fois supérieures dans des souris TREX1-/- STING -/- par rapport à des souris TREX1-/-, suggérant un rôle de STING dans la clairance de son ligand (Rodero, 2015).

IV- RESUME DE LA VOIE cGAS – cGAMP - STING

Ainsi, pour résumer, STING va se lier aux di-nucléotides cycliques synthétisés soit directement par les bactéries, soit à partir d'ADN modifié par cGAS. Cette liaison se fera avec l'aide de la molécule ZDHHC1 (Zhou, 2014), permettant le recrutement de la protéine AMFR au moyen de INSIG.

AMFR va donc catalyser la polyubiquitination de STING au moyen de sérines K27 (Wang, 2014). Les molécules RNF26 (Qin, 2014), TRIM56 (Tsuchida, 2010) et TRIM32 (Zhang, 2012) participent elles aussi à son activation par ubiquitination puisque responsable de la greffe de résidus polylysine K11 et K63.

Cette ubiquitination K11 améliore l'activation de STING puisqu'elle permet de déstabiliser l'ubiquitination K48 médiée par les régulateurs négatifs de STING, RNF5 (Zhong, 2009) et TRIM α 30 (Wang, 2015). En effet, une ubiquitination K48 amène STING à être dégradé et recyclé par le protéasome.

Une autre façon d'activer STING serait de conduire à sa déubiquitination K48 afin de désolidariser les motifs ubiquitine liés à la sérine K48 et contribuer au maintien de sa stabilité. C'est notamment le rôle de l'enzyme EIF3S5, recrutée par iRhom2 (Luo, 2016).

Une fois activé, STING migrera du RE à des vésicules périnucléaires où il interagira avec son partenaire TBK1, et avec le facteur de transcription IRF3. Cette translocation serait rendue possible grâce à la molécule iRhom2, responsable du recrutement de la protéine associée au translocateur TRAP β , ainsi que du complexe de l'exocyste (Luo, 2016).

D'autres molécules telles que ATG9a, NLRX1 ou NLRC3, vont être impliquées dans la régulation négative de STING en empêchant la complexation STING-TBK1 (pour ATG9a) ou en affaiblissant l'interaction entre STING et TBK1 (pour NLRX1 et NLRC3) (Zhang, 2014 ; Guo, 2016 ; Saitoh, 2009).

D'autres molécules de la machinerie autophagique (autre ATG9a) telles que ULK1 ou Beclin-1, vont réguler négativement la voie STING. En effet, ULK1 phosphorylera STING sur la sérine S³⁶⁶ afin de faciliter sa dégradation (Konno, 2013), Beclin-1 quant à lui agira en amont de la voie en inhibant cGAS (Liang, 2014).

STING est donc un activateur majeur de la production d'IFN I. Une fine régulation de cette voie est donc nécessaire afin d'éviter toute exacerbation pouvant conduire au développement de pathologies autoinflammatoires.

En effet, une surproduction persistante de l'IFN I est aujourd'hui responsable de pathologies que l'on classe à l'heure actuelle dans le groupe nouvellement décrit des interféronopathies (Rodero&Crow, 2017).

TABLEAU 8 : Les interféronopathies et la concordance des modèles murins

GENE	PATHOLOGIE	PHENOTYPE	REFERENCES Homme	MODELE MURIN	PHENOTYPE	CONCORDANCE phénotype Homme/souris	REFERENCES modèle murin
TREX1 (exonucléase) LOF	AGS	Encéphalopathie	Pascual, 2012	TREX1 KO	Mort prématurée (myocardite) Phénotype inflammatoire Auto-Ac	Partielle	Gall, 2012 ; Behrendt, 2014
	FCL	Engelures					
	LES	Auto-Ac anti-nucléaires, glomérulonéphrites					
SAMHD1 (triphosphatase / nucléase) LOF	AGS	Encéphalopathies	Liu, 2014 ; Jeremiah, 2014 ; Picard, 2016 ; Meht, 2017	SAMHD1 KO	Souris ne présentant pas de pathologie. Pas de phénotype cérébral (anormalités cérébrovasculaire observées chez le zebrafish)	Aucune	Behrendt, 2014 ; Pascual, 2012
	FCL	Engelures					
	CVD	Pathologie cérébrovasculaire					
TMEM173 (STING / senseur d'ADN) GOF	SAVI	Vasculopathie, ulcérations (notamment des extrémités) Fibrose pulmonaire	Liu, 2014 ; Jeremiah, 2014 ; Picard, 2016 ; Meht, 2017	STING N153S STING V155M	Inflammation pulmonaire, ulcérations de la peau Inflammation rénale et pulmonaire	Partielle	Warner, 2017 Bouis, 2018
	FCL	Engelures					
RNASEH2A (ribonucléase H) LOF	AGS	Encéphalopathie	Pizzi, 2015	Rnaseh2a G375/+ Rnaseh2a G375/G375	Viable et saine Létalité périnatale, pas de neuroinflammation	Aucune	Behrendt, 2014 ; Reijns, 2012
RNASEH2B (ribonucléase H) LOF	AGS	Encéphalopathie		Rnaseh2b KO Rnaseh2b A174T/A174T	Létalité embryonnaire Viable et asymptomatique		
RNASEH2C (ribonucléase H) LOF	AGS	Encéphalopathie		Rnaseh2c KO	Létalité embryonnaire		
POLA1 (ADN polymérase) liée à l'X	XLPDR	Infections récurrentes, inflammation organes, hyperpigmentation de la peau	Starokadomskyy, 2016	Pas de modèle murin	/	/	
ADAR1 (Adenosine déaminase spécifique de l'ARNdb) LOF	AGS	Encéphalopathie	Rutsch, 2015	Adar1 KO	Létalité embryonnaire Perte des cellules hématopoïétiques	Aucune	Gbehrendt, 2014 ; Gallo, 2017
	DSH	Dyschromatose					
	BSN	Encéphalopathie, retard développement et mental,					
	SP	Rigidité/contractures membres inférieurs - paraplégie					
IFIH1 / MDA5 (RLR, hélicase) GOF	AGS	Encéphalopathies	Jang, 2015	Ifih1 T946	Létalité embryonnaire partielle	Aucune	Gormann, 2017
	SP	Rigidité/contractures membres inférieurs - paraplégie					
	SMS	Calcifications aortiques, anomalies dentaires et ostéopénie/ostéolyse					
RIG-I (RLR, hélicase) GOF	SMS atypique	Calcifications aortiques, anomalies osseuses Dentition normale	Jang, 2015	RIG-I GOF	Augmentation survie après infection par Influenza	Aucune	Wang, 2017
SKIV2L (hélicase) LOF	THES	Diarrhées, dysmorphisme facial, anomalie capillaire	Fabre, 2012	Pas de modèle murin	/	/	
UPS18 (déubiquitinase) LOF	Pseudo-TORCH	Microcéphalie, calcification cérébrales	Meuwissen, 2016	USP18 KO	Développement de tumeurs	Aucune	Chinyetere, 2015
ISG15 (ISGylase) LOF	MSMD	Prédisposition aux infections virale et mycobactériennes	Bustamante, 2014	ISG15 KO	Susceptibilité accrue à de nombreux virus	Concorde	Speer, 2015
	ICC	Calcifications intra-crâniennes					
PSMB2 (protéase) LOF	PRAAS	Fièvres récurrentes, contracture des articulations, érythèmes nouveaux lipodystrophie	Arimochi, 2016 ; Dermott, 2015	Pas de modèle murin PSMB8 KO	Croissance normale, pas d'inflammation. Présentation antigénique inefficace, diminution masse grasseuse	Partielle	Kitamura, 2011
PSMB4 (protéase) LOF	PRAAS	Fièvres récurrentes, contracture des articulations, érythèmes nouveaux lipodystrophie					
PSMA3 (protéase) LOF	PRAAS	Fièvres récurrentes, contracture des articulations, érythèmes nouveaux lipodystrophie					
ACPS5 (phosphatase) LOF	SPENCD	Dysplasie osseuse avec implications neurologiques,	Bilginer, 2016	ACPS5 KO	Déformations, ostéopétroses	Partielle	Bune, 2001
	LES	Auto-Ac anti-nucléaires, glomérulonéphrite..					
	Cytopénies						
C1q (complexe du complément) LOF	LES	Auto-Ac anti-nucléaires, glomérulonéphrite..	Mitchell, 2002	C1q KO	Ac anti nucléaires, glomérulonéphrite	Totale	Mitchell, 2002

Abréviations : **Ac**, Anticorps ; **ACPS5**, Phosphatase, acid, type 5 ; **ADAR1**, Adenosine deaminase RNA-spécifique 1 ; **AGS**, Aicardi-Goutiere syndrome ; **BSN**, Bilateral striatal necrosis ; **C1q**, Complement component 1q ; **CVD**, Cerebrovascular disease ; **DSH**, Dyschromatosis symmetrica hereditaria ; **FCL**, Familial chilblain lupus ; **GOF**, Gain-of-function ; **ICC**, Intracranial calcification ; **IFIH1**, IFN-induced helicase C domain-containing protein 1 ; **ISG15**, Ubiquitin-like modifier ISG15 ; **LES**, Lupus érythémateux systémique ; **LOF**, Loss-of-function ; **MSMD**, Mendelian susceptibility to mycobacterial disease ; **POLA1**, Polymerase DNA A1 ; **PRAAS**, Proteasome-associated autoinflammatory syndrome ; **PSMB**, Proteasome subunit beta ; **RIG-I**, Retinoic acid inducible gene 1 ; **RNASEH2**, Ribonuclease H2 ; **SAMHD1**, SAM domain-and HD domain-containing protein 1 ; **SAVI**, STING-associated vasculopathy with onset in infancy ; **SKIV2L**, Superkiller viralicidic activity 2S ; **SMS**, Singleton-Merten syndrome ; **SP**, Spastic paraparesis ; **SPENCD**, Spondyloenchondrodysplasia ; **THES**, Tricho-hepato-enteric syndrome ; **TMEM173**, Transmembrane protein 173 ; **TORCH**, Toxoplasmosis, Other, Rubella, Cytomegalovirus and Herpes infections ; **TREX1**, 3' repair exonuclease 1 ; **USP18**, Ubiquitin-specific protease 18 ; **XLPDR**, X-linked reticulated pigmentary disorder

PARTIE III : STING et pathologies associées

I- LES INTERFERONOPATHIES

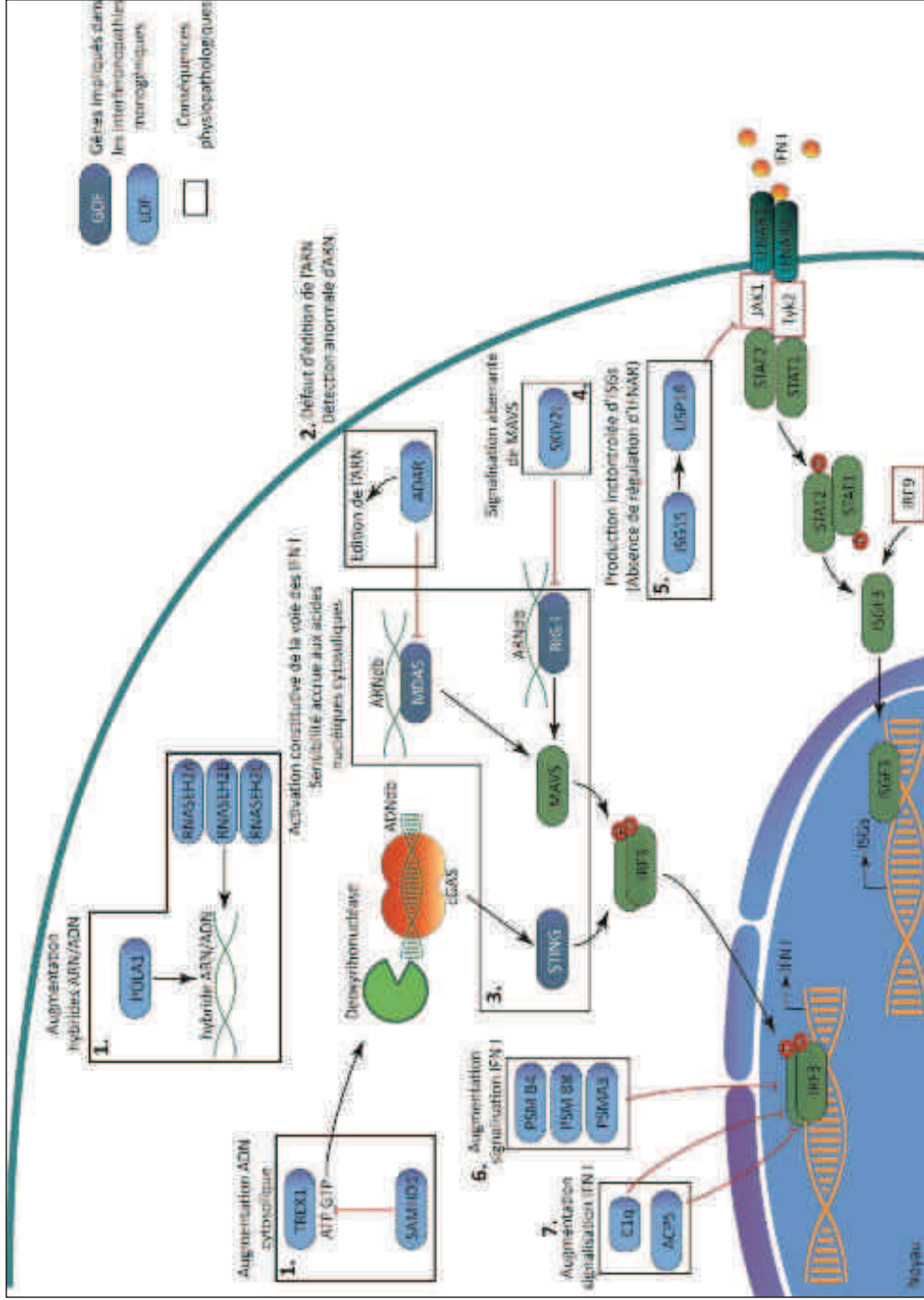
Ce groupe de pathologies a été définie relativement récemment, en 2003, le terme d'« interféronopathie » n'ayant été proposé qu'en 2011 (Crow, 2011). Il concerne des **maladies génétiques associées à une très forte production d'IFN I et une surexpression de gènes induits par les IFN I (ISGs)**. Crow et collaborateurs sont partis du postulat que, étant donné que certaines pathologies possédaient des caractéristiques physiopathologiques communes, elles pouvaient selon toute évidence partager une voie biologique commune. **A l'heure actuelle, des mutations dans près d'une vingtaine de gènes ont été imputées dans de telles pathologies et sont majoritairement responsables de déficits immunitaires et de maladies autoinflammatoires** (Crow, 2017). En effet, des pertes de fonctions de TREX1 (Abe, 2013 ; Stetson, 2008) ou SAMHD1 (Behrendt, 2013) sont responsables du développement du syndrome d'Aicardi-Goutières, du lupus à engelure (une forme rare de lupus érythémateux cutané de l'enfant, FCL pour *Familial chilblain lupus*, voir **Partie III paragraphe IV-1. STING et FCL, page 73**) ou respectivement impliquées dans le Lupus Erythémateux systémique (LES) et le CVD (pour *Cardiovascular disease*), une pathologie cérébrovasculaire.

D'autres mutations génétiques, conduisant à des pertes de fonctions de RNASEH2A/B/C (Mackenzie, 2016), ISG15, ou encore à des gains de fonctions de RIG-I (Jang, 2015) ou IFIH1 (Rice, 2014), sont à compter dans ce groupe. Ces pathologies sont référencées dans le tableau ci-dessous (**Tableau 8**).

La majorité de ces gènes codent pour des protéines impliquées dans la reconnaissance ou la dégradation d'ADN, d'ARN ou d'hybrides ARN:ADN cytosoliques, mais l'on retrouve aussi des protéines impliquées dans le protéasome (PSMA3 par exemple) (Brehm, 2015) ou causant des défauts de la voie de l'UPR (pour *Unfolded protein response*) (comme SKIV2L) (Eckard, 2014). Une implication de STING dans ce groupe de pathologies devient donc on ne peut plus évident.

La plupart des mutations de ces gènes impliqués dans le développement d'interféronopathies ont été étudiées dans des modèles murins, permettant une étude plus approfondie des mécanismes mis en jeu. Cependant, dans la majorité des cas, la concordance est faible ou partielle entre la pathologie d'origine et son pendant murin. Ces modèles ne permettent ainsi que l'étude de quelques traits de la maladie, et non l'ensemble des voies impliquées. Néanmoins, il est important de rappeler que ces pathologies font partie d'un même groupe caractérisé par la présence d'une signature IFN. On peut donc penser que certains mécanismes (à la fois dans la mise en place de la pathologie, mais aussi dans son entretien) peuvent être similaires. Ainsi, l'étude de ces modèles murins, même s'ils

FIGURE 20 : Signalisation de l'IFN I et cibles des gènes responsables des interféronopathies



Schématisation des protéines et mécanismes cellulaires à l'origine des interféronopathies connues à ce jour. Une activation continue de la signalisation des IFN I peut en effet être causée par : 1. des mutations perte-de-fonction conduisant à une augmentation de la concentration d'ADN cytosolique (**TREX1**, **SAMHD1**), ou des hybrides ADN : ARN (**RNASEH2A**, **RNASEH2B**, **RNASEH2C**, **POLA1**) ; 2. des mutations perte de fonction conduisant à un défaut d'édition de l'ARN ou une détection anormale de l'ARN cytosolique (**ADARI**) ; 3. des mutations gain-de-fonction conduisant à une détection plus sensible des acides nucléiques (**MDA5**, **RIG-I**, **STING**) ; 4. des mutations perte-de-fonction conduisant à une exacerbation de la voie MAVS causée par des défaut de la voie de l'UPR (**SKIV2L**) ; 5. des mutations perte-de-fonction engendrant un défaut de limitation de la signalisation du récepteur IFNAR (**USP18**, **ISG15**) ; 6. des mutations responsables de dysfonctionnements du protéasome (**PSMA3**, **PSMB4**, **PSMB8**) ; 7. des mutations perte-de-fonction conduisant à une signalisation soutenue de l'IFN I mais dont le mécanisme n'est pas encore clairement défini (**ACP5**, **C1q**). (Adapté de Rodero et Crow, 2017).

Abréviations : **ACP5**, Phosphatase, acid, type 5 ; **ADARI**, Adenosine deaminase RNA-specific 1 ; **C1q**, Complement component 1q ; **IFNAR**, Interferon α/β receptor ; **IRF3**, IFN regulatory factor 3 ; **ISG15**, Ubiquitin-like modifier *ISG15* ; **ISGF3**, Interferon-stimulated gene factor 3 ; **MAVS**, Mitochondrial antiviral signaling protein ; **POLA1**, Polymerase DNA A1 ; **PSMB**, Proteasome subunit beta ; **RIG-I**, Retinoic acid inducible gene 1 ; **RNASEH2**, Ribonuclease H2 ; **SAMHD1**, SAM domain-and HD domain-containing protein 1 ; **SKIV2L**, Superkiller viralicidal activity 2S ; **STAT**, Signal Transducers and Activators of Transcription ; **TREX1**, 3' repair exonuclease 1 ; **USP18**, Ubiquitin-specific protease 18.

s'éloignent partiellement de la pathologie humaine en terme de phénotype, peuvent apporter des indices importants pour la compréhension des mécanismes physiopathologiques (**Figure 20**).

La voie STING est capitale pour la détection d'ADNdb afin de permettre la mise en place d'une protection contre des infections virales et bactériennes, et compte tenu de la fine régulation de cette voie, il est aisé de comprendre qu'**une altération dans la régulation de STING peut conduire à une réponse inflammatoire exacerbée, néfaste pour l'hôte.**

Une dérégulation de STING est ainsi impliquée dans des pathologies autoimmunes/autoinflammatoires telles que le SAVI ([Liu, 2014](#) ; [Jeremiah, 2014](#) ; [Munoz, 2015](#) ; [Omoyimni, 2015](#) ; [Fremont, 2016](#) ; [Picard, 2016](#) ; [Clarke, 2016](#) ; [Konig, 2015](#) ; [Melki, 2017](#)), mais aussi dans le développement de cancers ([Chen, 2016](#) ; [Woo, 2014](#) ; [Li, 2018](#) ; [Klarquist, 2014](#)). Nous développerons tout d'abord rapidement son implication dans les cancers.

II- STING ET CANCER

L'immunité anti-tumorale est majoritairement représentée par les LT cytotoxiques permettant, après reconnaissance d'antigènes tumoraux présentés par les DCs, une réponse cytolytique. Cette infiltration intra-tumorale est corrélée avec l'expression de gènes induit par les IFN I, suggérant que ces cytokines puissent être responsables de la mise en place de la réponse adaptative médiée par les LT ([Harlin, 2009](#)). En effet, il a été observé que des souris déficientes pour le récepteur aux IFN I montrent une activation diminuée des LT CD8+ liée à une diminution des DCs, nécessaires au priming des LT ([Fuertes, 2011](#)) ainsi qu'une augmentation de l'angiogénèse au sein des tumeurs ([Spaapen, 2014](#)). Ces IFN jouent donc un rôle primordial dans l'immunosurveillance des cellules cancéreuses ([Fuertes, 2013](#)).

Il a donc été suggéré que la voie STING serait impliquée dans la sécrétion d'IFN I suite à la reconnaissance d'ADN du soi par cGAS. Cet ADN est majoritairement issu directement des cellules cancéreuses, mais aussi de l'ADN génomique endommagé par les anticancéreux ou relargué par les mitochondries. Woo et collaborateurs ont pu mettre en évidence le fait qu'**après transplantation de tumeurs, ces dernières croissent beaucoup plus rapidement dans des souris STING KO par rapport aux WT.** De la même façon, les LT CD8 de souris STING KO présentaient un priming amoindri contre des antigènes tumoraux, alors même que les souris KO pour MAVS (responsable de la production d'IFN I et III suite à son interaction avec RIG-I et MDA5), MyD88 ou encore les TLRs 3/7/9, se comportaient normalement ([Bose, 2017](#) ; [Deng, 2014](#) ; [Woo, 2014](#)).

III- STING ET AUTOINFLAMMATION/AUTOIMMUNITÉ

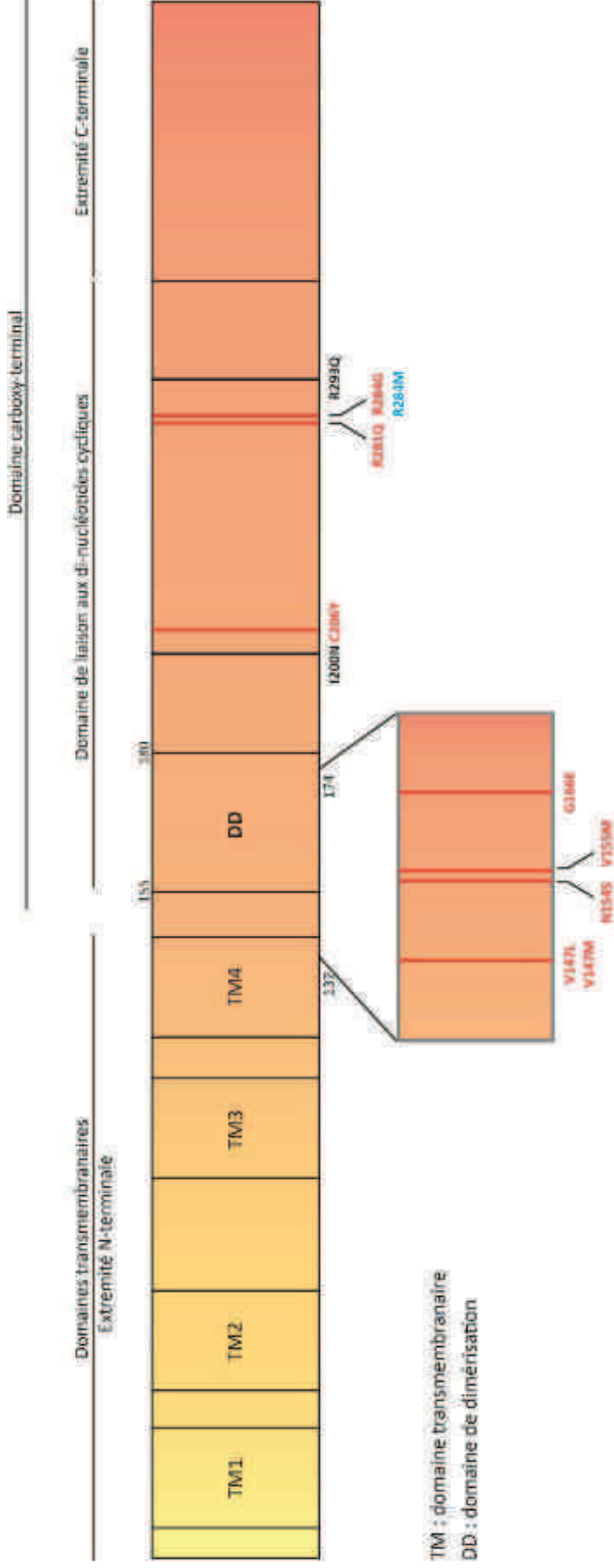
Comme mentionné précédemment, les IFN I sont des cytokines cruciales pour la mise en place de l'immunité antivirale et antimicrobienne, c'est pourquoi une expression basale de ces IFN existe, leur expression étant amplifiée en cas d'infection via notamment l'activation de la voie STING (Gough, 2012). **Une dérégulation de cette voie peut donc conduire à une expression excessive d'ISGs, conduisant à une suractivation du système immunitaire, et responsable du développement de pathologies autoinflammatoires/autoimmunes.**

En outre, la présence excessive ou permanente d'ADN cytoplasmique (par exemple dans des cas pathologiques de déficiences en exonucléases sensées dégrader l'ADN) est une cause importante d'inflammation chronique et de développement de pathologies autoimmunes. En effet, elle conduit au développement d'une réponse IFN I trop importante, à l'expression dérégulée d'ISGs impliqués dans le recrutement de cellules immunitaires et la production en excès de cytokines proinflammatoires telles que l'IL1 α / β ou le TNF α , alors responsables de l'entretien de l'inflammation et de dommages tissulaires (Zhang, 2009).

Récemment, STING a été proposé comme étant impliqué dans la pathologie lupique, exacerbant la maladie. En effet, de la même façon que d'autres senseurs de l'ADN/ARN déjà impliqués dans la pathogénèse lupique, Ding et collaborateurs ont supposé une implication centrale de la voie STING/cGAS dans la détection d'ADN du soi et le déclenchement de cette pathologie (Ding, 2015).

Le LES est une pathologie autoimmune systémique chronique notamment caractérisée par une production d'autoanticorps suite à l'activation de LB autoréactifs, particulièrement des autoanticorps anti-ADNdb, formant des complexes immuns responsables de nombreux dommages tissulaires. En outre, une activation chronique des voies permettant la détection d'ADN et ARN, ainsi qu'un défaut de clairance des corps apoptotiques (peut être en synergie avec une augmentation de la mortalité cellulaire), contribuent à la surproduction d'IFN I, alimentant donc la spirale pathologique. C'est pourquoi une exacerbation dans la voie STING pourrait potentiellement contribuer à aggraver le LES. Néanmoins, une étude menée par Pawaria et collègues chez la souris semblerait plutôt indiquer le contraire. En effet, des souris STING KO croisées sur le fond génétique autoimmun MRL^{lpr/lpr} montrent une exacerbation des manifestations cliniques par rapport aux souris MRL^{lpr/lpr}, révélant dans ce cas un rôle protecteur de STING. Ce rôle protecteur pourrait résider dans la régulation négative des TLRs (Pawaria, 2016). Cependant, étant donné qu'un phénotype similaire n'a pas été retrouvé dans le cas de souris IRF3 KO croisées avec des souris MRL^{lpr/lpr} (Sharma, 2015), il est possible que cet effet soit indépendant de sa fonction de senseur d'ADN.

FIGURE 21 : Mutations rencontrées dans le gène STING



TM : domaine transmembranaire

DD : domaine de dimérisation

Représentation schématique des mutations de STING décrites dans la littérature. Les mutations en rouge (V147L – V147M – N154S – V155M – G166E – C206Y – R281Q – R284G) sont associées à des gain-de-fonction de STING et responsables du SAVI ou FCL. Les mutations en noir (I200N, R293Q) sont des mutations perte-de-fonction. I200N correspond chez la souris à la mutation I199N, retrouvée dans le modèle Goldenticket (conduisant à un KO de STING). La mutation en bleu (R284M) conduit à une hyperactivation de STING *in vitro*.

Abréviations : **DD**, domaine de dimérisation ; **FCL**, *Familial chilblain lupus* ; **SAVI**, *Sting associated vasculopathy with onset in infancy* ; **TM**, domaines transmembranaires.

IV- MUTATIONS DE STING

Jusqu'à aujourd'hui, seules des mutations de type gain de fonction (GOF) hétérozygotes de *STING* ont été décrites chez l'Homme comme étant responsables de pathologies. Ainsi on retrouve des pathologies s'apparentant au LES (pathologies lupus-like), le Syndrome Aicardi-Goutières (AGS) ou encore le SAVI (Li, 2017).

IV-1. STING et FCL

Un gain de fonction (GOF) de *STING* a récemment été associé à une autre pathologie autoimmune appelée FCL (*Familial chilblain lupus*) (G166E) (voir **Tableau de la Partie III-3. STING et SAVI, page 74**), une forme très rare de lupus caractérisée par l'apparition d'engelures au niveau des extrémités, avec ou sans atteintes d'organes. Elle est associée à une accumulation d'ADN et est généralement due à une perte de fonction des enzymes TREX1 (Rice, 2007) ou SAMHD1 (Ravenscroft, 2011), des endonucléases responsables de la dégradation de l'ADN cytosolique. Cette mutation de *STING* impliquée dans le FCL, G166E, serait responsable d'une activation constitutive de la voie et ainsi de la production d'IFN I, bien que cette production soit plus faible que celle observée dans le cas d'autres mutations GOF mentionnées plus loin (**Figure 21**) (König, 2017).

IV-2. STING et LES

Néanmoins, alors que cette mutation de *STING* est associée au FCL, une étude récente de Balada et collègues n'a pas permis de conclure quant à l'implication de mutations connues de *STING* dans le LES. En effet, après séquençage de l'exon 5 de *TMEM173* codant *STING* chez 22 patients lupiques (exon dans lequel se situent les mutations V147M, V147L, N154S, V155M et G166E, les plus fréquemment associées à *STING* et occasionnant une pathologie autoinflammatoire), il s'avère qu'aucun d'entre eux ne présente ces mutations dans l'exon 5. Ceci tend donc à exclure *TMEM173* comme gène de susceptibilité associé au lupus (Balada, 2015). Néanmoins, il n'est pas à exclure que d'autres variations présentes ailleurs dans ce gène, puissent être corrélées avec l'apparition d'une pathologie lupique. De plus, le nombre de patients étudiés est trop limité pour permettre de conclure définitivement.

TABLEAU 9 : Mutations GOF de *STING* et caractéristiques des patients

SEXE	MUTATIONS	TRANSMISSION	IMMUNOLOGIE					PRINCIPALES MANIFESTATIONS	REF.
			LT	LB	NK	Ig	Autres		
F	V155M	Familiale	↗ LT naïfs ↘ LT mem.	↘ LB mem.	N	↗ IgG ↘ IgA IgM N	- Anémie - ↗ neutrophiles - Ac @ADN	Fibrose pulmonaire / rash malaire / attaques fébriles / retard staturo-pondéral	Jeremiah, 2014
M	V155M	Familiale	nc	nc	nc	nc	nc	Fibrose pulmonaire / rash malaire / attaques fébriles / retard staturo-pondéral / arthralgie	
M	V155M	Familiale	nc	nc	nc	nc	nc	Phénotype beaucoup moins sévère : Retard staturo-pondéral / arthralgie	
M	V155M	De novo	ND	ND	ND	ND	- Anémie - Leucopénie - Lymphopénie	- Vascularites - Lésions ulcérales - Syndrome de Raynaud - Fibrose pulmonaire - Arthrite	Liu, 2014
F	V155M	De novo	nc	nc	nc	nc	nc	Retard staturo-pondéral / pathologie pulmonaire interstitielle	Frémond, 2016
M	V155M	Familiale	nc	nc	nc	nc	nc	Retard staturo-pondéral / pathologie pulmonaire interstitielle / lésions ulcérales	Frémond, 2016
1. M	V155M	Familiale	↘ LT CD4+ totaux	N	↘	↗ IgG ↗ IgA IgM N	nc	Retard staturo-pondéral / fibrose pulmonaire / engelures / attaques fébriles	Picard, 2016
F (mère de 1)	V155M	De novo ?	↘ LT CD4+ totaux	N	↘	↗ IgG IgM N	nc	Pathologie pulmonaire interstitielle / télangiectasie / rash malaire / polyarthralgie	
M	V155M	De novo	↘ LT CD4+ totaux ↘ LT CD8+ totaux	nc	nc	↗ Ig poly-clonales (surtout IgG)	nc	Retard staturo-pondéral / pathologie respiratoire virale / fièvre / rash malaire / engelures / fibrose pulmonaire	
M	V155M	De novo	nc	nc	nc	↗ IgG ↗ IgA	- Anémie - Prolifération lymphocytaire anormale	Fièvre / détresse respiratoire (pathologie pulmonaire interstitielle) / retard staturo-pondéral / lésions érythémateuses	Clarke, 2016
M	V155M	De novo	nc	nc	nc	↗ IgG	nc	Inflammation systémique sévère / lésions cutanées / vascularites / ulcérations des extrémités / fibrose pulmonaire	O moyim ni, 2015
F	N154S	De novo	↘ LT CD4+ totaux LT CD8+ totaux N	∅ (Rituximab)	N	↗ IgG ↗ IgA IgM N	- Anémie - Leucopénie - Lymphopénie	- Vascularites - Lésions ulcérales - Syndrome de Raynaud - Fibrose pulmonaire	Liu, 2014
F	N154S	De novo	↘ LT CD4+ totaux LT CD8+ totaux N	N	↘		- Anémie - Leucopénie - Lymphopénie	- Vascularites - Lésions ulcérales - Syndrome de Raynaud	
F	N154S	De novo	↘ LT CD4+ totaux ↘ LT CD8+ totaux	N	N		- Anémie - Lymphopénie	- Vascularites - Lésions ulcérales - Syndrome de Raynaud - Fibrose pulmonaire - Arthrite	
M	N154S	De novo	↘ LT CD4+ totaux LT CD8+ totaux N	N	↘		- Anémie - Leucopénie - Lymphopénie	- Vascularites - Lésions ulcérales - Syndrome de Raynaud	
M	N154S	De novo	nc	nc	nc	nc	nc	Tachypnée / nécrose des extrémités / Pathologie pulmonaire interstitielle	Eroglu, 2015
M	V147M	De novo	nc	nc	nc	nc	nc	Retard staturo-pondéral / pathologie pulmonaire interstitielle / lésions ulcérales	Frémond, 2016
M	V147M	De novo	nc	nc	nc	IgM et IgG N	nc	Retard staturo-pondéral / télangiectasie / escarres / pathologie pulmonaire interstitielle	Munoz, 2015
M	V147L	De novo	N	N	N	↗ IgG ↗ IgA IgM N	- Anémie - Leucopénie - Lymphopénie	- Vascularites - Lésions ulcérales - Syndrome de Raynaud	Liu, 2014
F	V155E/L170Q	De novo	nc	nc	nc	nc	nc	Arthralgie / gangrène des doigts / sinusites récurrentes / hépatostéatose	Eroglu, 2015
M	V155E/L170Q	De novo	nc	nc	nc	nc	nc	Lésions ischémiques des extrémités / calcifications cérébrales	
F	R281Q	De novo	nc	nc	nc	nc	nc	Rash malaire / fibrose pulmonaire / hépatite nécrosante / retard staturo-pondéral	Melki, 2017
F	R284G	De novo ?	nc	nc	nc	nc	nc	Vascularites / acrocyanose / amyotrophie / retard staturo-pondéral	
M	C206Y	De novo	nc	nc	nc	nc	nc	Acrocyanose / lésions cicatricielles	
3 patients	G166E		nc	nc	nc	nc	nc	FCL	Koning, 2015

Mutations hétérozygotes GOF retrouvées chez les patients SAVI et 3 patients FCL.

Abréviations : **Ac@ADN**, Auto-anticorps anti-ADN ; **F**, Female ; **FCL**, Familial chilblain lupus ; **Ig**, Immunoglobulines ; **LB**, Lymphocytes B ; **LT**, Lymphocytes T ; **M**, Male ; **mem.**, mémoires ; **N**, normal ; **nc**, non communiqué ; **ND**, Non-déterminé.

IV-3. STING et SAVI

IV-3.1. Signature IFN et caractéristiques cliniques

Des mutations autosomales dominantes GOF dans le gène *TMEM173*, codant pour la protéine STING, ont été décrites comme étant à l'origine d'un syndrome autoinflammatoire appartenant à la famille des interféronopathies (Crow, 2014 ; Crow, 2017).

Ce syndrome, aujourd'hui connu sous le nom de SAVI (pour *Sting associated vasculopathy with onset in infancy*) est caractérisé par une inflammation systémique survenant à un âge très précoce, une vasculopathie sévère, majoritairement au niveau des extrémités, et pouvant conduire à la nécrose des tissus et amputation, et finalement, dans certains cas, à une fibrose pulmonaire (Liu, 2014 ; Jeremiah, 2014 ; Munoz, 2015 ; Omoyimni, 2015 ; Fremond, 2016 ; Picard, 2016 ; Clarke, 2016 ; Konig, 2015 ; Melki, 2017).

A ce jour, 28 patients ont été diagnostiqués comme porteur de mutations GOF de STING. 25 d'entre eux sont diagnostiqués comme patients SAVI (Tableau 9) (Liu, 2014 ; Jeremiah, 2014 ; Munoz, 2015 ; Omoyimni, 2015 ; Fremond, 2016 ; Picard, 2016 ; Clarke, 2016 ; Konig, 2015 ; Melki, 2017).

Dans 22 des cas de mutations STING GOF associés au SAVI, il s'agit de substitutions impliquant l'un des 4 acides aminés suivant : V147, N154 et V155, localisés dans la partie reliant le dernier domaine transmembranaire de STING à son domaine CTD (V147) ou dans le domaine de dimérisation de la protéine (N154, V155), la dimérisation étant requise pour son activation (Liu, 2014 ; Jeremiah, 2014 ; Munoz, 2015 ; Omoyimni, 2015 ; Fremond, 2016 ; Picard, 2016 ; Clarke, 2016 ; Konig, 2015).

Les 3 autres cas récemment diagnostiqués comme SAVI, portent une mutation ponctuelle qui se situe en position 206, 281 et 284, impliquant ainsi une nouvelle région de STING dans la pathologie (Melki, 2017).

Tous les patients atteints de SAVI présentent une signature IFN I (c'est-à-dire une augmentation de l'expression des ISGs) de même qu'une augmentation des taux de cytokines dites induites par l'IFN I. Par ailleurs, une phosphorylation constitutive de STAT1 a été observée dans les LB et LT des patients, pouvant traduire une action fr la voie des IFN I. D'autre part, le facteur IRF3 apparaît surexprimé dans les fibroblastes issus de patients, et l'expression de STING est à peine augmentée après stimulation par son ligand cGAMP, traduisant une activation constitutive de STING chez ces patients. Ces résultats suggèrent que la mutation confère bien un gain de fonction à la protéine, et conduit à une activation chronique de la voie STING.

L'expression de STING dans de nombreux types cellulaires et notamment les cellules épithéliales, endothéliales et hématopoïétiques pourrait expliquer les atteintes pulmonaires et vasculaires observées au cours du SAVI (Clarke, 2016). Cette suractivation de la voie STING serait en effet responsable de dysfonctions des cellules épithéliales avec comme conséquence des lésions pulmonaires probablement provoquées par l'activation des macrophages alvéolaires ou des pneumocytes (Crow, 2014). Il a par ailleurs été démontré *in vitro* qu'en agissant directement sur les cellules endothéliales, STING serait responsable d'une inflammation et initierait la cascade de coagulation. Une inflammation chronique provoquerait à long terme un processus vaso-occlusif à l'origine de la vasculopathie observée au cours du SAVI (Clarke, 2016 ; Liu, 2014).

IV-3.2. Caractéristiques biologiques

Les mutations connues à l'heure actuelle peuvent être familiale ou au contraire s'exprimer de façon sporadique, appelé mutation *de novo*, non portées par les parents.

A l'échelle biologique, le SAVI est responsable d'une **leucopénie, d'une lymphopénie ciblant majoritairement les LT**, mais avec un compartiment B peu ou pas touché. De façon générale, les LT totaux sont touchés, mais on observe chez certains patients une diminution spécifique des LT mémoires. Par ailleurs, il semblerait que **les LT soient plus sensibles à l'apoptose** puisqu'une augmentation de la caspase 3 a été observée chez les patients SAVI. Les LB quant à eux doivent probablement subir des défauts fonctionnels, puisque l'on observe une **hypergammaglobulinémie** avec augmentation des IgG et une augmentation des IgA dans de nombreux cas. Les IgM cependant sont normales. **Les cellules NK quant à elles sont normales à diminuées** tandis que les populations myéloïdes ne semblent pas impactées. Finalement, une **anémie**, probablement secondaire au contexte inflammatoire, est visible chez la plupart des patients (**Voir Tableau Partie Discussion, page 135**) (Liu, 2014 ; Jeremiah, 2014 ; Munoz, 2015 ; Omoyimni, 2015 ; Fremond, 2016 ; Picard, 2016 ; Clarke, 2016 ; Konig, 2015).

La mutation la plus retrouvée à ce jour chez les patients SAVI est la mutation V155M.

IV-4. Autres mutations – correspondance Homme/souris

Bien que la séquence protéique humaine de STING (hSTING) possède 81% de similarité avec la séquence murine (mSTING), il s'avère que des différences structurales pourraient être responsables de réponses immunitaires STING-dépendantes spécifiques à chaque espèce (**Figure 21**) (Huang, 2012).

En effet, alors que hSTING n'est pas capable de se lier au DMXAA (pour *5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid*) utilisé comme agent anti-angiogénique dans le traitement des cancers, cette molécule se fixe sans problèmes au mSTING et est capable d'activer sa cascade de signalisation. De la même façon, Conlon et collaborateurs ont pu mettre en évidence une réponse minimale des PBMCs humains après stimulation par des CDNs, connus pour activer mSTING (Conlon, 2013).

Un autre fait remarquable est la réponse de STING au virus de la dengue. Ce virus est en effet capable d'inhiber l'activation de hSTING mais pas de son homologue murin. Une différence de séquence prévient en effet le clivage de mSTING via la protéase NS2B3. Ceci est responsable de l'échappement viral provoqué par ce virus chez l'Homme (Aguirre, 2012).

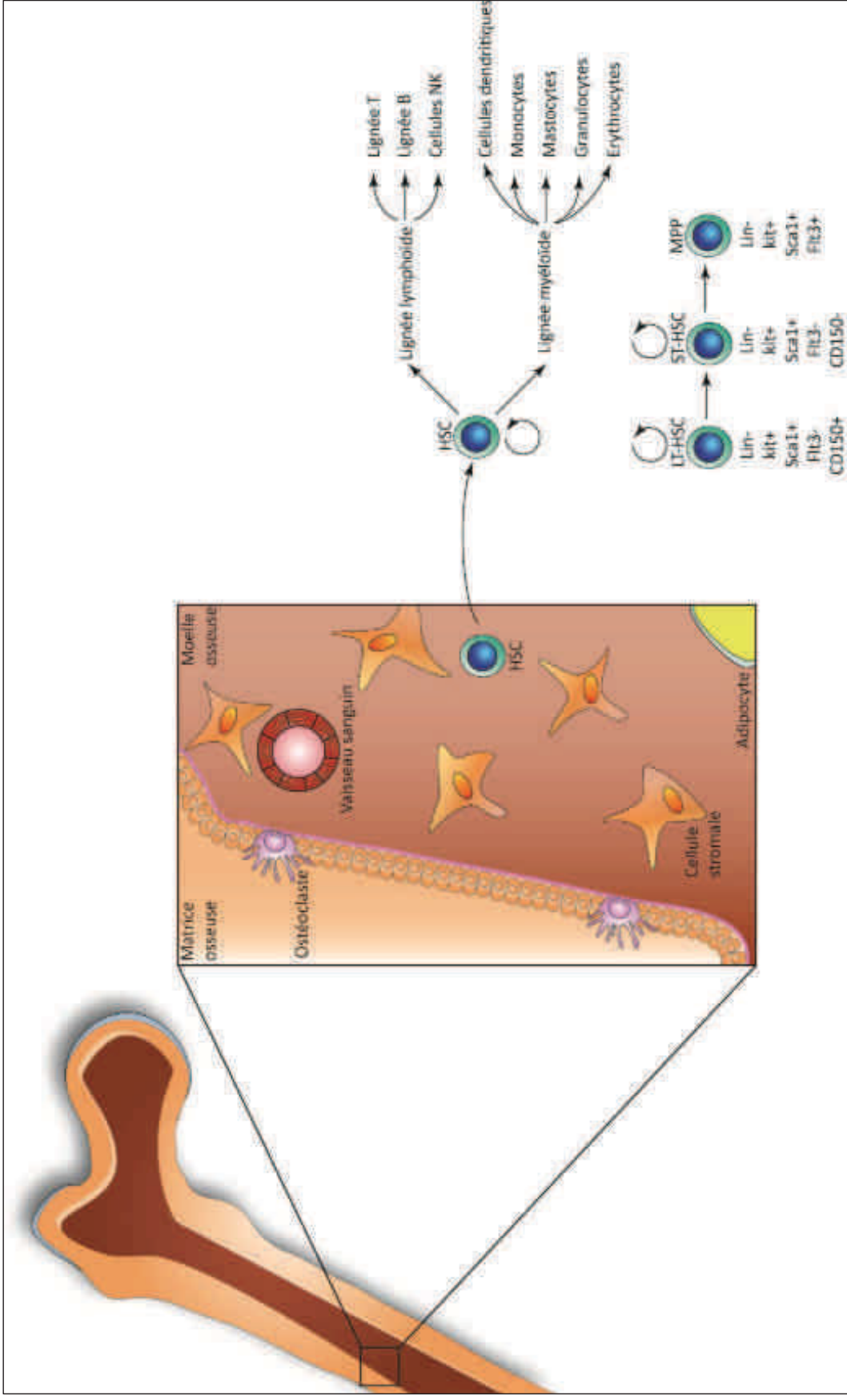
De nombreuses mutations ont été mis en évidence chez l'Homme, capables de moduler la réponse IFN I induite par STING. On peut par exemple citer la mutation R284M, trouvée par screening et dont les effets ont été observés suite à l'insertion de plasmide codant pour la mutation, dans des HEK293T. Cette mutation conduit à une hyperactivation de STING puisqu'elle est capable de stabiliser le dimère STING et donc de conduire potentiellement à une pathologie autoinflammatoire. De façon intéressante, cette mutation se situe dans la partie C-terminale de STING et serait donc principalement impliquée dans la liaison de facteurs responsables de l'activation puis de la dimérisation de la protéine ou d'empêcher la liaison avec des régulateurs négatifs de STING (Tang, 2015).

La mutation perte de fonction R293Q (R71H-G230A-R293Q, aussi appelée HAQ) est quant à elle retrouvée dans 20.4% des individus de la population générale, selon les actuelles bases de données. Elle conduirait à une production plus faible d'IFN β en affectant la liaison de STING avec les CDNs (Jin, 2011 ; Yi, 2013). Patel et collaborateurs ont pu mettre en évidence que la mutation correspondante chez la souris conduit à une expression amoindrie de STING dans de nombreux types cellulaires, incapable de répondre à une stimulation par des CDNs (Patel, 2016).

Finalement, la mutation I199N présente chez la souris (appelée souris Goldenticket) conduit à une abolition complète de la production d'IFN I après stimulation par des CDNs (Sauer, 2011). Cette mutation n'est cependant pas retrouvée chez l'Homme.

Comme mentionné précédemment, la mutation V155M sur *STING* est la plus fréquemment retrouvée au cours du SAVI. Nous avons ainsi généré un modèle murin permettant une étude approfondie des mécanismes mis en jeu au cours du SAVI. De façon intéressante, ce modèle a permis

FIGURE 22 : Caractéristiques et devenir des cellules souches hématopoïétiques



Représentation schématique du développement hématopoïétique à partir des cellules souches (HSCs). Parmi les HSCs, on distingue les LT-HSCs (Lin- kit+ Sca1+ Flt3- CD150+) et les ST-HSCs (Lin- kit+ Sca1+ Flt3- CD150-), qui possèdent la capacité de s'auto-renouveler, et les MPP (Lin- kit+ Sca1+ Flt3+), cellules multipotentes à l'origine des lignées lymphoïdes et myéloïdes. Les marqueurs mentionnés sont ceux retrouvés chez la souris.

Abréviations : **CD150**, ou **SLAMF6**, *Signaling lymphocyte activation molecule 6* ; **Flt3**, *Fms-related tyrosine kinase 3* ; **HSC**, *Hematopoietic stem cells* ; **Kit**, *v-kit hardy-zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog* ; **Lin**, *Lineage* ; **LT-HSC**, *Long term HSCs* ; **MPP**, *Multipotent progenitor* ; **Sca1**, *Stem-cell antigen 1* ; **ST-HSC**, *Short term HSCs*.

de mettre en évidence un rôle de STING dans le développement lymphocytaire, et ceci à un stade médullaire précoce.

C'est pourquoi nous développerons dans un second temps, dans cette introduction, la différenciation de la cellule souche hématopoïétique vers les cellules matures lymphoïdes et myéloïdes, dans les organes lymphoïdes primaires.

PARTIE IV – Développement des cellules progénitrices hématopoïétiques

I- LES CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏTIQUES (HSCs)

A l'origine des cellules matures hématopoïétiques, on retrouve dans la moelle osseuse des précurseurs multipotents ayant la faculté de s'auto-renouveler, les HSCs. Ces cellules se développent dans cet organe lymphoïde primaire (puis par le thymus pour la différenciation des LT), avant de migrer via la circulation sanguine afin d'atteindre les organes lymphoïdes secondaires.

Leur capacité d'auto-renouvellement, de même que leur différenciation, dépendrait de leur microenvironnement spécifique appelé « stem-cell niche » (Wilson, 2006 ; Nagasawa, 2006). En effet, Barker et collègues ont pu observer qu'une mutation dans le gène codant c-kit ligand (aussi appelé SCF, pour *Stem cell factor*) provoquait des modifications au niveau de cette niche, probablement par réduction des interactions cellules stromales-cellules souches, ainsi que par une diminution de la sécrétion de molécules nécessaires au développement des HSCs, responsables alors d'un défaut de développement des HSCs (Barker, 1994).

Elles sont en outre capables de donner naissance à la fois aux globules rouges (érythrocytes), plaquettes, cellules myéloïdes (granulocytes et macrophages), cellules dendritiques et aux cellules lymphoïdes (LB, LT, ILC) (Figure 22).

Le fait que le système hématopoïétique soit si varié, incluant plus de 10 types différents de cellules provenant d'un même progéniteur (HSC) a longtemps intrigué. Ces HSCs sont en effet capables, après transfert de moelle osseuse à des animaux irradiés, de reconstituer le compartiment hématopoïétique des souris afin de reconstituer les lignées sanguines.

Les HSCs n'expriment pas les marqueurs Lin (pour *Lineage*, c'est-à-dire des marqueurs des cellules hématopoïétiques matures) présents au niveau des cellules déjà engagées dans une lignée

particulière, mais expriment, comme mentionné plus haut, les marqueurs KIT et SCA1 (pour *Stem-cell antigen 1*). On les appelle donc LSK (Lin- SCA1+ KIT+). Cette population inclut 3 types de cellules multipotentes : les LT-HSCs (pour *Long term HSCs*) capables de s'auto-renouveler, ST-HSCs (pour *Short term HSCs*) dérivées des LT-HSC mais ayant des capacités d'auto-renouvellement plus limitées, et les MPP (pour *Multipotent progenitor*), ayant perdu cette capacité d'auto-renouvellement (**Figure 22**) (Morrison, 1994).

Les MPPs vont conduire à la formation de progéniteurs oligopotents, c'est-à-dire capables de donner naissance à de nombreuses lignées cellulaires mais pas à toutes les lignées hématopoïétiques. Parmi ces progéniteurs oligopotents, on compte les CLP (pour *Common lymphoid progenitor*) (Kondo, 1997) et les CMP (pour *Common myeloid progenitor*) (Akashi, 2000). Ces cellules, engagées dans l'une ou l'autre lignée (lymphoïde ou myéloïde, respectivement), sont à l'origine du développement de toutes les cellules effectrices du système immunitaire.

Tous ces mécanismes nécessitent une régulation complexe et fine afin de permettre le développement de toutes les cellules matures effectrices, tout en maintenant un équilibre dans la croissance et le renouvellement des cellules souches (Seita, 2010).

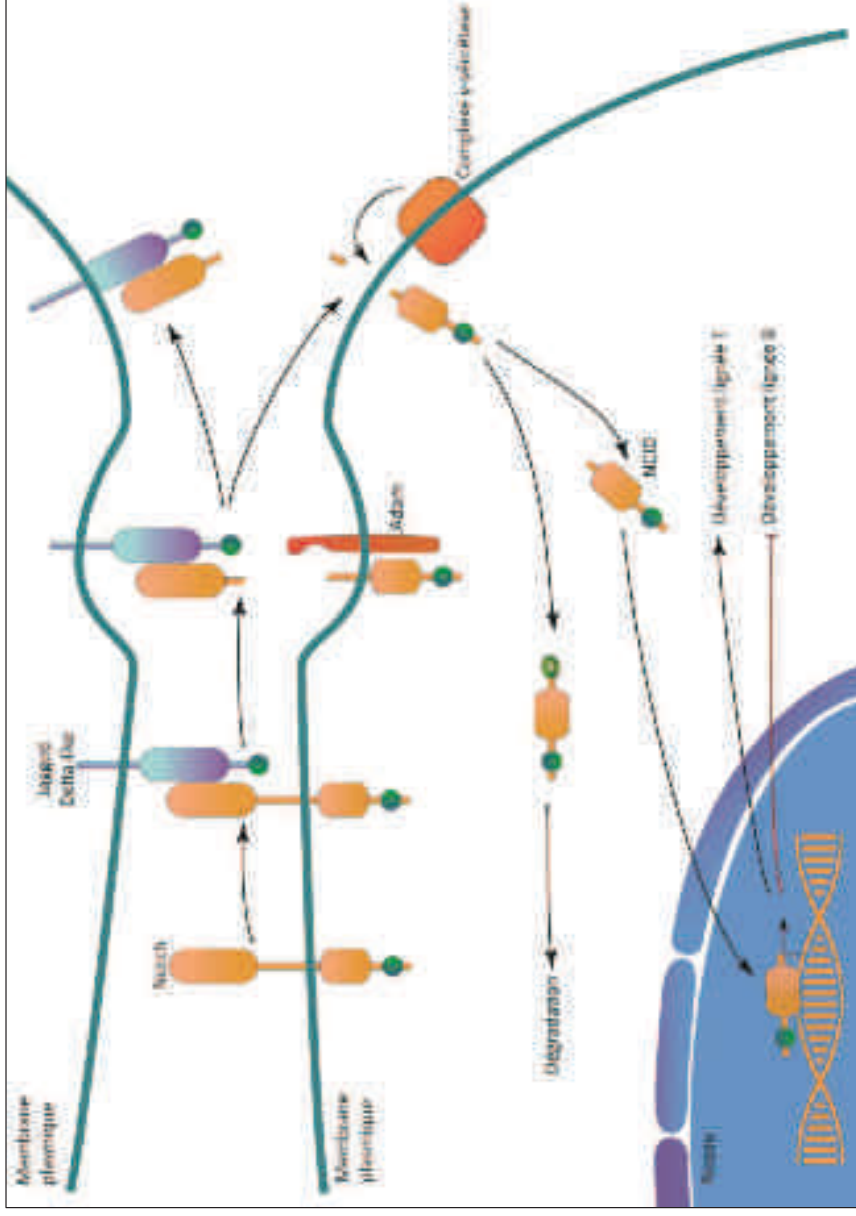
Ce développement est régulé par de nombreux facteurs de transcription et cytokines telles que l'IL-3, l'IL-6, l'IL-11 ou encore le Flt-3 (pour *Fms-related tyrosine kinase 3*) ligand. Néanmoins, il a été démontré que bien que les cellules se développant et proliférant au contact de ces cytokines perdent aussi leur faculté d'auto-renouvellement, indiquant donc que les récepteurs reconnaissant ces cytokines ne sont pas exprimés sur les HSCs mais sur les cellules déjà engagées dans l'une ou l'autre lignée (Adolfsson, 2001).

Cette régulation passe aussi par de nombreux facteurs de transcription, et l'on peut notamment citer la voie Wnt avec Wnt3a, permettant l'auto-renouvellement des HSCs en culture *in vitro* (Reya, 2003). En corollaire, des inhibiteurs de Wnt sont responsables d'une inhibition de la croissance de ces cellules ainsi qu'une diminution du repeuplement après irradiation (Reya, 2003).

Une voie essentielle dans la différenciation et la maintenance des cellules souches (et impliqué dans la différenciation des LT) est celle impliquant les récepteurs Notch, une famille de protéines transmembranaires, exprimé sur les cellules souches (leur ligand étant exprimé sur les cellules stromales de la moelle osseuse).

Cette famille de récepteurs possède plusieurs ligands, différents selon les espèces. Chez la Drosophile par exemple, qui possède un seul récepteur Notch, il s'agit des protéines transmembranaires Delta et Serrate. Chez les mammifères, on compte 4 récepteurs Notch (Notch 1 à

FIGURE 23 : Voie de signalisation du récepteur Notch



Après interaction avec les récepteurs Notch situés sur les cellules hématopoïétiques, les ligands de Notch situés sur les cellules stromales (Jagged ou Delta-like chez les mammifères) sont internalisés. Ceci permet d'exposer le site de clivage présent sur Notch aux protéases ADAM. Une fois clivé, le domaine transmembranaire de Notch est pris en charge par le complexe γ-secretase qui catalyse alors la protéolyse intramembranaire du récepteur. Ceci permet le relargage du domaine intracellulaire de Notch (NICD) et la propagation du signal.

Abréviations : **ADAM**, A disintegrin and metalloprotease ; **NICD**, Notch intracellular domain.

4) et de nombreux ligands tels que les Delta-like 1, 3 et 4, et Jagged 1 et 2, octroyant à cette famille de nombreuses fonctions au sein de l'organisme (Bray, 2006 ; Bray, 2016).

A l'état basal, les récepteurs Notch forment un hétérodimère dont les deux portions hétérodimériques interagissent ensemble, empêchant l'accès aux protéases ADAM (pour *ADAM disintegrin and metalloproteinase*). Une fois fixé à son récepteur lorsque deux cellules sont en contact, le ligand est internalisé, ce qui permet d'exposer le site de clivage aux protéases. Une fois clivé, le domaine transmembranaire-intracellulaire devient alors un substrat pour la γ -secretase qui va alors catalyser la protéolyse intramembranaire. Ceci permettra alors le relargage du domaine intracellulaire de Notch, NICD (pour *Notch intracellular domain*) et la propagation du signal (Figure 23) (Kopan, 2009).

L'expression des ligands de Notch est elle-même régulée par la voie Wnt précédemment citée. De la même façon, le facteur de transcription Ikaros permet une régulation de cette voie en réprimant Notch dans les thymocytes (Bray, 2016).

Grâce à une vaste étude transcriptomique, de nombreuses équipes ont pu mettre en évidence une expression successive de gènes impliqués dans l'une ou l'autre lignée, suivant un ordre hiérarchique. De plus, des études réalisées chez la souris montrèrent une augmentation de l'auto-renouvellement des HSCs avec l'âge, ainsi qu'une augmentation des capacités de différenciation permettant de générer la lignée myéloïde, avec diminution de production de cellules lymphoïdes (Rossi, 2005).

II- DEVELOPPEMENT DES POPULATIONS LYMPHOÏDES

II-1. Lymphopoïèse B

II-1.1. Facteurs de transcription et cytokines impliqués dans la régulation du développement B

Le développement de la lignée B est, parmi les cellules hématopoïétiques, le mieux caractérisé à ce jour. Comme mentionné plus haut, le facteur de transcription Notch est nécessaire au développement lymphoïde. Favorisant l'entrée dans la lignée T, son inhibition permet ainsi l'entrée dans la lignée B. Cette inhibition dépend d'autres facteurs tels que Pax5 (pour *Paired box protein 5*) ou encore LFR (pour *leukemia/lymphoma-related factor*), tous deux nécessaires à la « bifurcation » vers la voie des LB à partir du CLP, par inhibition de Notch1 (Ohishi, 2003).

Les protéines E2A jouent également un rôle important dans la lymphopoïèse (Welinder, 2011), bien qu'il ait aussi été constaté que de grandes quantités d'E2A favorisaient la différenciation myéloïde. Les protéines E2A sont en effet capables d'assurer le développement B en agissant de concert avec PU.1 et l'IL-7R, activant à leur tour l'expression de Pax5 (Semerad, 2009). Pax5 est spécifiquement requis pour la différenciation en cellules B puisqu'il bloquera les gènes nécessaires au déclenchement de la différenciation T et NK, de façon à privilégier celle de la lignée B (Simmons, 2012). En outre, il a été démontré que l'engagement vers la lignée B nécessitait une activation séquentielle des facteurs de transcription impliqués, c'est à dire E2A, Ebf1, Pax5 ou FOXO1 (pour *forkhead box o1*) (Mansson, 2012).

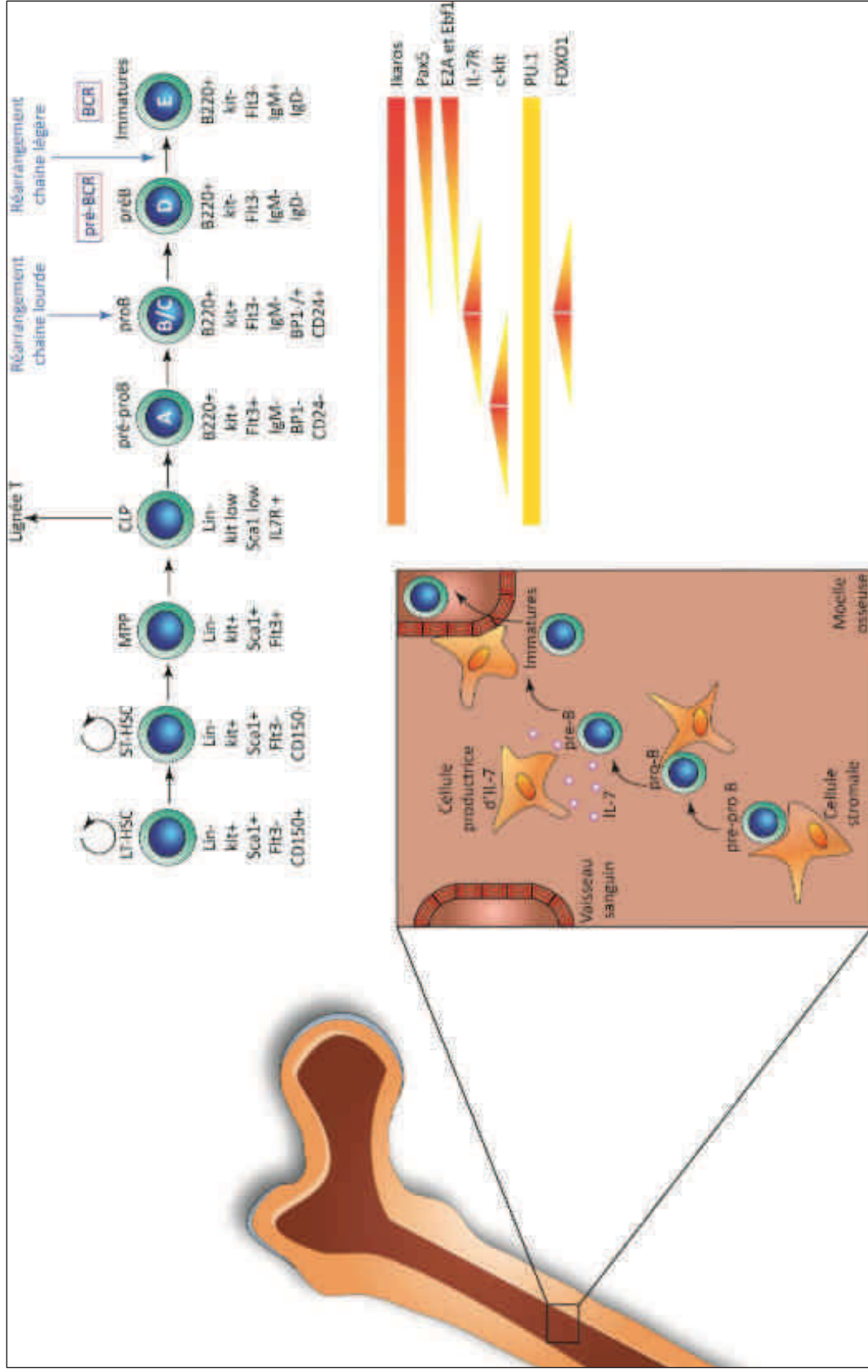
Il est aujourd'hui admis que la moelle osseuse est constituée de niches dispersées de façon discontinues, chacune permettant la croissance de progéniteurs distincts, à différents stades de différenciation (Wilson, 2006). L'expression des récepteurs Notch est donc dépendante du microenvironnement (Cheng, 2007). Ainsi, étant donné que la voie Notch1 inhibe le développement B, il paraît cohérent de penser que les premiers précurseurs B résident au niveau de niches n'exprimant aucun ligand de Notch (Tokoyoda, 2004).

De plus, des chimiokines, telles que CXCL12, nécessaire à la rétention des HSCs dans la moelle osseuse, seraient nécessaires au développement lymphoïde. Des souris CXCL12 KO (ou KO pour CXCR4, récepteur de CXCL12) auraient en effet un nombre réduit de LB. Cette chimiokine permettrait notamment de réguler la localisation des progéniteurs B dans un environnement spécifique afin de permettre leur développement (Tokoyada, 2004).

Comme mentionné précédemment, l'IL-7 joue un rôle crucial dans le développement précoce des LB (mais pas dans leur maturation terminale) puisqu'il a été constaté chez des souris IL-7 déficientes (ou KO pour son récepteur) un arrêt du développement au stade pro-B (voir plus loin pour la description des différents stades de précurseurs B) (Peschon, 1994). Ces animaux présentent par ailleurs une diminution importante des cellules au stade CLP (Tsapogas, 2011), suggérant donc que cette cytokine est nécessaire dès les premiers stades de développement. Ainsi par exemple, **dans une culture de progéniteurs médullaires murins *in vitro*, il est nécessaire de rajouter de l'IL-7 afin de permettre la différenciation de ces cellules vers la lignée B de même que pour assurer leur maintien en culture** (Ceredig, 2012). Chez l'Homme, l'IL-7 ne semble cependant pas suffisante pour permettre le développement des LB en culture *in vitro* (Doulatov, 2012 ; Lundström, 2012).

Cependant, alors que nécessaire à leur survie et à l'entrée en lignée B, l'IL-7 bloquerait la différenciation au stade pré-B vers le stade immature. Une hypothèse soulevée par Wilson et

FIGURE 24 : Lymphopoïèse B



Représentation schématique du devenir des LB après le MPP. Le CLP marque l'entrée des progéniteurs dans la lignée lymphoïde. La lignée B est caractérisée par 4 grands stades de différenciation : les pré-proB (fraction A de Hardy), les proB (fractions B et C), le stade préB (fraction D) et le stade immature prêt à quitter la moelle (fraction E). Au stade proB commence le réarrangement de la chaîne lourde, qui conduit, au stade préB, à l'expression d'un préBCR. Puis, après réarrangement de la chaîne légère, est exprimé le BCR sur les cellules B immatures. Ces différents stades sont caractérisés par des marqueurs spécifiques décrits sous chaque type cellulaire. L'expression des molécules nécessaires au développement B est représentée sous forme de gradient.

Abréviations : **BCR**, B cell receptor ; **CD150**, ou **SLAM**, Signaling lymphocyte activation molecule ; **CLP**, Common lymphoid progenitor ; **E2A**, ou **TCF3**, Transcription factor 3 ; **Flt3**, Fms-related tyrosine kinase 3 ; **IL-7R**, Interleukine 7 receptor ; **KIT**, v-kit hardy-zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog ; **LB**, Lymphocyte B ; **Lin**, Lineage ; **LT-HSC**, Long term HSCs ; **MPP**, Multipotent progenitor ; **Pax5**, Paired box protein 5 ; **Sca1**, Stem-cell antigen 1 ; **ST-HSC**, Short term HSCs.1

collègues serait l'existence de niches spécifiques à chaque progéniteur. Ainsi, seules les cellules progénitrices pourraient être en contact de cellules stromales exprimant l'IL-7, tandis que les cellules immatures, correspondant à un stade plus avancé ne nécessitant plus d'IL-7, se localiseraient dans d'autres niches particulières (Parrish, 2009).

Les membres de la famille FOXO permettent d'augmenter l'expression de l'IL-7 récepteur (IL-7R, CD127) (Lin, 2010). Bien qu'initialement connue pour son rôle dans le développement B (elle était en effet appelée Lymphopoïétin-1 et décrite comme un facteur de croissance des cellules pré-B), l'IL-7 est aujourd'hui reconnue comme ayant un rôle à la fois dans la lymphopoïèse B et T (Namen, 1988). Des souris déficientes pour l'IL-7 ou pour son récepteur présentent en effet des défauts sévères de développement des LT et LB (Ceredig, 2012), alors que l'IL-7 n'est ni requise ni suffisante chez l'Homme puisque des patients portant une mutation perte de fonction dans le gène codant l'IL-7R possèdent un nombre normal de LB, suggérant un développement qui n'est pas altéré par l'absence de cette cytokine (Doulatov, 2012 ; Lundström, 2012).

Finalement, le facteur de transcription Ikaros est nécessaire à la transition du CLP vers l'entrée dans la lignée B (Ferreiros-Vidal, 2013).

II-1.2. L'émergence d'un répertoire varié de LB

Classés en fonction de l'apparition de marqueurs de surface, la lignée B a été subdivisée en différents sous-types appelés fractions de Hardy. Ces fractions correspondent aux différents stades de maturation du LB : le CLP donnera naissance à la cellule pré-proB (fraction A), puis au stade proB (fractions B et C pour les stades proB précoces et tardifs respectivement). Les cellules proB donneront ensuite naissance à la grande cellule préB (ou fraction C'), puis la petite cellule préB (fraction D) avant de conduire à la formation de la cellule B immature (fraction E) puis mature (fraction F) (Figure 24) (Hardy and Hayakawa, 2001).

Ces stades précoces de développement sont organisés autour du processus de réarrangement génique permettant l'expression du récepteur à l'antigène des cellules B, le BCR (pour *B Cell Receptor*), correspondant à l'immunoglobuline de surface. En effet, le réarrangement de ces gènes est un processus nécessaire au développement du LB qui se produit très précocement. Il consiste en une recombinaison de segments géniques (**appelée recombinaison V(D)J**, V pour Variable, D pour Diversité et J pour Jonction) et conduit à la formation des régions variables des chaînes lourdes (H) et légères (L) du BCR (Schatz, 2011). Les premières étapes de ce processus requièrent les enzymes RAG (pour *recombination-activating gene*) 1/2. Ces réarrangements de gènes sont responsables d'une grande diversité d'Ig puisqu'il existe de nombreuses copies pour chaque segment de gènes V_H , D_H , J_H

(ou V_L , J_L pour les chaînes légères) et un nombre considérable de combinaisons possibles pour le réarrangement de la chaîne lourde (ou de la chaîne légère), ainsi que lors de l'association de la chaîne lourde et de la chaîne légère. De plus, cette diversité est encore augmentée notamment par l'ajout aléatoire de nucléotides à la jonction entre les segments réarrangés par une enzyme appelée TdT (pour *Terminal desoxynucleotidyl transferase*) au stade proB (fractions B/C). Ceci permet donc l'émergence possible de milliers de BCR.

II-1.3. Du stade pré-proB à la sortie de la moelle osseuse

Les fractions de Hardy subissent en premier lieu un réarrangement de la région variable de la chaîne lourde du BCR (réarrangement $V_H D_H J_H$). Ce réarrangement commence à partir du stade proB (fractions B et C) puisque le stade pré-proB (fraction A), c'est-à-dire les cellules B les plus immatures, n'exprime en effet que faiblement les enzymes RAG1/2, nécessaires à ce réarrangement génique.

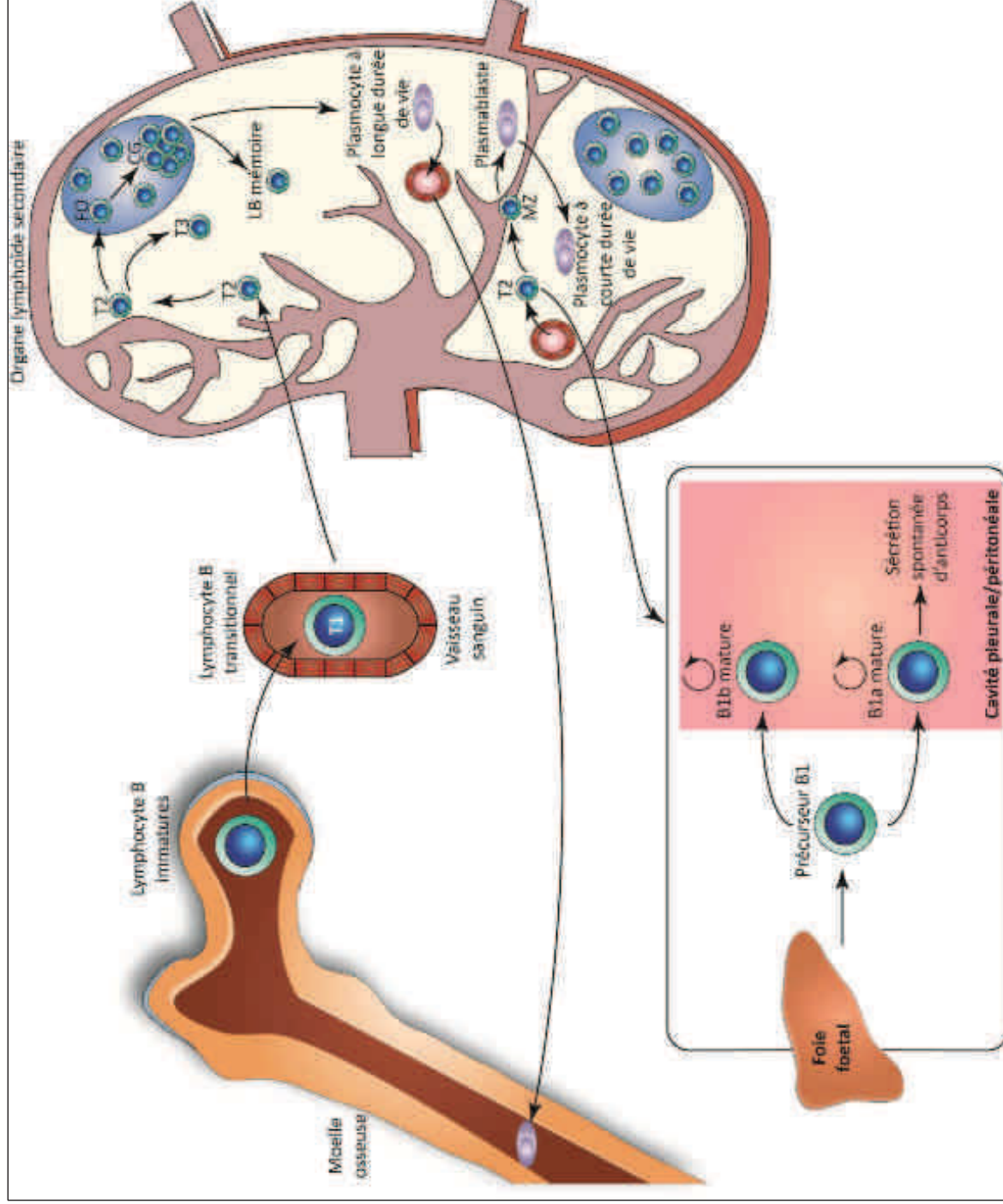
L'expression de cette chaîne lourde permet ensuite le réarrangement d'une chaîne légère. Ces réarrangements géniques sont en outre médiés par de nombreux facteurs de transcription tels que E2A, responsable de l'initiation de la recombinaison V(D)J puisqu'il permet l'expression des protéines RAG1/2. E2A induit aussi l'expression du facteur Pax5, à l'origine lui-même de l'expression de nombreux composants du récepteur des LB (CD19, Ig α par exemple) (Hardy, 2001).

Les fractions B et C (stade proB), correspondent à des cellules relativement grandes et proliférantes nécessitant notamment l'IL-7 (Sitnicka, 2007). Ces cellules expriment encore le marqueur CD117 (ou c-KIT) présent sur les HSCs (Ceredig, 2012). Suite à l'association du segment génique V_H au $D_H J_H$ déjà réarrangé, les pro-B, appelés à ce stade pro-B tardifs, perdent l'expression de c-KIT.

Si le réarrangement V(D)J conduit à l'expression productive d'une chaîne H (de type μ), cette chaîne H sera alors exprimée en surface en association avec une pseudo-chaîne légère, formant alors le pré-BCR, définissant le stade pré-B (correspondant aux fractions de Hardy C' et D) (Rolink, 1994).

Cette pseudo-chaîne légère est composée de deux protéines dont l'expression est ici aussi induite par le facteur E2A. Ces protéines, $\lambda 5$ et VpréB, sont dites substitutives puisqu'au dernier stade de développement médullaire (LB immature, fraction E de Hardy), elles sont remplacées par une « vraie » chaîne légère. Ce pré-BCR est également associé aux protéines Ig α et β (respectivement CD79a et b), protéines transmembranaires nécessaires à la transduction du signal du pré-BCR et du BCR (Hardy and Hayakawa, 2001).

FIGURE 25 : Devenir des LB à la sortie de la moelle osseuse



Après leur sortie de la moelle osseuse, les LB immatures passent dans la circulation sanguine où ils deviennent des LB transitionnels dit T1. Après migration dans les organes lymphoïdes secondaires, le LB transitionnel devient un LB T2 qui, suite à la sélection périphérique, évoluera en LB folliculaire ou LB de la zone marginale (LB MZ). Les LB MZ sont responsables de la production de plasmocytes à courte durée de vie après reconnaissance de l'antigène. Les LB Fo quant à eux se différencieront en LB mémoires ou plasmocytes à longue durée de vie après passage dans le centre germinatif. Ces plasmocytes à longue durée de vie peuvent ensuite retourner dans la moelle osseuse. Ces LB sont dits B2 ou conventionnels. Néanmoins, il existe une autre population issue du foie foetal appelée B1. Les LB B1 restent au niveau des cavités pleurales et péritonéales, où ils s'y auto-renouvellent et sont capables (pour les B1b) de sécréter spontanément de fortes quantités d'Ig (principalement des IgM).

Abréviations : **Fo**, *Folliculaire* ; **GC**, *Germinal center* ; **LB**, *Lymphocyte B* ; **Mz**, *Marginal zone* ; **T**, *Transitionnel*.

En effet, après le stade préB, les cellules subissent ensuite un réarrangement de leur chaîne légère (par réarrangement des gènes de régions variables de chaînes légères) suite à la perte d'expression du pré-BCR. Leur taille diminue et elles expriment, *in fine*, un BCR de classe IgM à leur surface (au stade immature, fraction E de Hardy). Les cellules vont alors subir la tolérance centrale : seules les cellules n'exprimant pas de BCR autoréactif seront autorisées à quitter la moelle osseuse pour migrer en périphérie (Tussiwand, 2009), certaines cellules matures y retournant après maturation.

II-1.4. Le LB en périphérie

Seuls 10 à 30% des LB immatures quittent effectivement la moelle osseuse, les autres 70 à 75% sont considérés comme autoréactifs et de ce fait subissent une délétion, une modification de leur BCR (dit « receptor editing » ou édition de récepteur), ou enfin une anergie, dans l'ordre décroissant de leur caractère autoréactif (Tsuiji, 2006).

Une fois sortis de la moelle osseuse, les LB immatures dit B2, c'est-à-dire conventionnels, passent par un stade intermédiaire dit de transition (ce sont les LB transitionnels). A ce stade a lieu la sélection périphérique déterminant si le LB va devenir un LB folliculaire (Fo) ou LB de la zone marginale (pour la rate) (MZ). Pour ce faire, ce LB transitionnel de stade 1 (T1) va migrer au niveau de la rate, dans la zone marginale et devenir un LB T2 (transitionnel de stade 2) se différenciant en Fo ou MZ (Figure 25).

Les LB MZ exclusivement localisés dans la rate sont impliqués dans les réponses humorales thymo-indépendantes ou T-indépendantes.

Au contraire, **les LB Fo circulants sont retrouvés à la fois dans la rate et les ganglions lymphatiques. Ils participent à la réponse B au sein du centre germinatif et permettent la mise en place d'une réponse humorale dite thymo-dépendante ou T-dépendante**, c'est-à-dire qu'après présentation de l'antigène (Ag) par les cellules présentatrices d'Ag au LT, le LT fournira des signaux d'activation aux LB naïfs permettant leur maturation.

De la même façon que pour les progéniteurs, la voie Notch est ici encore omniprésente. En effet, Notch2 et son ligand Delta-like 1 seraient cruciaux dans le développement des LB MZ (Tan, 2009).

Finalement, des études ont montré le rôle de Notch dans l'activation des LB Fo. Ces cellules exprimant Delta-like 1 dépendraient de Notch pour leur prolifération et la production d'Ig (Thomas, 2007). Une autre étude démontra d'ailleurs que la voie Notch était requise pour permettre la différenciation des B en cellules sécrétrices d'anticorps (plasmocytes) et promouvait la commutation de classe des Ig (Santos, 2007).

Outre cette population B2, il existe des LB appelés LB B1. Cette population est particulière puisqu'elle ne suit pas le même développement que les LB B2 et serait majoritairement issue du foie fœtal. De plus, alors que les LB conventionnels migrent en périphérie dans les organes lymphoïdes secondaires (tels que la rate ou les ganglions lymphatiques), **les LB B1 restent au niveau des cavités pleurales et péritonéales, où ils s'auto-renouvellent**. Étant donné leur localisation et la potentielle présence d'agents pathogènes, il est donc logique de constater que ces cellules sécrètent spontanément de fortes quantités d'Ig (principalement des IgM). Parmi eux co-existent deux populations : les B1a (qui sécrètent spontanément des anticorps, et notamment des autoanticorps dits « naturels ») et les B1b (qui participent à la réponse adaptative) (Kawahara, 2003).

A la fois les LB MZ et les B1a sont nécessaires à la réponse humorale précoce en cas d'infection (Haas, 2005 ; Martin, 2000). En effet, étant localisés à des carrefours permettant une détection rapide de pathogènes circulants, ils sont capables d'interagir rapidement avec ces derniers. Tous deux seront responsables de la sécrétion d'anticorps T-indépendante après différenciation en plasmocytes. Ces deux types de LB sécrètent majoritairement des IgM (et IgA pour les B1a) qui peuvent en outre être produites spontanément par les B1a et seront alors appelés anticorps naturels.

II-2. Lymphopoïèse T

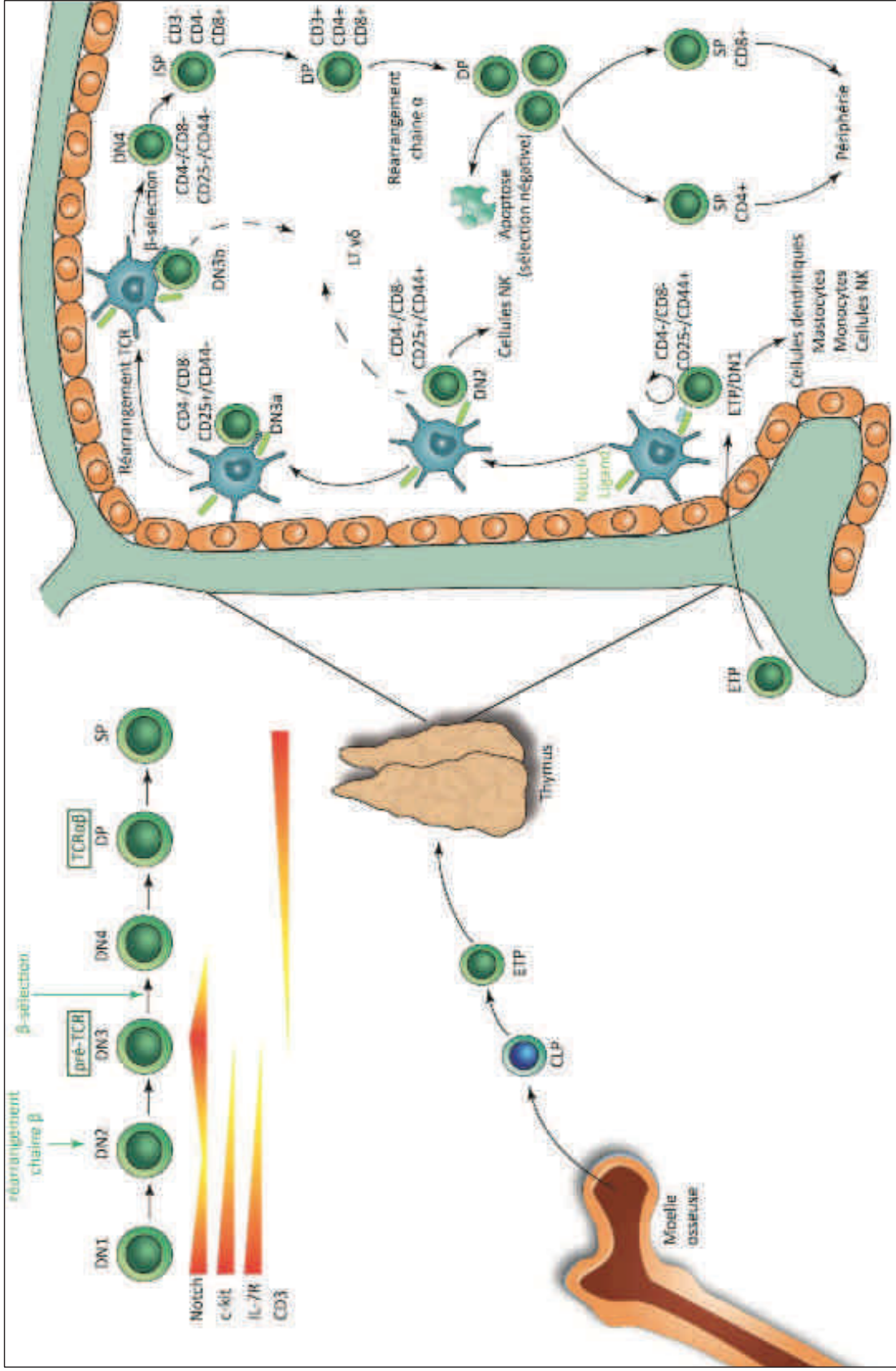
II-2.1. Entrée de l'ETP (pour *Early T cell progenitor*) dans le thymus

Comme mentionné précédemment, le récepteur Notch est majoritairement impliqué dans le développement T, le privilégiant sur le développement B. En effet, des souris déficientes pour Notch-1 présentent un blocage dans leur développement T, alors que des souris reconstituées avec des progéniteurs médullaires exprimant une forme active de Notch présentent un développement B altéré (Schmitt, 2002).

De la même façon que pour les LB, les LT commencent leur développement dans la moelle osseuse à partir du stade CLP, se différenciant en un progéniteur appelé l'ETP. Ce dernier va ensuite migrer dans le thymus, organe lymphoïde primaire et lieu de développement des LT, afin de recevoir les signaux nécessaires à la différenciation des LT (Rothenberg, 2014).

Ces ETPs constituent une population très minoritaire (1 cellule sur 10 000 cellules thymiques) mais ils possèdent un fort potentiel prolifératif capable de générer des millions de cellules thymiques (Allman, 2003). Néanmoins, ayant perdu la capacité à s'auto-renouveler, un apport constant en provenance de la moelle osseuse est nécessaire au maintien du pool T (Boyd, 1993).

FIGURE 26 : Lymphopoïèse T



Représentation schématique de la lymphopoïèse T à partir du progéniteur des LT appelé ETP. Ce dernier migre en effet de la moelle osseuse vers le thymus où il va se différencier en plusieurs stades avant de devenir LT mature. Ces stades comprennent les DN1 (CD4- CD8- CD25- CD44-) qui peuvent encore se différencier en DCs, mastocytes, monocytes ou cellules NK. Le second stade est le stade DN2 (CD4- CD8- CD25+ CD44+), qui peut lui encore se différencier en cellules NK. A ce stade, les LT peuvent choisir de devenir des LT $\alpha\beta$ ou des LT $\gamma\delta$. Les DN2 se différencient ensuite en DN3 (DN3a et b, CD4- CD8- CD25+ CD44-), étapes auxquelles a lieu le réarrangement du récepteur aux LT, le TCR $\alpha\beta$. Finalement, si ce réarrangement est productif (β -sélection), le LT se différencie en DN4 (CD4- CD8- CD25- CD44-), puis en ISP (CD3- CD4- CD8+) avant de devenir une cellule double positive (CD3+ CD4+ CD8+) exprimant un TCR complet suite au réarrangement de la chaîne α du récepteur. Le stade final de maturation du LT est le stade simple positif (CD4+ ou CD8+). Sont aussi représentés les différentes molécules nécessaires à la lymphopoïèse T au moyen de gradients.

Abréviations : **c-kit**, V-Kit Hardy-Zuckerman 4 Feline Sarcoma Viral Oncogene-Like ; **CLP**, Common lymphoid progenitor ; **DCs**, Dendritic cell ; **DN**, double negative ; **DP**, double positive ; **ETP**, Early T-cell Precursor ; **IL-7**, Interleukin-7 ; **NK**, Natural Killer ; **SP**, Simple positive ; **TCR**, T-cell receptor

Ce développement a pu être étudié très en détail grâce à la culture *in vitro* de cellules stromales murines issues de la moelle osseuse appelées OP9, transfectées afin d'exprimer les ligands Notch Delta-like 1 ou 4 (Zhang, 2016). En effet, cette signalisation Notch est requise à la fois pour l'entrée en lignée T (Amsen, 2004), mais aussi tout au cours du développement T. Elle contribuerait finalement aussi à l'orientation vers des cellules LT $\alpha\beta$ CD4+ ou CD8+, ou des LT $\gamma\delta$ (Ohishi, 2003).

La particularité du thymus réside en la présence de nombreux ligands du récepteur Notch, notamment Delta-like 4, permettant alors une différenciation uniquement vers la lignée T (Yashiro-Ohtani, 2010).

L'expression de PU.1 est quant à elle nécessaire au développement lymphoïde. Des souris KO pour PU.1 présentent en effet un défaut sévère de développement T et NK (Colucci, 2001 ; Spooner, 2009).

II-2.2. Evolution des progéniteurs thymiques

Après entrée dans le thymus, les LT, tout comme les LB dans la moelle osseuse, passent par différents stades de développement, qui se distinguent en fonction de l'expression du récepteur des LT à l'antigène (appelé TCR pour *T cell receptor*) et des protéines exprimées à la surface du LT. Ainsi, l'ETP évolue en stades doubles négatifs (DN) qui n'expriment ni le CD4 ni le CD8. Ces cellules DN se distinguent en plusieurs sous-types dits DN1, DN2, DN3 et DN4. S'ensuit un stade immature CD8 simple positif dit ISP (pour *immature single positive*) évoluant vers un stade double positif (DP) qui exprime à la fois le co-récepteur CD4 et CD8, mais n'exprimant que faiblement le TCR. Enfin, ces cellules deviennent des cellules matures LT simples positives (SP) CD4+ ou CD8+ (Figure 26).

Deux types de LT co-existent : les LT $\alpha\beta$ (la forme majoritaire des LT) et les LT $\gamma\delta$. Ces dernières diffèrent des LT $\alpha\beta$ de par le type d'antigène reconnu ainsi que leur fonction et leur distribution en périphérie. En effet, ces cellules permettent une sécrétion très rapide de cytokines et résident préférentiellement dans les muqueuses (intestin, poumons, utérus) mais aussi le derme et, pour la souris, l'épiderme (Vantourout, 2014 ; Zarin, 2015).

Une fois dans le thymus, les progéniteurs de la lignée T prolifèrent en réponse aux signaux reçus dans leur microenvironnement et commencent leur programme transcriptionnel. Ces signaux, à la base de tout développement T, passent notamment par les voies Notch et Wnt, mais reposent également sur des cytokines telles que KIT, ou l'IL7. En effet, des souris KIT KO possèdent un nombre très réduit de thymocytes DN (Famili, 2017). D'autre part, Ikaros et GATA-3 sont

exprimés dans les progéniteurs précoces de façon à assurer le développement T. En effet, si l'un de ces deux facteurs de transcription vient à manquer, ce développement s'interrompt.

Enfin, l'IL-7 est nécessaire au développement des B et T chez la souris, alors qu'elle n'est pas requise pour le développement B chez l'Homme (Monroe, 2004). Concernant le rôle de l'IL-7 dans la lymphopoïèse T, il a notamment été décrit chez l'Homme qu'une déficience dans la chaîne α du récepteur à l'IL-7 était responsable du développement d'une pathologie de type SCID (pour *Syndrome d'immunodéficience combinée sévère*) T- B+ NK+ (**voir Partie V, II-Déficit immunitaire combiné sévère, page 92**), confirmant donc son rôle essentiel. En outre, l'IL-7 serait un puissant facteur de croissance pour le développement des cellules T DN et permettrait le maintien de ce pool cellulaire en prévenant de la mort cellulaire et en stimulant la prolifération des DN via la PI3K (Fry, 2005).

II-2.2.1 DN1

Les cellules T les plus immatures sont les DN1 (CD4- CD8- CD25- CD44+), qui possèdent toujours le potentiel de se différencier en B, NK, NKT ou cellules myéloïdes. Aucun réarrangement des chaînes de TCR n'a encore lieu au stade DN1 (stade que l'on peut comparer au stade pré-proB dans la lignée B) (Moore, 1995 ; Porritt, 2004). Cette première étape de transition de l'ETP/DN1 au stade DN2 est médiée par la voie Notch, notamment responsable de l'expression du marqueur de surface CD25 (récepteur à l'IL-2, interleukine nécessaire au développement des LT effecteurs et aussi appelée TCGF (pour *T cell growth factor*)) une des caractéristique du stade DN2 (Schmitt, 2004).

II-2.2.2 DN2

Les DN2, correspondant à la seconde étape du développement T (CD4- CD8- CD25+ CD44+), bien qu'engagés dans le développement de la lignée T, constituent le stade le plus propice à un développement de cellules NK (faisant partie des ILC1, pour *Innate lymphocyte 1*) (Rothenberg, 2011) et une partie de ces cellules peut, sous le contrôle de la voie Notch et en présence d'IL-7 et d'IL-33, devenir des ILC 2 (que nous développerons plus loin) (Wong, 2012).

A ce stade commence le réarrangement de la chaîne β du TCR. En outre, c'est à cette étape DN2 (et plus précisément DN2a) que les précurseurs T ont la plus grande prédisposition à devenir des LT porteurs d'un TCR $\gamma\delta$ (ces cellules pouvant aussi provenir d'un stade DN3b) (Ciofani, 2006).

En outre, les cellules DN2 requièrent un fort signal de Notch afin de maintenir l'expression de ses gènes cibles comme notamment le CD25, exprimé aux stades DN2 et DN3 (Yiu, 2010).

Une fois au stade DN2b, ces cellules sont définitivement engagées dans la lignée T. Elles vont alors diminuer l'expression de KIT et augmenter l'expression du cluster CD3, de Thy1 (pour *thy-1 T-cell antigen*) et de RAG1/2, ainsi que des molécules Lck (pour *lymphocyte-specific protein-tyrosine kinase*) et Zap70 (Schmitt, 2004 ; Yui, 2010).

La voie Wnt est elle aussi un régulateur positif de la transition vers le stade DN2 (Staal, 2003).

Finalement, l'expression du récepteur à l'IL-7 est augmentée, ainsi que celle de RAG1/2 qui va permettre la recombinaison des gènes à l'origine de l'expression des régions variables du TCR.

II-2.2.3 DN3

C'est au stade DN3 (CD4- CD8- CD25+ CD44-) que les LT sont le plus dépendants de la voie Notch. Ces cellules ne sont en effet pas proliférantes et ne passeront au stade DN4 qu'en cas de réarrangement favorable de leur chaîne β du TCR (Ciofani, 2005), que l'on appelle β -sélection. Cette chaîne β , formée par recombinaison V(D)J à partir de gènes V β , D β , J β , s'apparie à ce stade (équivalent de la pseudo-chaîne légère des cellules préB) avec une chaîne de substitution dite pT α (pour *pre-T cell α*). Cet assemblage conduit à la formation d'un pré-TCR exprimé sous forme d'un complexe avec les molécules de CD3, qui assurent la signalisation du TCR (tout comme les chaînes Ig α et β pour le BCR) (Von Boehmer, 1997). Ce pré-TCR transmet des signaux en passant par la protéine Lck, exprimée dès le stade DN2.

Ce n'est qu'après cette étape que les LT ne dépendent plus du signal Notch (Taghon, 2006). Dans le cas où le réarrangement n'est pas productif, ces cellules ne passent pas à un stade DN4 et meurent rapidement.

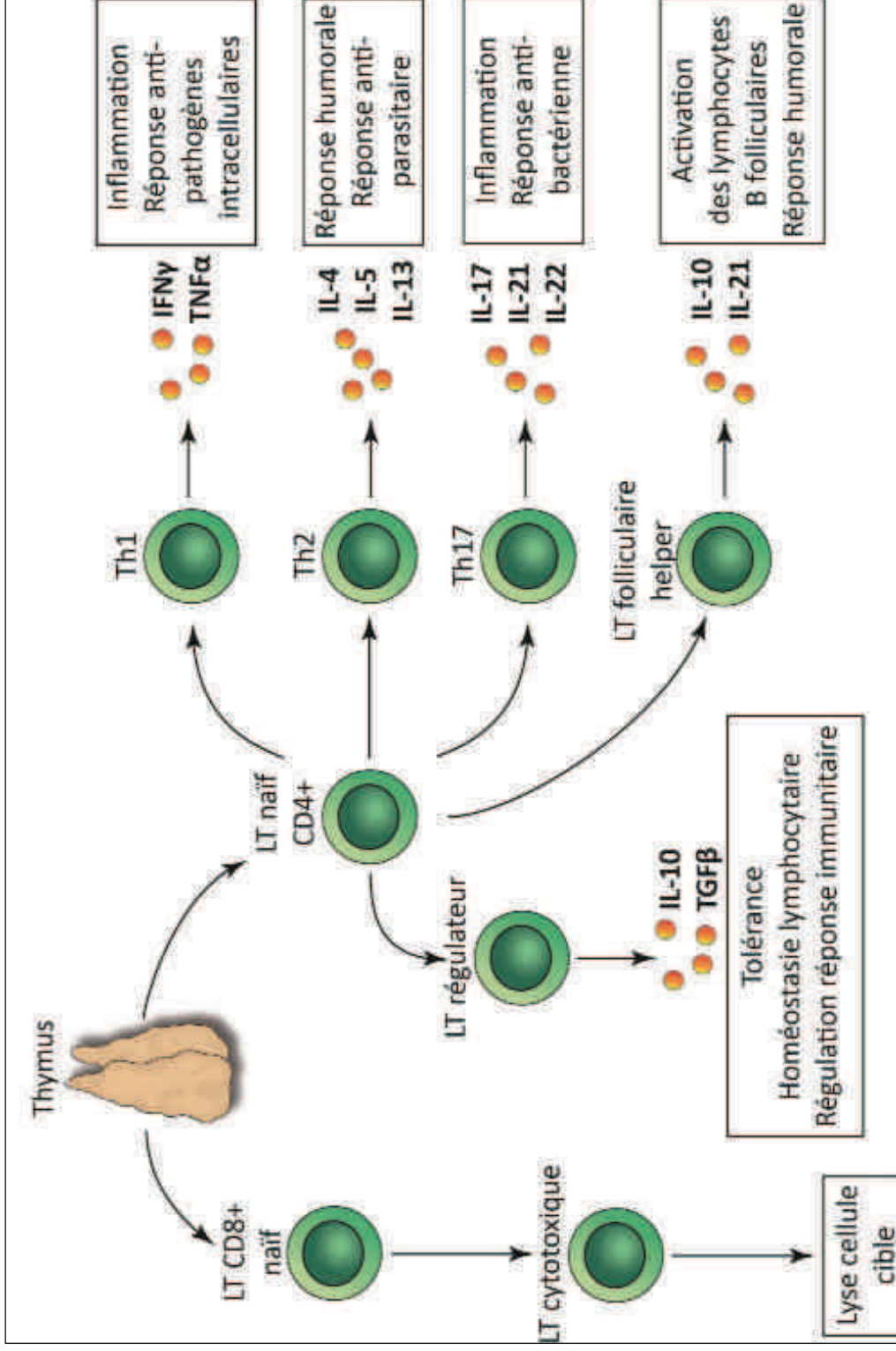
A ce stade est observée une diminution de l'expression du récepteur de l'IL-7. Ceci permettrait donc un maintien du pool de DN puisque cela occasionne un blocage de la progression vers le stade DP (Van de Wiele, 2004). Enfin, le thymus est un organe qui subit une involution en diminuant de taille au fur et à mesure de l'avancée en âge de l'individu. Une diminution de la production d'IL-7 serait liée à cette involution (Fry, 2005).

II-2.2.4 Des DN4 aux DP

Après la β -sélection, les cellules T se développent en DN4 (CD4- CD8- CD25- CD44-), cellules qui prolifèrent rapidement et répriment les gènes *Rag1/2*, nécessaires à la recombinaison V(D)J.

Les DN4 se différencient ensuite en ISP (CD3- CD4- CD8+ pour la souris, CD3- CD4+ CD8- chez l'Homme) pour finir par devenir des cellules doubles positives (CD4+ CD8+) (Zúñiga-Pflücker, 2004).

FIGURE 27 : Développement des LT à la sortie du thymus



Une fois sortis du thymus, les LT se diversifient en périphérie et acquièrent de nouveaux rôles effecteurs. Parmi les LT CD4+ se distinguent les LT helper. Les Th1, sécrètent d'IFN γ et de TNF α impliqué dans la réponse anti-pathogènes intracellulaires, les Th2 qui sécrètent de l'IL-4, IL-5 et IL-13 et permettent une réponse anti-parasitaire et la mise en place de la réponse humorale, et les Th17, qui sécrètent de l'IL-17, IL-21 et IL-22 et sont impliqués dans la réponse anti-bactérienne et l'inflammation. Les LT CD4+ peuvent aussi se différencier en LT folliculaire helper activant les LB Fo via la sécrétion de l'IL-10 et IL-21 dans les centres germinatifs et permettent *in fine* la sécrétion d'Ig et la production de LB mémoires. Enfin, les LTreg sont eux impliqués dans la tolérance et la régulation de la réponse immunitaire via la sécrétion d'IL-10 et de TGF- β . Ces LTregs peuvent aussi être générés naturellement dans le thymus, alors appelés tTregs. Les LT CD8 deviennent eux des LT CD8+ cytotoxiques effecteurs qui, à leur rencontre avec leurs cellules cibles, et conduisent à la lyse de ces cellules.

Abréviations : **LT**, Lymphocyte T ; **IL**, Interleukin ; **IFN- γ** , Interferon- γ ; **TH**, Lymphocyte T helper ; **TGF- β** , Transforming growth factor- β ; **TNF- α** , Tumor necrosis factor α .

Au cours de ce stade DP, commence le réarrangement des gènes de régions variables de la chaîne α ($V\alpha$, $J\alpha$) du TCR (locus *Tcra*) conduisant à l'expression de l'hétérodimère TCR $\alpha\beta$. Ce TCR subit ensuite une sélection positive grâce aux interactions avec les molécules de CMH (CMH II pour les LT CD4+, CMH I pour les LT CD8+), responsables de la présentation de l'antigène aux LT (Rothenberg, 2014). Ils subissent également une sélection négative, permettant d'éliminer les LT ayant une forte réactivité envers des antigènes du soi (Koch, 2011). Après passage de ces 2 étapes de sélection, le LT DP devient SP CD4 ou CD8.

II-2.3. Le LT en périphérie

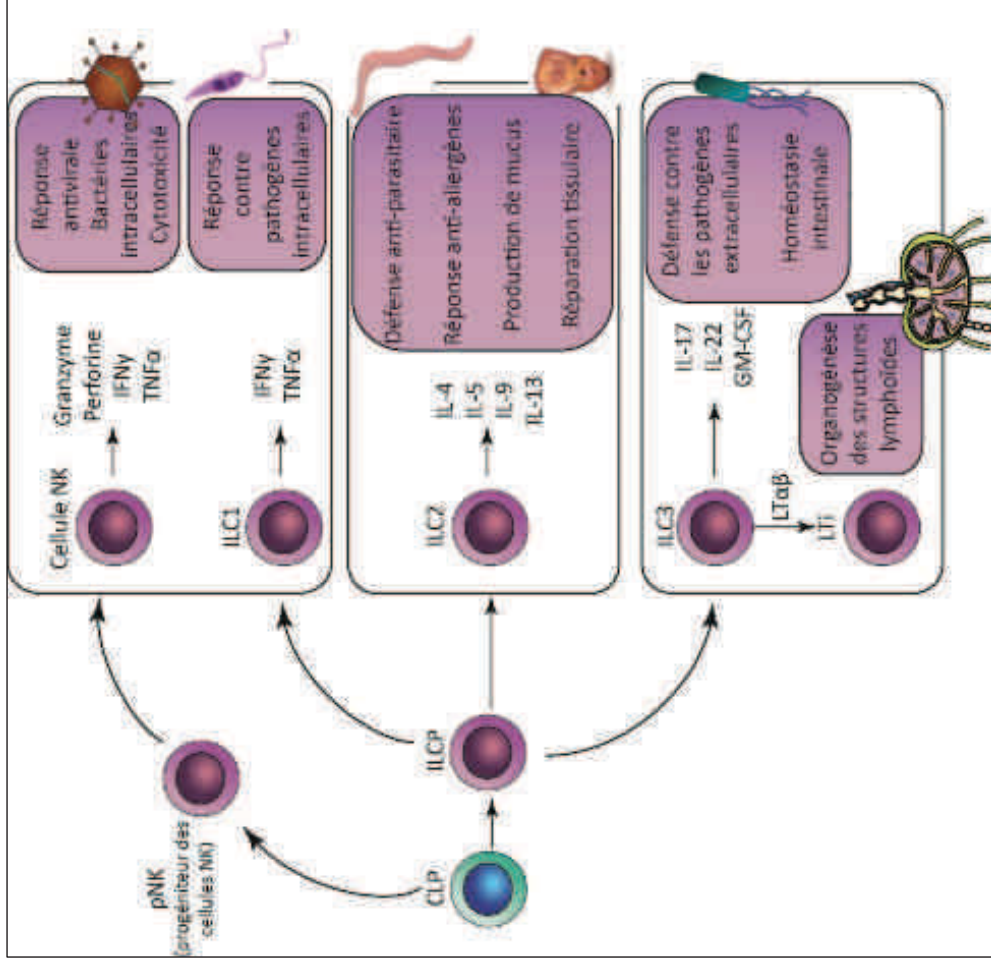
Une fois autorisés à quitter le thymus et migrer en périphérie, les LT vont se diversifier afin d'acquérir de nombreux rôles effecteurs. Leur rôle final leur sera dicté par leur environnement et la sécrétion de nombreuses cytokines.

Parmi les LT CD4 effecteurs, on pourra distinguer les **Th17, possédant un programme transcriptionnel défensif et conduisant à une réponse inflammatoire**. Ils sont caractérisés par la sécrétion d'IL-17, IL-21 et IL-22 (Ouyang, 2012). Nécessaires à la réponse antivirale et à la destruction de bactéries intracellulaires notamment par activation des macrophages, **les Th1 se distinguent par la sécrétion d'IFN γ** . De la même façon, **les Th2 sécrètent des cytokines (IL-4 et IL-13) qui vont activer les LB et stimuler leur prolifération et différenciation**, via également l'échange de signaux membranaires (CD40-CD40L). Ils sont notamment impliqués dans la défense antiparasitaire.

D'autres LT CD4, tels que les Tfh (pour LT folliculaire helper), auront un programme transcriptionnel permettant de promouvoir la réponse humorale, conduisant exclusivement à une aide aux LB, à leur stimulation et, *in fine*, à la sécrétion d'Ig et la production de LB mémoires. **Enfin, les LT régulateurs (Tregs) contrebalancent une réponse inflammatoire excessive en produisant des signaux inhibiteurs, et notamment en sécrétant l'IL-10 ou du TGF (pour Tumor growth factor) β , cytokines immunosuppressives (Figure 27) (Xing, 2012).**

Les LT CD8+ quant à elles, ces cellules se différencient en LT cytotoxiques capables d'éliminer les cellules cibles par sécrétion de perforine et granzyme, notamment. La perforine sera en effet capable de conduire à la formation de pores au niveau de la membrane plasmique et provoquer ainsi la lyse de la cellule cible. Le granzyme quant à lui, engendrera la mort cellulaire par apoptose (Hald Andersen, 2006).

FIGURE 28 : Les lymphocytes innés et leurs fonctions



Les lymphocytes innés se subdivisent en 3 groupes appelés ILC1 (comprenant les cellules NK), ILC2 et ILC3. Les ILC1 se caractérisent par la sécrétion de cytokines et enzymes (pour les NK) responsables de la mise en place d'une réponse dirigée contre des pathogènes intracellulaires tels que les virus, ainsi que d'une réponse anti-tumorale. Les ILC2 sont surtout impliqués dans la défense anti-parasitaire et anti-allergènes, ainsi que dans la sécrétion de mucus. Enfin, les ILC3, impliqués dans la défense contre les pathogènes extracellulaires et dans l'homéostasie intestinale, comprennent un groupe de lymphocytes appelés LTI, responsables de l'organogénèse des structures lymphoïdes comme les ganglions, par exemple.

Abréviations : **CLP**, Common lymphoid progenitor ; **GM-CSF**, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor ; **IFN**, Interferon ; **IL**, Interleukine ; **ILC**, Innate lymphoid cells ; **ILCP**, ID2+PLZF+ ILC precursor ; **LTI**, Lymphoid tissue inducer ; **NK**, Natural killer ; **TNF α** , Tumor necrosis factor α .

II-3. Lymphocytes innés

Les lymphocytes innés ou ILCs, sont un groupe particulier de lymphocytes capables de répondre rapidement en cas d'infection ou dommages tissulaires. A l'heure actuelle, 3 groupes ont été décrits, se développant en parallèle des LB et LT (Figure 28) (Zook, 2016).

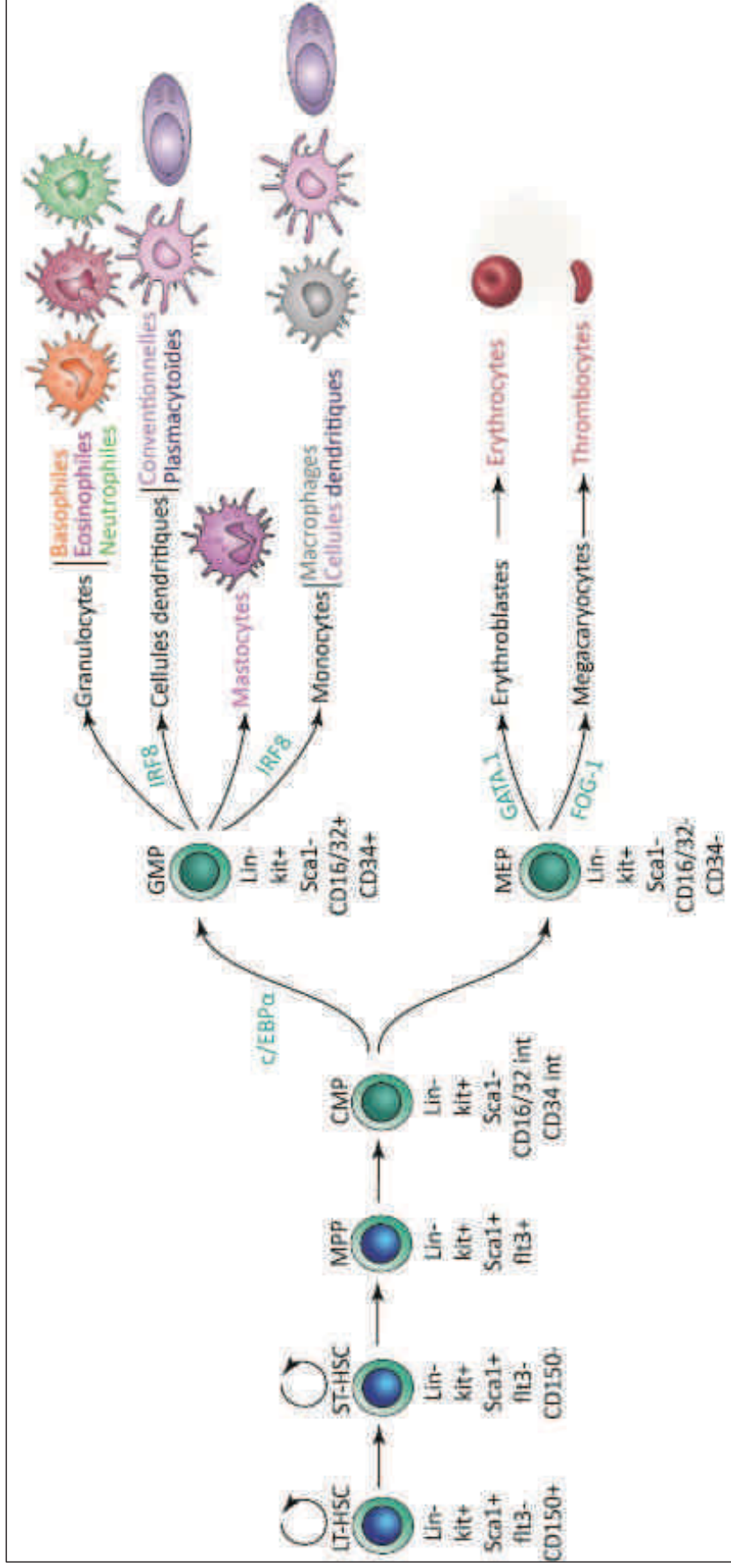
Les cellules NK appartiennent à un 1^{er} groupe englobant aussi les cellules ILC1 (et nommé de façon générale ILC1). Ces cellules permettent la mise en place d'une réponse immunitaire contre des pathogènes intracellulaires (comme par exemple des protozoaires comme *Leishmania* ou des bactéries intracellulaires telles que les mycobactéries), les virus et permettent une réponse anti-tumorale (Zucchini, 2009).

Etant le pendant des LT cytotoxiques, ces cellules NK ont la capacité d'induire directement la mort cellulaire par apoptose après liaison du récepteur Fas sur les cellules cibles (les cellules NK exprimant le ligand de Fas, FasL). Elles contiennent en outre des granules permettant la libération de perforine et de protéases responsables de la mort par apoptose des cellules cibles. Les ILC1 quant à eux sont spécialisés dans la réponse dirigée contre les pathogènes intracellulaires (Seillet, 2016).

Les cellules formant le second groupe d'ILCs (les ILC2) sont à l'origine de la sécrétion de cytokines permettant la différenciation des LT CD4+ en Th2, majoritairement impliqués dans la défense anti-parasitaire (Walker, 2013). De plus, ces cellules sont à l'origine (comme mentionné précédemment) de la sécrétion de mucus ainsi que de la réparation de tissus endommagés (Serafini, 2015 ; Vacca, 2016).

Le dernier groupe d'ILCs, les ILC3, est nécessaire au bon développement des ganglions lymphatiques, des plaques de Peyer au cours du développement fœtal, et, de façon générale, de toutes les structures lymphoïdes puisqu'ils comprennent les LTI (pour *lymphoid tissue inducer*). Ils sont notamment impliqués dans la défense contre les pathogènes extracellulaires, dans l'homéostasie microbienne intestinale et une dérégulation de leurs fonctions peut conduire au développement de colites (Montaldo, 2015). En outre, il paraît évident à ce jour que cette population cellulaire est présente dans tous les tissus lymphoïdes secondaires et participent au développement d'une réponse immunitaire adaptative (Gronke, 2016 ; Whitters, 2016).

FIGURE 29 : Développement de la lignée myéloïde



Comme pour la lignée lymphoïde, la lignée myéloïde est issue d'un progéniteur commun, le CMP. Celui-ci donne ensuite naissance à la voie des granulocytes et macrophages, issus du GMP, et aux globules rouges et plaquettes via le MEP. Des facteurs de transcription (en vert) sont responsables de l'entrée dans l'une ou l'autre lignée. Notamment c/EBP α , qui permet la formation de GMP, IRF8, particulièrement impliqué dans la différenciation des monocytes et cellules dendritiques, ou encore GATA-1 et FOG-1, orientant plutôt la différenciation vers la lignée des cellules érythrocytaires et des plaquettes.

Abréviations : **CD**, Cluster of differentiation ; **C/EBP α** , CCAAT/enhancer-binding protein α ; **c-kit**, V-Kit Hardy-Zuckerman 4 Feline Sarcoma Viral Oncogene-Like ; **CMP**, Common myeloid progenitor ; **FLT3**, fms like tyrosine kinase 3 ; **FOG-1**, Friend of GATA.1 protein ; **GATA.1**, GATA Binding Protein 1 ; **GMP**, Granulocyte/macrophage lineage-restricted progenitor ; **IRF8**, Interferon regulatory factor 8 ; **Lin**, lineage ; **LT-HSC**, Long-term hematopoietic stem cell ; **MEP**, Megakaryocyte/erythrocyte-restricted progenitor ; **MPP**, Multipotent hematopoietic progenitors ; **Sca1**, Stem-cell antigen 1 ; **ST-HSC**, Short-term hematopoietic stem cell.

III- DEVELOPPEMENT DES POPULATIONS MYELOÏDES

De la même façon que pour le compartiment lymphoïde, il existe un pendant myéloïde au CLP, appelé CMP, responsable de la production des granulocytes, macrophages, érythrocytes, plaquettes et cellules dendritiques (Akashi, 2000).

Ce CMP donnera naissance à deux intermédiaires, le GMP (pour *granulocyte/macrophage lineage-restricted progenitor*, avec un profil phénotypique CD16/32^{high}CD34+.) à l'origine de la formation des granulocytes et des macrophages, et le MEP (pour *megakaryocyte/erythrocyte lineage-restricted progenitor*, avec un profil phénotypique CD16/32^{low}CD34-) qui donnera les cellules érythrocytaires et les plaquettes (Akashi, 2000).

Deux types cellulaires unipotents furent découverts par Nakor et collègues qui isolèrent le progéniteur des mégakaryocytes, MKP (pour *megakaryocyte-committed progenitor*). Ce dernier est ainsi à l'origine des plaquettes (Nakor, 2003). De la même façon fut mis en évidence le progéniteur exclusif des érythrocytes, l'EP (pour *erythrocyte-committed progenitor*) (Figure 29) (Terszowski, 2005).

Ce développement myéloïde est favorisé par l'environnement médullaire, les progéniteurs lymphoïdes se situant principalement dans les régions centrales de la trame osseuse, alors que ceux de la lignée myéloïde se situent préférentiellement en bordure (Nagasawa, 2006 ; Kondo, 2010). Finalement, **cet engagement dans la lignée myéloïde dépend de nombreux facteurs de transcription** (Paul, 2015).

PU.1 paraît en effet essentiel au choix de la lignée. En effet, de forts taux de PU.1 sont requis pour le développement des macrophages, des taux intermédiaires pour la différenciation en granulocytes et finalement, de faibles taux sont suffisants pour l'entrée en lignée B (Wang, 2008).

De plus, des souris déficientes pour *c/EBPα* présentent un blocage du CMP vers les progéniteurs des monocytes et granulocytes, le GMP, alors qu'elles produisent un nombre normal de progéniteurs lymphoïdes (Zhang, 2004).

IRF8 d'autre part, a été observé comme impliqué dans cet engagement myéloïde, particulièrement pour les monocytes et les cellules dendritiques (Kurotaki, 2014), mais particulièrement en cours de développement plus qu'aux stades précoces (Sichien, 2016).

La lignée érythroïde quant à elle sera plus dépendante de facteurs tels que GATA-1 ou FOG-1 (pour *friend of GATA1*) puisque des embryons déficients pour GATA.1 présenteraient un blocage de la différenciation au stade pro-érythroblaste (Fujiwara, 1996) alors qu'un KO de FOG-1 bloquerait complètement la mégacaryopoïèse (Chang, 2002).

Ce cheminement est donc beaucoup mieux établi depuis peu et les facteurs de transcription nécessaires à chaque lignée mieux définis (Paul, 2015).

D'autre part, des cytokines telles que le TNF α ou l'IL-1 affecteraient l'hématopoïèse et favoriseraient le développement myéloïde au détriment de celui des lymphocytes. Le TNF α , par exemple, permettrait d'inhiber l'expression de CXCL12 nécessaire à la différenciation des LB (Ueda, 2005). Une autre cytokine, le G-CSF (pour *Granulocyte colony stimulating factor*) favoriserait la survie et la prolifération des cellules myéloïdes (Barreda, 2004 ; Hibbs, 2007). Néanmoins celui-ci n'est pas nécessaire à leur développement.

Nous allons maintenant aborder les défauts dans l'une ou l'autre de ces voies de différenciation, qui vont conduire au développement d'un groupe de pathologies appelé Déficits Immunitaires Primitifs.

PARTIE V - Déficits immunitaires primitifs (DIP)

I- GENERALITES

Les DIP constituent un groupe de plus de 300 pathologies (330, Picard, 2018) liées à des défauts génétiques et caractérisées par des anomalies de l'un ou plusieurs composants du système immunitaire. Ces défauts peuvent se traduire soit au niveau fonctionnel, avec par exemple perte de fonction d'une enzyme, soit par un blocage du développement (absence d'une ou plusieurs lignées cellulaires ; SCID (pour *Severe combined immunodeficiency disease*) par exemple, détaillé plus loin).

Ces pathologies peuvent affecter l'immunité innée et/ou adaptative et leur expression clinique est très variable. La plupart conduisent cependant à l'augmentation de la susceptibilité de l'individu aux infections, éventuellement au développement de symptômes autoimmuns, et à la mise en place d'un état inflammatoire. Leur diagnostic est souvent retardé, notamment dans le cas d'infections communes (sinusites, otites, infections bronchiques...) (McCusker, 2011).

Leur nombre augmentant d'année en année (Bousfiha, 2013 ; Picard, 2018), ils ne sont à ce jour plus considérés, dans leur ensemble, comme des maladies rares et font l'objet d'un recensement annuel et d'une classification particulière permettant de faciliter le diagnostic et la recherche clinique (Bousfiha, 2018 ; Picard, 2018). Cette classification permet de regrouper entre eux des déficits partageant des mécanismes physiopathologiques ainsi que des caractéristiques phénotypiques

communs, et est réalisée par un comité d'experts scientifiques appelé IUIS (pour *International Union of Immunological Societies*) (Bousfiha, 2018 ; Picard, 2018).

Nous détaillerons dans cette partie une famille de DIP particuliers, appelés SCID, caractérisés par une atteinte de la lignée des LT, associée ou non à une atteinte des LB et des NK.

II- DEFICIT IMMUNITAIRE COMBINE SEVERE (SCID)

Les SCID constituent un groupe de maladies rares (prévalence de 1/50 000), monogéniques (Romano, 2012), due à une atteinte profonde de la différenciation des LT. Plusieurs formes de SCID peuvent être retrouvées pour lesquelles l'absence de T peut être accompagnée d'une déficience en LB et/ou en cellules NK. Résultant en une absence de réponse immunitaire adaptative, les patients sont sujets à des infections récurrentes dès le plus jeune âge. De nombreux gènes sont impliqués dans ces pathologies, et à l'heure actuelle, 16 ont été identifiés (Bousfiha, 2018). Les SCID peuvent avoir des tableaux cliniques très hétérogènes incluant généralement des infections récurrentes et sévères, parfois létales, la plupart du temps se développant très tôt. A cela peut aussi s'ajouter un défaut de croissance staturo-pondéral (Tasher, 2012).

Ces pathologies sont classées selon quatre groupes : T-B+NK+, T-B+NK-, T-B-NK+, T-B-NK- (le caractère « - » signifiant l'atteinte d'une lignée cellulaire et le caractère « + » une non atteinte de la lignée cellulaire) (**Tableau 10**) (Bousfiha, 2018).

TABLEAU 10 : Principales caractéristiques des déficits immunitaires combinés sévères (SCID)

	GENE IMPLIQUE (fonction de la protéine codée)	ANOMALIES LYMPHOCYTAIRES				SYMPTOMES PARTICULIERS ASSOCIES (en dehors des infections)
		LT	LB	CELLULES NK	Ig	
■ T-B-NK-						
Déficit en Adénosine déaminase	ADA (catalyse le recyclage des purines)	Très abaissés	Peu, diminués	Peu	Peu, diminuées	Déficits neurologiques, perte d'audition, dommages hépatiques, anomalies osseuses, protéinose alvéolaire pulmonaire (entraîne difficultés respiratoires)
Dysgénésie réticulaire	AK2 (catalyse la phosphorylation des nucléosides mono- et tri-phosphates)	Très abaissés	Normaux à diminués	Peu	Diminuées	Neutropénie profonde, thrombocytopénie, surdité
■ T-B-NK+						
Déficit en RAG1/2	RAG1/2 (enzyme de la recombinaison VDJ)	Très abaissés	Très abaissés	Normales	Diminuées	Granulome, lymphome associé à EBV
Déficit en DCLRE1C	DCLRE1C (ARTEMIS) (enzyme de la recombinaison VDJ)	Très abaissés	Très abaissés	Normales	Diminuées	Sensibilité aux rayonnements
Déficit en DNA-PK	PRKCD (enzyme de la recombinaison VDJ / permet NHEJ)	Très abaissés	Très abaissés	Normales	Variable	Sensibilité aux rayonnements, microcéphalie
Déficit en CERNUNNOS/XLF	CERNUNNOS/XLF/NHEJ1 (impliqué dans la réparation de l'ADN)	Très abaissés	Très abaissés	Normales	Diminuées	Sensibilité aux rayonnement, microcéphalie, dymorphisme facial
Déficit en DNA ligase IV	LIG4 (impliqué dans la ligation de l'ADN)	Très abaissés	Très abaissés	Normales	Diminuées	Microcéphalie, dymorphisme facial
■ T-B+NK-						
Déficit en chaîne commune γ	IL2RG (l'une des chaîne du récepteur aux cytokines γ)	Très abaissés	Normaux voire élevés	Peu	Diminuées	Retard de croissance, troubles lymphoprolifératifs
Déficit en JAK3	JAK3 (signalisation du récepteur aux cytokines γ)	Très abaissés	Normaux voire élevés	Peu	Diminuées	Retard de croissance, troubles lymphoprolifératifs
■ T-B+NK+						
Déficit en IL-7R α	IL-7R (cytokine majeure dans le développement des cellules hématopoïétiques)	Très abaissés	Normaux voire élevés	Normales	Diminuées	Fièvre, retard staturo-pondéral
Déficit en coronine-1A	CORO1A (protéine régulant l'actine / activité antibactérienne++)	Très abaissés	Normaux	Normales	Diminuées	Syndrome lymphoprolifératif, molécule impliqué dans le développement thymique mais thymus détectable
Déficit en CD45	PTPRC (phosphatase impliqué dans la voie JAK / active les LB et LT)	Très abaissés	Normaux	Normales	Diminuées	LT γ δ normaux
Déficit en CD3 δ /CD3 ϵ /CD3 ζ	CD3D/CD3E/CD247 (co-récepteurs du TCR)	Très abaissés	Normaux	Normales	Diminuées	Pas de LT γ δ, manifestations autoimmunes
Déficit en FOXP1	FOXP1 (impliqué dans la maturation des LT / régule l'expression de la kératine)	Très abaissés	Normaux	Normales	Normales	Epithélium thymique anormal (molécule impliquée dans le développement thymique), alopecie, dystrophie des ongles, défaut au niveau du tube neural

Abréviations : **ADA**, Adénosine déaminase ; **AK2**, Adenylate kinase 2 ; **CORO1A**, Coronin-1A ; **DCLRE1C**, DNA cross-link repair protein 1C ; **EBV**, Epstein-Barr virus ; **FOXP1**, Forkhead box N1 ; **Ig**, Immunoglobulines ; **IL2RG**, IL-2 receptor gamma ; **IL-7R**, IL-7 receptor ; **JAK3**, Janus kinase 3 ; **LB**, Lymphocytes B ; **LIG4**, ADN ligase IV ; **LT**, Lymphocytes T ; **NHEJ1**, Non-homologous end-joining 1 ; **NK**, Natural killer ; **PRKCD**, Protein kinase, dna-activated, catalytic subunit ; **PTPRC**, Protein-tyrosine phosphatase, receptor-type, C ; **RAG1/2**, Recombination-activating gene 1

Dans leur forme moins sévère, les SCID sont appelés CID (pour *Déficits immunitaires combinés*). Nous développerons quelques exemples de SCID T- B+ NK- et T- B- NK- et les CID avec atteinte des LT et/ou les LB, puisqu'ils se rapportent en particulier, en terme de phénotype cellulaire, à ce que nous avons pu observer dans le modèle murin STING V154M/WT développé dans cette thèse.

II-1. SCID T-B+NK-

- Exemple du déficit en JAK3 –

Chez les patients atteints de ce DIP, les lignées T et NK sont atteintes. Bien que les LB soient produits en quantité normale, leur activation, prolifération et différenciation sont impactées, provoquant une hypogammaglobulinémie sévère (Tasher, 2012).

Cette mutation autosomale récessive perte de fonction résulte en une absence totale ou un dysfonctionnement sévère de la Janus kinase 3 (JAK3), une tyrosine kinase intracellulaire notamment impliquée dans la signalisation de récepteurs de cytokines porteurs de la chaîne γ (Tableau 10) comme par exemple les récepteurs aux cytokines IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 ou encore IL-21 (Haan, 2011). Ce SCID se caractérise par de sévères infections bactériennes, virales et fongiques ainsi qu'un retard de croissance staturo-pondéral (Notarangelo, 2005).

La déficience en cellules NK chez ces patients concorde avec le phénotype d'un modèle murin, porteur d'une mutation perte de fonction spontanée dans *Jak3* (B6.Cg-Nr1d1^{tm1Ven}/LazJ), et qui développe un phénotype SCID et est incapable de produire des ILCs. En effet, un blocage se produit au niveau médullaire au stade des précurseurs des ILCs.

De plus, il a déjà été reporté chez l'Homme une incapacité des ILC1 à produire de l'IFN γ , et une différenciation de même qu'une prolifération diminuée à la fois pour les ILC1 et 3, en cas de traitement par un inhibiteur de JAK3, le Tofacitinib (Robinette, 2018).

Etant donné que sa clinique ne permet pas de faire la distinction entre ce syndrome et le X-SCID causé par une mutation dans la chaîne γ (appelée aussi IL-2R γ), son diagnostic précis (en dehors d'un diagnostic génétique) est difficile. Le traitement de choix de cette pathologie reste, comme pour la plupart des SCID, une greffe allogénique de moelle osseuse, avec un traitement prophylactique destiné à éviter le développement d'infections (Notarangelo, 2005 ; Picard, 2018 ; Bousfiha, 2018).

II-2. SCID T-B-NK-

- Exemple du déficit en Adénosine déaminase (ADA) –

L'adénosine déaminase, ou ADA, est une enzyme clé exprimée de manière ubiquitaire, impliquée dans la voie de récupération/recyclage des purines qui permet la synthèse des nucléotides puriques à partir d'intermédiaires de dégradation des nucléotides. Ce recyclage permet, *in fine*, la production d'AMP et de GMP, et ce de façon moins coûteuse en énergie que la voie de biosynthèse *de novo*

(c'est-à-dire la synthèse de nucléotides à partir de précurseurs simples, plutôt que par recyclage). Bien qu'ubiquitaire, cette enzyme est retrouvée en plus grandes quantités dans les tissus lymphoïdes (thymus notamment), le cerveau et le tractus gastrointestinal, en raison du plus grand renouvellement de cellules (Flinn, 2018).

Un déficit en ADA conduit à l'accumulation de métabolites de l'adénosine (2'déoxyadénosine, déoxyadénosine triphosphate), toxiques pour la différenciation des lymphocytes T, B et NK (Apassov, 2001). Ainsi, un déficit en ADA conduit à un syndrome de type SCID T-B-NK- (Sauer, 2012). Apasov et collaborateurs ont d'ailleurs pu observer, dans un modèle murin ADA^{-/-}, une apoptose accrue des cellules au niveau thymiques. Cet effet n'est pas retrouvé en périphérie dans les organes lymphoïdes secondaires tels que la rate ou les ganglions (Apassov, 2001).

Ainsi, ce SCID est caractérisé par une lymphocytopénie sévère affectant toutes les populations lymphoïdes, ainsi qu'une forte hypogammaglobulinémie. D'autres manifestations non immunologiques peuvent aussi être observées en raison de la nature de l'enzyme et de son caractère ubiquitaire. Par exemple, on peut citer le développement d'une fibrose pulmonaire, de déficits neuro-développementaux, d'une surdité et d'anomalies osseuses (Whitmore, 2016). En outre, les enfants ADA-déficients présentent aussi des troubles du comportement (hyperactivité, asocialité, troubles de l'attention, agressivité) ainsi qu'un QI plus faible que la moyenne (Flinn, 2018).

Son diagnostic est facilité par la mesure de l'activité de l'enzyme ADA, ainsi que de quantifier les métabolites de l'adénosine. A l'heure actuelle, le traitement de ce syndrome inclut une greffe allogénique de moelle osseuse ou une thérapie de substitution en ADA par d'administration d'un moyen d'un dérivé pégylé de l'ADA. Cette dernière n'assure pas un traitement complet de ce syndrome mais permet tout de même une détoxification des métabolites toxiques (Flinn, 2018 ; Picard, 2018 ; Bousfiha, 2018).

III- DEFICIT IMMUNITAIRE COMBINÉ (CID)

De la même façon que pour le SCID, le CID s'articule autour de mutation dans des gènes impliqués dans le système immunitaire, mais responsable d'atteintes moins sévères que les SCID (**Tableau 11**). En effet, alors que les SCID présentent une absence totale de LT, plus ou moins accompagnée d'une absence de LB et cellules NK, les CID ne montrent pas de lymphopénie aussi sévère.

TABLEAU 11 : Principales caractéristiques des déficits immunitaires combinés (CID)

	GENE IMPLIQUE	MANIFESTATION				CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUES ASSOCIEES
		LT	LB	CELLULES NK	Ig	
▪ Absence de LT CD4+						
Déficit en CMH II	RFXANK/ CIITA / RFX5 / RFXAP (présentation de l'Ag aux LT)	Peu	Normaux		Normales à diminuées	Infections respiratoires, pathologies du foie/tractus biliaire, diarrhées
▪ Diminution des LT CD4+						
Déficit en MAGT1	MAGT1 (transport du Mg ²⁺)	Peu de CD4+ Activation faible	Normaux			Infections virales récurrentes (notamment EBV)
Déficit en LCK	LCK (tyrosine kinase impliquée dans la signalisation du TCR)	Peu de CD4+	Normaux		IgG et IgA normales IgM élevées	Autoimmunité, peu de Tregs, répertoire des LT restreint, signalisation du TCR diminuée
Déficit en UNC119	UNC119 (induit la prolifération des LT, activateur des tyrosine kinases Src)	Peu de CD4+			Normales	Infections récurrentes
▪ Diminution des LT CD8+						
Déficit en CD8	CD8A (co-récepteur au TCR)	Pas de CD8, CD4 normaux	Normaux		Normales	Souvent asymptomatique
Déficit en ZAP70	ZAP70 (tyrosine kinase impliquée dans la signalisation du TCR)	Peu de CD8, Diminution fonctions des LT CD4 mais nombre normal	Normaux	Normales	Normales	Autoimmunité, peu de Tregs, répertoire des LT restreint, signalisation du TCR diminuée
Déficit en CMH I	TAP2 / TAP1 / TAPBP (transporteurs permettant le passage de peptides antigéniques du cytoplasme vers le RE)	Peu de CD8+, CD4+ normaux	Normaux		Normales	Vasculopathies, gangrène
	B2M (composant du CMH I – sécrété par les cellules tumorales ou par les LB en cas de myélomes / leucémies / maladies auto-immunes / infections..)	Peu de CD8+, CD4+ normaux	Normaux		Normales	Infections pulmonaires, granulomes cutanés, hypoprotidémie (diminution du taux de protéines sériques)
▪ Diminution des LB						
Déficit en DOCK8	DOCK8 (protéine de signalisation)	Peu de LT, faible capacité proliférative	Peu de LB mémoires	Peu	Peu d'IgM IgG et IgA normales IgE élevées	Eczéma sévère, infections à <i>Staphylocoques</i> , cancer Eosinophilie, tolérance LB périphériques faible, Tregs peu actifs
Déficit en MST1	STK4 (sérine/thréonine kinase)	Peu Diminution des LT naïfs	Peu		Augmentées	Neutropénie intermittente, infections (virales, bactériennes, fongiques), lymphoprolifération EBV, cytopénies autoimmunes, lymphomes, pathologies cardiaques Peu d'effecteurs mémoires, faible prolifération cellulaire
Déficit en IL21	IL21 (stimule la prolifération et différenciation des LB)	Diminution fonctions des LT mais nombre normal	Peu		IgG abaissées	Colites sévères
Déficit en NIK	MAP3K14 (sérine/thréonine kinase impliquée dans la signalisation de NF-κB)	Nombre normal mais faible capacité proliférative	Peu de LB mémoires	Peu	Diminuées	Infections (virales, bactériennes et à <i>Cryptococcus</i>)
Déficit en Moésine	MSN (agent de réticulation entre les protéines plasmiques et le cytosquelette d'actine. Interagit avec CD43)	Migration et prolifération défectueuses mais nombre normal	Nombre diminué		Peu d'IgG	Infections récurrentes (bactérienne, varicelle), neutropénie

Abréviations : **B2M**, β2-microglobuline ; **CIITA**, Major histocompatibility complex, class II, transactivator ; **CMH**, Complexe majeur d'histocompatibilité ; **DOCK8**, Deducator of cytokinesis 8 ; **EBV**, Epstein Barr Virus ; **Ig**, Immunoglobuline ; **IL-21**, Interleukine 21 ; **LB**, Lymphocyte B ; **LCK**, Lymphocyte-specific protein-tyrosine kinase ; **LT**, Lymphocyte T ; **MAGT1**, Magnesium transporter 1 ; **MAP3K14**, Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14 ; **MSN**, Moesin ; **NK**, Natural killer ; **RFX5**, Regulatory factor X 5 ; **RFXANK**, Regulatory factor X, ankyrin repeat-containing ; **RFXAP**, Regulatory factor X-associated protein ; **STK4**, Serine/threonine protein kinase 4 ; **TAP**, TIP-associated protein ; **ZAP70**, zeta-chain-associated protein kinase70.

Les symptômes les plus courants restent de façon évidente une grande susceptibilité aux infections, avec des atteintes respiratoires fréquentes, notamment. Certains types de CID peuvent être traités tout comme le SCID, par une greffe allogénique de moelle osseuse.

III-1. CID AVEC DIMINUTION DES LT CD4+

- Exemple du déficit en LCK –

La protéine LCK est l'une des toutes premières permettant la transmission du signal à partir du TCR. En effet, après activation du TCR, LCK va phosphoryler les motifs ITAMs présents au niveau de son domaine intracellulaire, après quoi ZAP70 sera activée et conduira à son tour à l'activation de la cascade de signalisation.

Un déficit en LCK conduit chez les patients à une forte immunodérégulation. En effet, des patients déficients pour LCK présentent ainsi une lymphopénie T avec très peu de CD4 et CD8 exprimés à la membrane des LT. De plus, il paraît évident que ces LT présentent un défaut d'activation puisqu'il n'y a aucune transmission du signal du TCR. Néanmoins, Fyn, une autre kinase capable elle aussi de phosphoryler les motifs ITAM du TCR, peut compenser l'absence de Lck. C'est pourquoi on retrouve chez ces patients un défaut seulement partiel en LT, et non total.

Même partiel, un défaut en LT peut conduire à un phénotype sévère comme des infections récurrentes à un âge précoce, un retard staturo-pondéral, des pathologies inflammatoires touchant la peau et les muqueuses notamment, et le développement d'une autoimmunité. Celle-ci peut notamment s'expliquer en raison de la signalisation anormale du TCR, occasionnant des défauts dans les mécanismes de tolérance dans le thymus.

Les patients présentent en outre des défauts en Tregs mais une expansion des LT mémoires. En effet, ces LT sont capables de répondre à l'Ag indépendamment de Lck ([Hauck, 2012](#) ; [Picard, 2018](#) ; [Bousfiha, 2018](#)).

III-2. CID avec diminution des LT CD8+

- Exemple du déficit en ZAP70 –

De la même façon que pour le défaut en LCK, le déficit en ZAP70 occasionne une signalisation amoindrie du TCR. En effet, après activation par LCK, c'est ZAP70 qui se chargera à son tour de transmettre le signal à LAT qui à son tour activera les différentes cascades de signalisation engagées par le TCR. Associée au TCR, cette protéine est ainsi impliquée dans la différenciation et la fonction des LT.

Un déficit en ZAP70 conduit à des infections virales et opportunistes récurrentes apparaissant très précocement chez les patients. De plus, ils présentent souvent des infections respiratoires et des

candidoses orales, malgré le fait qu'ils présentent par ailleurs un nombre normal de lymphocytes (et un nombre normal de LT CD4).

Le traitement de choix, tout comme pour les SCID, reste la greffe allogénique de moelle osseuse ([Walkovich, 2017](#) ; [Wang, 2010](#) ; [Picard, 2018](#) ; [Bousfiha, 2018](#)).

III-3. CID avec diminution des LB

- Exemple du déficit en IL-21 –

Cette interleukine fait partie de la famille des cytokines à récepteurs à chaîne γ . Elle est notamment impliquée dans la prolifération et l'activation des LT et LB, de même que dans la cytotoxicité des cellules NK. Comme pour les autres cytokines de cette famille, la signalisation induite par cette cytokine passe par JAK1/3 qui activent à leur tour STAT1,3 et 5.

Un déficit en IL-21 conduit à une différenciation altérée des LB, ainsi qu'une production défectueuse de cytokines par les LT, et une cytotoxicité amoindrie des cellules NK.

Les patients atteints par un tel déficit présentent de sévères infections (telle qu'une cryptosporidiose), notamment pulmonaires (tuberculose), et peuvent présenter à terme une insuffisance hépatique. Il a cependant été observé une hétérogénéité dans les phénotypes liés à un déficit en IL-21 puisque des patients sans cryptosporidiose peuvent être retrouvés, ou certains patients peuvent par exemple développer des maladies intestinales inflammatoires.

A l'heure actuelle, très peu de cas ont été diagnostiqués comme présentant des mutations dans le gène de l'IL-21 ou dans son récepteur ([Stepensky, 2014](#) ; [Erman, 2015](#) ; [Picard, 2018](#) ; [Bousfiha, 2018](#)).

PROJET DE THESE

Avant-propos

La thématique globale de mon équipe d'accueil s'inscrit dans la recherche de l'étiologie génétique du lupus érythémateux systémique (LES), une maladie auto-immune systémique, complexe et sévère, hétérogène sur le plan clinique et se caractérisant par la présence d'autoanticorps, dont des autoanticorps antinucléaires. L'étiologie génétique du LES est encore mal connue. C'est dans cette optique que mon équipe d'accueil travaille en collaboration avec le laboratoire du Dr F. Rieux-Laucat (Institut Imagine, Paris), dans le cadre d'un projet ANR (LUMUGENE).

L'équipe du Dr. Rieux-Laucat a identifié dans une famille comportant 3 membres affectés par un SAVI, une mutation hétérozygote (conduisant à la substitution V155M) dans l'exon 5 du gène *TMEM173* codant pour la protéine STING (pour STimulator of Interferon Gene) (Jeremiah, 2014). Cette mutation, qui a par ailleurs été retrouvée dans des cas sporadiques de SAVI, entraînerait une hyperactivité de STING.

Comme présenté dans l'introduction, STING est considéré comme senseur d'ADN cytosolique et acteur central dans la mise en place d'une réponse IFN notamment dans le cas d'infections virales ou bactériennes. Cependant, si l'ADN du soi est habituellement confiné dans le noyau ou les mitochondries, il peut aussi, dans certaines circonstances, se retrouver au niveau cytoplasmique et ainsi conduire au développement d'une autoimmunité chez l'Homme et la souris.

La mutation précédemment mentionnée affecte le domaine de dimérisation de STING (très homologue entre l'Homme et la souris) favorisant sa dimérisation, processus requis pour son activation. Nos collaborateurs ont également montré l'activité constitutive du mutant humain V155M *in vitro*. Enfin, une augmentation de la production d'IFN I par les cellules des patients a été démontrée, conséquence attendue d'une hyperactivité de STING (Jeremiah, 2014).

Nous avons donc généré un modèle murin de la pathologie porteur de la mutation ponctuelle hétérozygote V154M/WT, correspondant à la mutation V155M chez l'Homme (la plus fréquemment décrite jusqu'ici chez les patients atteints de SAVI), de façon à permettre une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu, de l'impact de cette mutation sur le système immunitaire et finalement, du rôle des IFN I dans le phénotype des souris.

Ainsi, nous nous sommes en premier lieu intéressés au phénotype des souris STING V154M/WT, et de sa dépendance vis-à-vis des IFN I en les croisant avec des souris déficientes pour le récepteur aux

IFN I (IFNAR, souris STING V154M/WT / IFNAR KO). De plus, considérant la lymphopénie observé chez les patient SAVI et du développement d'un phénotype SCID chez nos souris, nous nous sommes aussi intéressés au rôle de STING dans le développement lymphoïde. Ce travail a fait l'objet d'un article publié cette année ([Bouis, 2018](#) ; **article page 102**).

Dans la seconde partie de la thèse, nous avons complété les premiers résultats obtenus avec les souris STING V154M/WT / IFNAR KO, puis nous nous sommes particulièrement intéressés au rôle de STING dans le développement lymphocytaire. Nous avons souhaité savoir si le blocage de développement lymphocytaire dans les souris transgéniques était intrinsèque aux cellules hématopoïétiques ou dépendaient des cellules stromales médullaires. Enfin, nous avons débuté des études de voies de signalisation qui pourraient être impactées par le gain de fonction de STING, afin de mettre en évidence un mécanisme moléculaire responsable du phénotype SCID observé.

RESULTATS

PARTIE I

Severe combined immunodeficiency in stimulator of interferon genes (STING) V154M/wild-type mice

Delphine Bouis, PharmD, MSc,^a Peggy Kirstetter, PhD,^{b,c,d} Florent Arbogast, MSc,^{a,e} Delphine Lamon, TA,^a Virginia Delgado, PhD,^a Sophie Jung, DDS, PhD,^{a,f} Claudine Ebel, GE,^{b,c,d} Hugues Jacobs, PhD,^{b,c,d,g,h} Anne-Marie Knapp, GE,^{a,i} Nadia Jeremiah, PhD,^j Alexandre Belot, MD, PhD,^{k,l} Thierry Martin, MD, PhD,^{a,i,m} Yanick J. Crow, MD, PhD,^{n,o,p} Isabelle André-Schmutz, PhD,^{o,q} Anne-Sophie Korganow, MD, PhD,^{a,i,m} Frédéric Rieux-Laucat, PhD,^{o,r} and Pauline Soulas-Sprauel, PharmD, PhD^{a,m,s} *Strasbourg, Illkirch, Illkirch-Graffenstaden, Paris, and Lyon, France, and Edinburgh, United Kingdom*

Background: Autosomal dominant gain-of-function mutations in human stimulator of interferon genes (STING) lead to a severe autoinflammatory disease called STING-associated vasculopathy with onset in infancy that is associated with enhanced expression of interferon-stimulated gene transcripts. **Objective:** The goal of this study was to analyze the phenotype of a new mouse model of STING hyperactivation and the role of type I interferons in this system.

Methods: We generated a knock-in model carrying an amino acid substitution (V154M) in mouse STING, corresponding to a recurrent mutation seen in human patients with STING-associated vasculopathy with onset in infancy. Hematopoietic development and tissue histology were analyzed. Lymphocyte activation and proliferation were assessed *in vitro*. STING V154M/wild-type (WT) mice were crossed to IFN- α/β receptor (IFNAR) knockout mice to evaluate the type I interferon dependence of the mutant Sting phenotype recorded.

Results: In STING V154M/WT mice we detected variable expression of inflammatory infiltrates in the lungs and kidneys. These mice showed a marked decrease in survival and developed a severe combined immunodeficiency disease (SCID) affecting B, T, and natural killer cells, with an almost complete lack of antibodies and a significant expansion of monocytes and granulocytes. The blockade in B- and T-cell development was

present from early immature stages in bone marrow and thymus. In addition, *in vitro* experiments revealed an intrinsic proliferative defect of mature T cells. Although the V154M/WT mutant demonstrated increased expression of interferon-stimulated genes, the SCID phenotype was not reversed in STING V154M/WT IFNAR knockout mice. However, the antiproliferative defect in T cells was rescued partially by IFNAR deficiency.

Conclusions: STING gain-of-function mice developed an interferon-independent SCID phenotype with a T-cell, B-cell, and natural killer cell developmental defect and hypogammaglobulinemia that is associated with signs of inflammation in lungs and kidneys. Only the intrinsic proliferative defect of T cells was partially interferon dependent. (J Allergy Clin Immunol 2018;■■■■:■■■■-■■■■.)

Key words: Severe combined immunodeficiency, stimulator of interferon genes, V154M, type I interferon

Since its identification as an adaptor molecule in the cytosolic DNA-sensing pathway, stimulator of interferon genes (STING) has emerged as a central player in antiviral and antibacterial immunity, autoinflammation, and cancer.¹⁻⁵ STING is an

From ^aCNRS UPR 3572 “Immunopathology and Therapeutic Chemistry”/Laboratory of Excellence Medalis, Institute of Molecular and Cellular Biology (IBMC), Strasbourg; ^bInstitut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Illkirch; ^cInstitut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U964, Illkirch; ^dUniversité de Strasbourg, Illkirch; ^eUFR Sciences de la Vie, Université de Strasbourg, Strasbourg; ^fHôpitaux Universitaires de Strasbourg, Pôle de Médecine et de Chirurgie Bucco-dentaires, Centre de référence des maladies rares orales et dentaires (O’Rares) et Université de Strasbourg, Faculté de Chirurgie Dentaire, Strasbourg; ^gCentre National de Recherche Scientifique (CNRS), UMR7104, Illkirch; ^hCELPEDIA, PHENOMIN, Institut Clinique de la Souris (ICS), Illkirch-Graffenstaden; ⁱUFR Médecine, Université de Strasbourg, Strasbourg; ^jthe Immunity and Cancer Department, Institut Curie, PSL Research University, INSERM U932, Paris; ^kService de Néphrologie, Rhumatologie, Dermatologie pédiatriques, Centre de référence RAISE, HFME, Hospices Civils de Lyon; ^lINSERM UMR 1111, Université de Lyon, Lyon; ^mthe Department of Clinical Immunology and Internal Medicine, National Reference Center for Autoimmune Diseases, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg; ⁿINSERM UMR 1163, Laboratory of Neurogenetics and Neuroinflammation, Paris; ^oParis Descartes – Sorbonne Paris Cité University, Imagine Institute, Paris; ^pCentre for Genomic and Experimental Medicine, MRC Institute of Genetics and Molecular Medicine, University of Edinburgh, Edinburgh; ^qthe Laboratory of Human Lymphohematopoiesis, INSERM UMR 1163, Paris; ^rthe Laboratory of Immunogenetics of Pediatric autoimmune Diseases, INSERM UMR 1163, Paris; and ^sUFR Sciences Pharmaceutiques, Université de Strasbourg, Illkirch-Graffenstaden.

Supported by grants from Strasbourg University (UdS), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS); Agence Nationale de la Recherche (ANR-14-CE14-0026-04,

Lumugene; and ANR-11-EQPX-022); and the European Union-funded (ERDF) project INTERREG V “RARENET.” D.B. and F.A. were supported by Ministère de la Recherche et de la Technologie. V.D. was supported by Initiative of Excellence (IdEx), Strasbourg University, France. Y.J.C. acknowledges fellowship support from the European Research Council (GA 309449).

Disclosure of potential conflict of interest: A. Belot, Y. J. Crow, F. Rieux-Laucat, and P. Soulas-Sprauel are all collaborators in a project funded by the National Research Agency (ANR; no. ANR-14-CE14-0026-01, Lumugene). T. Martin, A.-S. Korganow, and P. Soulas-Sprauel received grants from the INTEREG program (EU-funded [ERDF] project INTERREG V “RARENET”). F. Rieux-Laucat received grants from Sanofi for the study of activating TMEM173 mutations in human subjects, a project that is not directly linked to this manuscript. The rest of the authors declare that they have no relevant conflicts of interest.

Received for publication October 9, 2017; revised February 24, 2018; accepted for publication April 3, 2018.

Corresponding author: Pauline Soulas-Sprauel, PharmD, PhD, CNRS UPR 3572 “Immunopathology and Therapeutic Chemistry,” Institute of Molecular and Cellular Biology (IBMC), 15 rue René Descartes, 67084 Strasbourg Cedex, France. E-mail: pauline.soulas@ibmc-cnrs.unistra.fr

0091-6749/\$36.00

Crown Copyright © 2018 Published by Elsevier Inc. on behalf of the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology.

<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.04.034>

Abbreviations used

APC:	Allophycocyanin
BM:	Bone marrow
BrdU:	5-Bromo-2'-deoxyuridine
cGAMP:	Cyclic GMP-AMP
CLP:	Common lymphoid progenitor
DD:	Dimerization domain
DN:	Double negative
ER:	Endoplasmic reticulum
FITC:	Fluorescein isothiocyanate
GOF:	Gain of function
HSC:	Hematopoietic stem cell
IFNAR:	IFN- α/β receptor
ILC:	Innate lymphoid cell
ISG:	Interferon-stimulated gene
KO:	Knockout
LN:	Lymph node
LT:	Lymphotoxin
NK:	Natural killer
PE:	Phycoerythrin
SAVI:	Sting-associated vasculopathy with onset in infancy
SCID:	Severe combined immunodeficiency
STING:	Stimulator of interferon genes
TBK1:	TANK-binding kinase 1
Treg:	Regulatory T
WT:	Wild-type

endoplasmic reticulum (ER)-associated membrane protein expressed in a wide variety of tissues, including endothelial, epithelial, and hematopoietic cell types.^{6,7} Signaling through STING can be induced by cyclic di-GMP, cyclic di-AMP, and cyclic GMP-AMP (cGAMP). Such pathogen-associated molecular patterns are recognized by STING, causing its activation and subsequent migration from the ER to perinuclear vesicles, where it recruits and activates TANK-binding kinase 1 (TBK1). STING-TBK1 then induces the phosphorylation, dimerization, and nuclear translocation of interferon regulatory factor 3, which drives a type I interferon response⁸ and the expression of a set of interferon-stimulated genes (ISGs). The STING-TBK1 axis is also known to phosphorylate I κ B, resulting in nuclear factor κ B release, nuclear translocation, and increased nuclear factor κ B-dependent gene expression, a pathway implicated in cellular stress, tumor progression, inflammation, and immunity.⁹ Finally, this axis can also lead to phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6), which mediates immune signaling in response to cytokines and viral infection.¹⁰

Therefore STING is an adaptor of DNA sensing, which appears to be critical for the detection of diverse cytosolic cyclic dinucleotides and DNA.¹¹ Although usually confined to the nucleus and mitochondria, in some circumstances abnormal host DNA can be found in the cytoplasm, leading to development of autoimmune features in mice and human subjects.^{12,13} For this reason, in the homeostatic context, STING-mediated signaling has to be finely regulated because chronic or constitutive activation, such as that caused by genetic mutation, might otherwise lead to autoinflammation.¹⁴ Indeed, a number of gain-of-function (GOF) mutations in *TMEM173*, which encodes STING, have been described in patients with an autoinflammatory phenotype designated STING-associated vasculopathy with onset in infancy (SAVI).^{15,16}

SAVI is considered part of a group of diseases referred to as type I interferonopathies, in which type I interferon-induced signaling is considered to play a central role in disease pathology.^{17,18} Patients with SAVI variably demonstrate systemic inflammation and inflammatory lesions of the skin and lungs. T-cell and natural killer (NK) cell lymphopenia is a consistent feature, although patients do not present with classical symptoms of immunodeficiency, such as severe susceptibility to pathogens. Autoimmunity is also very rare.^{7,15,16} Today, the exact molecular mechanisms leading to these various features remain uncertain.

Twenty-two patients from 15 families have been reported with heterozygous GOF mutations in *TMEM173* involving amino acids at positions 147, 154, 155, and 166 localized near (V147L) or within the dimerization domain (DD; N154S, V155M, and G166E) of STING protein.^{15,16,19-24} These changes have been suggested to lead to stabilization of the DD and thus constitutive activation of STING.^{15,16} Three other patients with SAVI have been described, carrying distinct mutations (namely C206Y in exon 6 and R281Q and R284G in exon 7) located in the cGAMP binding domain of STING that also lead to constitutive activation of the protein, thereby implicating a second region of STING important in type I interferon signaling.⁷

Here we generated a new knock-in mouse model with the heterozygous V154M mutation corresponding to the V155M mutation in human subjects (the most frequent mutation described thus far) to better understand the effect of this mutation on the immune system and the role of the type I interferon pathway in patients with SAVI. These mice had a severe combined immunodeficiency (SCID) phenotype, with T, B, and NK lymphopenia; strong hypogammaglobulinemia; and an expansion in the myeloid population, which was interferon independent. They also had variable lung and kidney inflammation.

METHODS

Generation of STING V154M/WT knock-in mice

The V154M mutation was introduced in the *Tmem173* locus by using a standard CRISPR-mediated genome-editing procedure (Taconic Biosciences GmbH, Cologne, Germany). In short, after hormone administration, superovulated C57BL/6NJ female mice were mated with C57BL/6NJ male mice. One-cell stage fertilized embryos were placed in a drop of M2 medium under mineral oil. A microinjection pipette with an approximate internal diameter of 0.5 μ m (at the tip) was used to inject the mixed nucleotide preparation containing the Cas9 protein and the specific gRNA (Fig 1, A) into the pronucleus of each embryo. After injection, 35 injected one-cell stage embryos were transferred to one of the oviducts of pseudopregnant NMRI females. Founder animals were identified by using PCR of the targeted locus after *NcoI* digestion. PCR samples per founder were subcloned, and multiple clones were analyzed by means of DNA sequencing to confirm the presence of the V145M mutation and exclude the presence of additional mutations near the target sequence. One founder animal was then selected for an *in vitro* fertilization procedure to generate G1 heterozygous pups. Predicted potential off-target sites were analyzed in G1 heterozygous animals by using targeted sequencing.

Mice

Mice were bred and backcrossed on a C57BL/6N background for 8 generations in specific pathogen-free conditions at the animal facility of the Molecular and Cellular Biology Institute (IBMC, Strasbourg, France). Littermate wild-type (WT) mice were always used as control animals. As indicated in the Results section, for some experiments, STING V154M/WT and WT littermate control mice were treated the whole time with antibiotic in

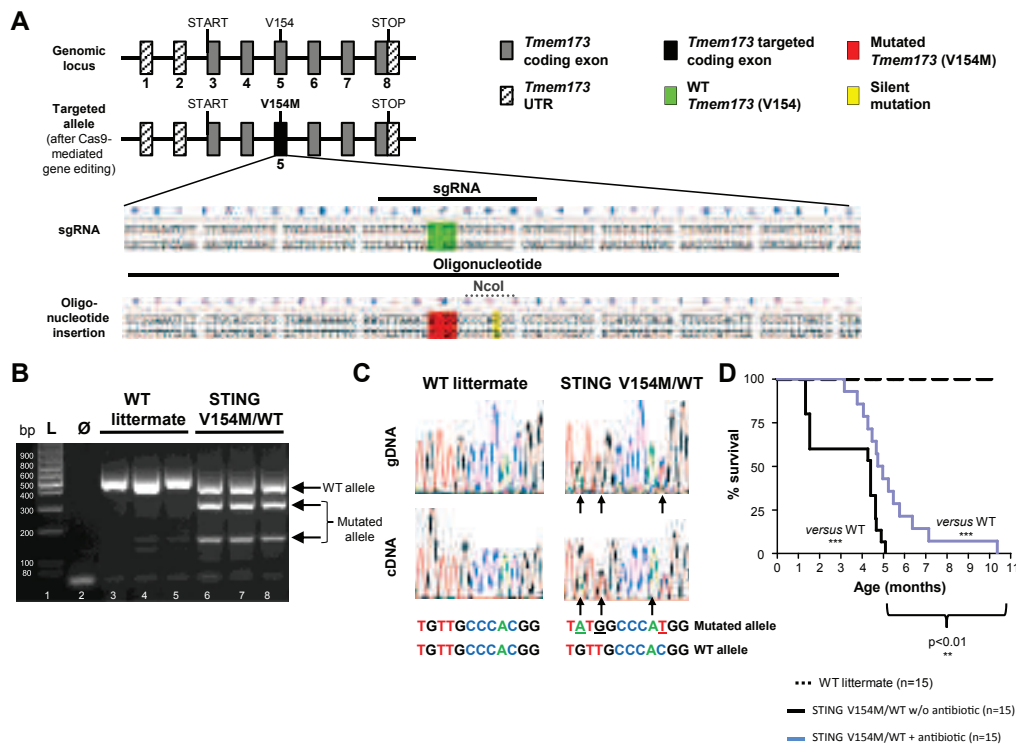


FIG 1. Murine STING V154M heterozygous mutation is associated with reduced survival. **A**, Introduction of the murine mutation (V154M) corresponding to the V155M STING GOF mutation in human subjects using CRISPR/Cas9 technology. *sgRNA*, Single guide RNA; *UTR*, untranslated region. **B**, Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified products using specific primers in exons 4 and 6 of *Tmem173*. Lane 1, DNA size marker; lane 2, negative control of the PCR reaction; lanes 3-5, WT littermate mice; lanes 6-8, STING V154M/WT mice. **C**, Visualization of the heterozygous V154M mutation by using Sanger sequencing of genomic DNA (upper panel) and cDNA (lower panel) from WT littermate (left) and transgenic (right) mice. **D**, Survival rates of STING V154M/WT mice, both untreated and treated with antibiotics (see the Methods section), as well as control WT littermate mice ($n = 15$ per group), were evaluated by using Kaplan-Meier analysis. The result of the log-rank test is indicated. *** $P < .0001$.

drinking water (Baytril 10% oral solution [enrofloxacin], 150 μ L/100 mL of filtrated and autoclaved water; drinking water was changed every week). STING V154M/WT mice were crossed with IFN- α/β receptor (IFNAR) knockout (KO) mice (provided by CDTA, CNRS, Orléans, France).²⁵

Genotyping of STING V154M/WT mice was assessed by using PCR amplification of genomic DNA extracted from tail samples with the following primers: one forward primer in exon 4 (5'- ATAGCAGTGCTGAGAGCA AGC -3') and one reverse primer in exon 6 (5'- GGGATCTAATGC TCCTCTCTGG -3'). PCR products were then treated for 1 hour at 37°C with *NcoI* restriction enzyme (New England Biolabs, Ipswich, Mass) to distinguish the WT allele (1 band) from the mutated allele (3 bands). PCR was performed with initial denaturation (at 95°C for 5 minutes), followed by 35 cycles of denaturation (at 95°C for 30 seconds), annealing (at 61.5°C for 30 seconds), and extension (at 72°C for 1 minute). Genotyping of IFNAR KO mice was assessed by means of PCR amplification with the following combination of primers: forward primer, 5'-AAGATGTGCTGTTCCCT TCCTCTGCTCTGA-3'; reverse primer, 5'-ATTATAAAAGAAAAGACG AGGGCAAGTGG-3'; and third primer, 5'-CCTGCGTGCAATCCAT CTTG-3'. PCR was performed as follows: 95°C for 3 minutes and 35 cycles at 94°C for 15 seconds, 62°C for 15 seconds, and 72°C for 30 seconds.

All animal experiments were performed with the approval of the Direction départementale des services vétérinaires (Strasbourg, France), and protocols were approved by the ethics committee (Comité d'éthique en matière d'Experimentation Animale de Strasbourg, CREMEAS) under relevant institutional authorization (Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche; authorization no. 2015072907553237 [APAFIS#2387]). All control mice used in experiments were littermate control mice.

Western blotting

Cell lysates were prepared from spleen-sorted CD43⁻ naive B cells. Proteins were size fractionated by means of 4%-20% gradient SDS-PAGE, electrotransferred to a polyvinylidene fluoride membrane for 1.5 hours at 130 V, and immunodetected with rabbit polyclonal anti-mouse STING antibody (Proteintech, Rosemont, Ill). STING protein (band of approximately 40 kDa) was detected with a secondary horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pa). Anti- β -actin antibody (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Tex) was used as a protein loading control.

Flow cytometric analysis

Analyses of cell phenotype and proliferation rates were performed on splenic, thymic, and bone marrow (BM) lymphoid populations by using a 4-color fluorescence cytometer (FACSCalibur), according to standard protocols. The following antibodies were used: fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE), peridinin-chlorophyll-protein complex, or allophycocyanin (APC) anti-mouse IgM, CD19, B220, CD3, CD4, CD8, CD21, CD23, CD44, CD62L, Mac1 (CD11b), Gr1 (Ly6C/G), CD49b, NK1.1 (CD161), CD86, CD25, CD138, and forkhead box protein 3 (all from BD Biosciences, San Jose, Calif). Propidium iodide (2.5 μ g/mL; Sigma, St Louis, MO) or Fixable Viability Dye were used for discrimination of live and dead cells. The following antibodies were used for BM and thymic progenitor analysis: peridinin-chlorophyll-protein complex-Cy5.5, APC, Alexa Fluor 488, APC-eFluor 780, BV 421, BV 605, PE, Alexa Fluor 700, PE-Cy7, FITC, Cy5, APC-Cy7, PE-CF594, PE-eFluor 610 or eFluor450 anti-mouse CD11b, CD11c, CD317, Gr1, Lineage, c-Kit, Sca1, CD48 (from eBioscience,

San Diego, Calif), Ter119, CD71, CD127, CD34, CD16/32 (from BD Biosciences), and CD150 (from BioLegend, San Diego, Calif). Lineage staining correspond to the following antibodies: anti-mouse CD3, CD4, CD8, B220, CD11b, CD11c, Gr1, CD49b, and Ter119 (Ly76). These analyses were performed with a 10-color fluorescence cytometer (FACS Fortessa), according to standard protocols. The following antibodies were used for splenic, BM, or thymic proliferation and apoptosis analysis, respectively: FITC-anti-5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) and FITC-Annexin V (from BD Biosciences). Data were analyzed with FlowJo software (TreeStar, Ashland, Ore).

BrdU incorporation

BrdU was first administered by using intraperitoneal injection of 100 μ L of BrdU (1 mg/mL; Sigma) 72 hours before analysis and also delivered to mice in their drinking water at a concentration of 0.8 mg/mL. BM and thymi were collected 72 hours after BrdU injection. Cells were fixed with Cytofix/Cytoperm buffer (BD Biosciences) and permeabilized with permeabilization buffer (BD Biosciences). DNA was then denatured with a DNase solution (100 μ g/mL; BD Biosciences) to improve the accessibility of the incorporated BrdU to the detection antibody. A FITC mouse anti-BrdU antibody was used to detect the incorporated BrdU. Cells were then analyzed by using flow cytometry.

Complete blood count

Blood (150 μ L) was collected in EDTA 2% anticoagulant solution (30 μ L/100 μ L of blood). Complete blood counts (WBC, RBC, and hemoglobin dosage) were performed in the Mouse Clinic Institute (ICS, Illkirch, France).

Antibody detection by means of ELISA

Total IgM, IgG, and IgA levels were measured in sera from 3- to 6-month-old mice or in culture supernatants after stimulation. Sera were obtained by means of blood centrifugation at 6000 rpm for 6 minutes. Levels of total immunoglobulins were measured, as previously described.²⁶ Absorbance was then read at 492 nm with the Multiskan FC photometer and analyzed with SkanIt microplate reader software (Thermo Fisher, Waltham, Mass). The concentration of total serum immunoglobulin was evaluated by means of comparison with a standard curve using purified mouse IgM, IgG, or IgA standards (Sigma, reference M-5170; Jackson ImmunoResearch, reference 015000003; BD Biosciences, reference 553476).

Cell preparation and culture

In vitro B- and T-cell stimulations were performed in complete RPMI-1640 medium containing L-glutamine (Lonza, Basel, Switzerland) supplemented with 10% FCS (Dutscher, South America), 50 mmol/L β -mercaptoethanol (Gibco, Carlsbad, Calif), 1% penicillin/streptomycin (Gibco), 10 mmol/L HEPES (Lonza), and 1 mmol/L sodium pyruvate (Lonza). Splenic naive (CD43⁻) B cells were purified by using negative magnetic selection (mouse CD43 [Ly-48] MicroBeads; MACS; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), and splenic T cells were prepared with the Dynabeads Untouched Mouse T cells kit (Invitrogen, Carlsbad, Calif), according to the supplier's protocols. B cells were stimulated with either LPS from *Salmonella typhosa* (10 μ g/mL; Sigma-Aldrich) or goat anti-IgM alone (10 μ g/mL; Jackson ImmunoResearch), a combination of anti-CD40 antibody and recombinant murine IL-4 (1 μ g/mL, 5 ng/mL; Sigma), or a combination of anti-IgM and anti-CD40 for 3 or 4 days, depending on the experiment. For T-cell stimulation, plates were coated with anti-CD3 (10 μ g/mL; BD Pharmingen) for 4 hours at 37°C or O/N at 4°C, and cells were then stimulated with anti-CD28 (10 μ g/mL; BD Pharmingen) for 3 days at 37°C. For proliferation analysis, splenocytes or sorted splenic mature B cells were pretreated with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester dye (Sigma), according to standard protocols, before being cultured for 4 days at 37°C. Plasmablast differentiation (B220^{low}CD138⁺ cells) was determined by using flow cytometry.

Quantitative real-time RT-PCR analysis

RNA was extracted with the RNeasy Kit (Qiagen, Hilden, Germany), and cDNA was obtained with the High Capacity Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, Calif) by using a T100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif). Quantitative real-time PCR was performed on 10 ng of cDNA by using TaqMan Universal Mastermix (Applied Biosystems) and Assays-on-Demand probes (Applied Biosystems) as follows: *Hprt1*, Mm01318743_m1; *Gapdh*, Mm03302249_g1; *Sting*, Mm01158117_m1; interferon-stimulated gene 15 (*Isg15*), Mm01705338_s1; interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1 (*Ifit1*), Mm00515153_m1; *Cxcl10*, Mm00445235_m1; *Ifna4*, Mm00833969_s1; and *Ifnb1*, Mm00439552_s1. Each sample was amplified in triplicate in a StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystems). mRNA levels were calculated with StepOne v2.1 software (Applied Biosystems) by using the comparative cycle threshold method and normalized to mean expression of the *Hprt1* and *Gapdh* housekeeping genes.

Histologic analysis

Histologic processing and evaluation were performed in the Mouse Clinic Institute on 5- μ m-thick sections obtained from formalin-fixed paraffin-embedded tissues. Bones were decalcified in rapid decalcifier for 2 hours (DC3; VWR Chemicals, Radnor, Pa). All tissues were stained with hematoxylin and eosin. Lungs and kidneys were also stained with the Masson trichrome method to demonstrate possible fibrosis.

Lymph node mapping

Mice were anesthetized with 2.5% isoflurane and injected subcutaneously with 5% Evans blue dye (Sigma) into the front legs, hindfoot, and ears. After 30 minutes of continuous anesthesia, mice were killed and dissected to locate the lymph nodes (LNs).²⁷

Statistical analysis

Statistical significance was calculated with a 2-tailed Mann-Whitney test with Prism software (GraphPad Software, La Jolla, Calif), except for survival curves, which were evaluated by using Kaplan-Meier analysis (log-rank test). All data were presented as means \pm SEMs.

RESULTS

Heterozygous STING V154M mice demonstrate marked weight loss and reduced survival

Heterozygous mutations in STING, including V155M mutation (V154M in mice), are responsible for the development of SAVI.^{15,16} We generated heterozygous V154M mice with CRISPR/Cas9 technology by inserting an oligonucleotide containing 2 mutations (GTT into ATG, resulting in replacement of a valine 154 with a methionine) into exon 5 of *Tmem173* (Fig 1, A, green and red). The oligonucleotide also contained a silent mutation encoding for an *NcoI* restriction site to facilitate genotyping (Fig 1, A, yellow). In this way STING V154M/WT mice could be distinguished from WT animals by using PCR (Fig 1, B). We confirmed the presence of the mutation by using Sanger sequencing of genomic DNA and cDNA (Fig 1, C).

We also analyzed STING expression in this model. It has been shown that STING expression is decreased in HEK293FT cells transfected with the V155M STING mutation in comparison with cells expressing WT STING.^{7,16} In agreement with this, we noticed a reduction of nearly 50% of *Sting* mRNA and STING protein in STING V154M/WT mice (see Fig E1, A and B, in this article's Online Repository at www.jacionline.org).

Interestingly, V154M/WT mice showed a marked reduction in survival compared with WT littermates, with none surviving beyond 150 days (Fig 1, D). Such a high mortality rate precluded analysis in our animal facility conditions. Therefore, because the mice were not raised in a germ-free environment, we treated them with enrofloxacin, a broad-spectrum antibiotic. Survival was then significantly improved (Fig 1, D), but STING V154M/WT mice still exhibited weight loss compared with WT littermates (see Fig E1, C). STING V154M/WT females were sterile, and therefore we were unable to breed mice homozygous for the STING V154M allele.

Lung and renal inflammation occur variably in STING V154M/WT mice

SAVI is characterized by an inflammatory state.^{15,16} In particular, lung interstitial disease has been observed in the majority of patients, as have skin lesions and systemic inflammation. These features are not present in all patients, with rare familial cases of the disease confirming sometimes marked variability in disease expression.¹⁶ We noticed that 45% of STING V154M/WT mice had slight (++) to severe (+++++) alveolar or perivascular inflammation, whereas none of the WT littermate group developed these features (see Fig E2 in this article's Online Repository at www.jacionline.org). Of note, we did not detect any lung fibrosis (see Fig E2), nor did our mice demonstrate skin lesions, arthritis, or inflammation in the distal limbs (see Fig E2). Almost 30% of the mice had minimal renal inflammation (interstitial hypercellularity in the medulla) with some patches of interstitial fibrosis, whereas WT littermate mice did not have any. However, similar lesions have not been reported in human patients with SAVI. Proteinuria was not recorded in the STING V154M/WT mice. We did not observe any correlation between organ inflammation in STING V154M/WT mice according to whether they were treated with antibiotics (see Fig E2). In addition, there was a significant increase in serum IL-6 and TNF- α levels in mutant animals compared with WT littermates (1.2 ± 0.003 pg/mL vs 20.8 ± 8.1 pg/mL for IL-6 and 3.8 ± 0.003 pg/mL vs 5.7 ± 1.2 pg/mL for TNF- α in WT and Sting V154M/WT mice, respectively [mean \pm SEM]; $P < .05$, Mann-Whitney test). Thus we conclude that STING V154M/WT mice had inflammatory manifestations with variable expression.

STING V154M/WT mice develop a SCID

Considering the T-cell lymphopenia observed in patients with SAVI,^{15,16} we analyzed the proportion of immune cell subsets in peripheral lymphoid compartments. Because survival was improved after treatment with enrofloxacin, all of the animals included in this analysis received the antibiotic.

First, we noticed a complete absence of LNs in STING V154M/WT mice, even after coloration with Evans blue (see Fig E3 in this article's Online Repository at www.jacionline.org). In addition, we saw a significant decrease in white blood cell counts in STING V154M/WT mice compared with WT littermates (Fig 2, A). Flow cytometric analysis showed that the distribution of blood leukocyte subpopulations was different in STING V154M/WT compared with WT animals, with a decrease in numbers of B cells, CD4⁺ and CD8⁺ T cells, and NK cells associated with an increase in numbers of granulocytes and monocytes (Fig 2, A). Furthermore, STING V154M/WT mice had anemia (Fig 2, B), which is consistent with the description in patients with SAVI,^{15,16} possibly reflecting systemic inflammation.

In accordance with the blood analysis, the spleens of STING V154M/WT mice demonstrated a severe reduction in numbers of B cells, CD4⁺ and CD8⁺ T cells, and NK cells, both in terms of percentage and absolute numbers, particularly affecting T and NK cells. All B-cell subsets (follicular, transitional T1 and T2, and marginal zone B cells) were also affected (Fig 2, C). The same observation was made for T-cell subsets, where we recorded a decrease in effector memory, central (markedly in CD8⁺ T cells), and naive T cells, with the latter being the most affected T-cell subpopulation (Fig 2, C). The regulatory T (Treg) cell compartment was also affected (see Fig E4 in this article's Online Repository at www.jacionline.org). However, even if the percentages and absolute numbers of Treg cells were strongly diminished (see Fig E4, A), the ratio of Treg cells to total CD4⁺ T cells remained unchanged between STING V154M/WT and WT littermate mice. Furthermore, the expression of the functional marker CD25 on Treg cells was comparable between WT and STING V154M/WT mice (see Fig E4, B).

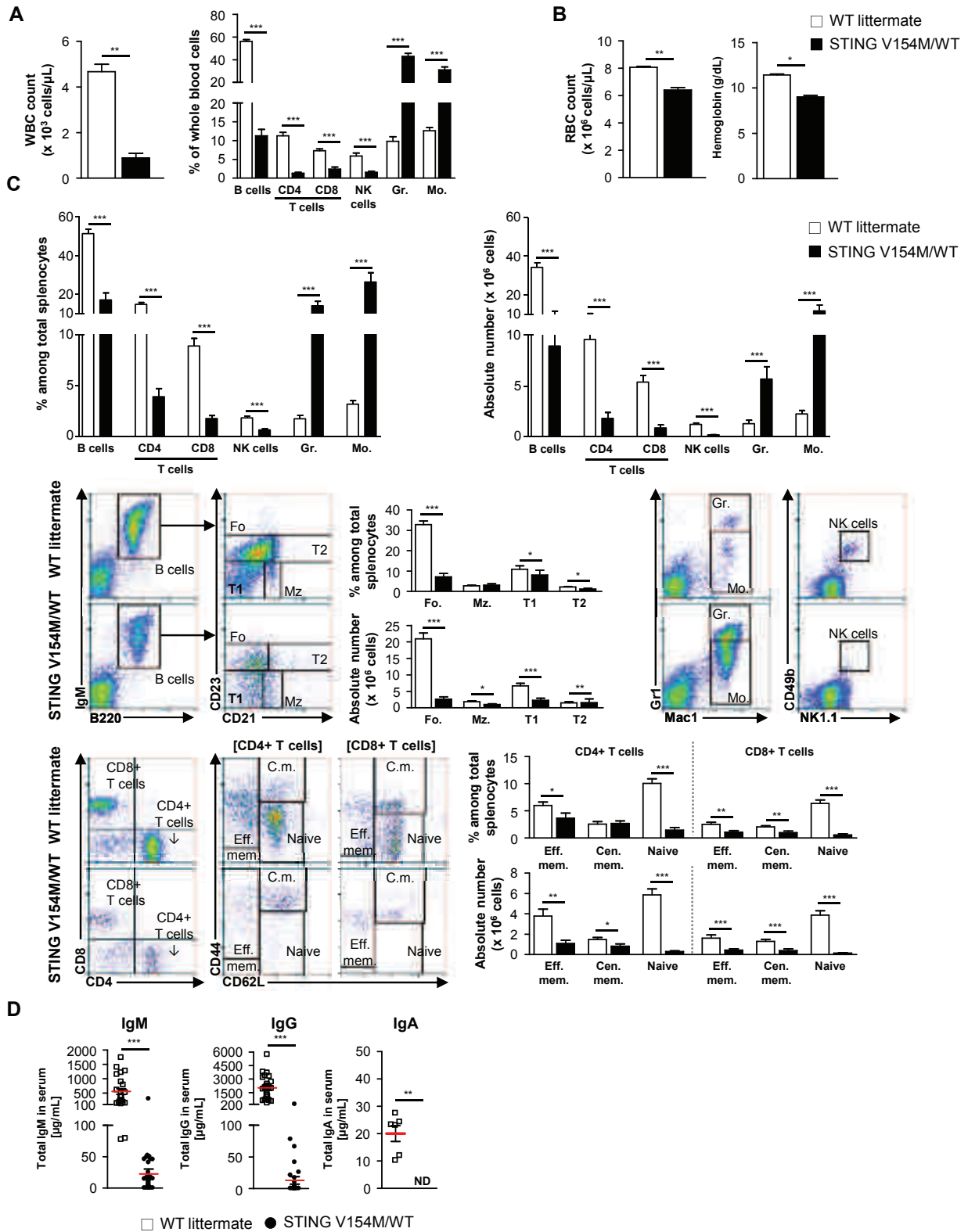
In addition to the dramatic decrease in all lymphoid populations, we noticed a significant increase of granulocyte and monocyte populations in the STING V154M/WT mice (percentages and absolute numbers; Fig 2, C). In agreement with these latter results, we detected an excess of serum monocyte chemoattractant protein 1 (or CCL2) production in the sera of STING V154M/WT mice (3.9 ± 0.7 pg/mL vs 47.6 ± 13.2 pg/mL in WT and STING V154M/WT mice, respectively [mean \pm SEM]; $P < .05$, Mann-Whitney test).

Finally, consistent with the reduction in numbers of B cells, total IgM and IgG levels were profoundly decreased in serum STING V154M/WT mice in comparison with WT littermates, and IgA was undetectable (Fig 2, D). Thus the introduction of the V154M heterozygous mutation in mice was responsible for development of a SCID phenotype, affecting all lymphocyte populations and associated with a severe hypogammaglobulinemia, and a developmental defect in LNs.

B- and T-cell developmental blockade in STING V154M/WT mice originates at the early immature stages in BM and thymus

To understand the mechanisms of lymphocyte deficiency in the periphery, we analyzed early developmental stages in the BM and thymus. The hematopoietic stem cell (HSC) compartment in the BM, containing long-term HSCs, short-term HSCs, and multipotent progenitors, was not affected by the STING V154M mutation (see Fig E5, A, in this article's Online Repository at www.jacionline.org). Similarly, the percentages and absolute numbers of common lymphoid progenitors (CLPs) were comparable in the 2 groups of mice (see Fig E5, B). However, T- and B-cell lineages were markedly affected after the CLP stage. Indeed, STING V154M/WT mice displayed a strong reduction in pro-B and pre-B subsets, and an even more profound decrease in immature and mature stages (Fig 3, A). These results indicated that a developmental arrest between CLPs and further stages of B-cell subsets is responsible for the peripheral B-cell lymphopenia.

In addition, thymic T-cell development seemed to be very affected because STING V154M/WT mice presented a residual thymus consistent with markedly reduced cellularity (Fig 3, B). Percentages and absolute numbers of early thymic progenitors were comparable between STING V154M/WT and control



animals (Fig 3, C). However, thymocyte development was profoundly impaired at the double-negative (DN) 1 and DN2 stages and, to a lesser extent, at subsequent stages (Fig 3, C).

Finally, the absolute numbers of double-positive and CD4 and CD8 single-positive thymocytes were decreased in STING V154M/WT mice (Fig 3, D), thus explaining the peripheral T-cell lymphopenia. To analyze in more detail the mechanisms of this lymphopenia, we also assessed the proliferation and death status in progenitors both from BM and thymus using Annexin V and BrdU staining (Fig 3, E and F). We observed that progenitors from B- and T-cell lineages are more prone to die by apoptosis (Fig 3, E). We also observed an increased incorporation of BrdU, indicating increased proliferation (Fig 3, F). Thus we think that the increased apoptosis of lymphoid progenitors possibly accounts for the observed peripheral lymphopenia in STING V154M/WT mice.

Considering the myeloid population and consistent with their expansion in periphery, we also observed an increased percentage of monocytes in the BM (see Fig E5, C). However, we did not detect any increase in common myeloid progenitors and granulocyte-monocyte progenitors (see Fig E5, B), suggesting a homeostatic peripheral expansion of the myeloid compartment as a consequence of impaired lymphocyte development.

Finally, a slight reduction of erythrocytes was noticed in the BM of mutant mice (see Fig E5, D). Percentages and absolute numbers of megakaryocyte and erythroid progenitors and proerythroblasts were not statistically different between the 2 groups of mice (see Fig E5, B and D). Therefore this anemia could be a consequence of inflammation or of a slight blockade in erythrocyte development between the proerythroblast and erythrocyte stages or both.

In conclusion, the profound T- and B-cell lymphopenia observed in STING V154M/WT mice is at least partly a consequence of an early developmental defect characterized by an increased apoptosis of progenitors.

STING V154M mutation results in intrinsic defects in mature T and B cells

Because of the T- and B-cell lymphopenia and reduced antibody levels in STING V154M/WT mice (Fig 2), we further investigated the expression of activation markers and the proliferative response of these cells after *in vitro* stimulation. We detected a 6-fold increase of the CD86 activation marker on unstimulated STING V154M/WT B cells compared with that

on their WT counterparts. Overexpression of the CD86 marker was also observed after stimulation with anti-CD40 and IL-4 or with anti-IgM and anti-CD40 (Fig 4, A). Considering the profound hypogammaglobulinemia in STING V154M/WT mice (Fig 2, D), we quantified the secreted immunoglobulin in supernatants after stimulation of total splenocytes *in vitro*. Immunoglobulins secretion was strongly decreased in supernatants from STING V154M/WT splenocytes after stimulation with LPS, LPS and IL-4, or anti-CD40 and IL-4 (Fig 4, B). This was not the consequence of an intrinsic defect of proliferation or plasma cell differentiation (Fig 4, C and D). However, STING V154M/WT B cells were significantly more sensitive to apoptosis than WT B cells, as shown by Annexin V staining after 2 days of stimulation with several protocols of stimulation, including those mimicking T-cell help (Fig 4, E).

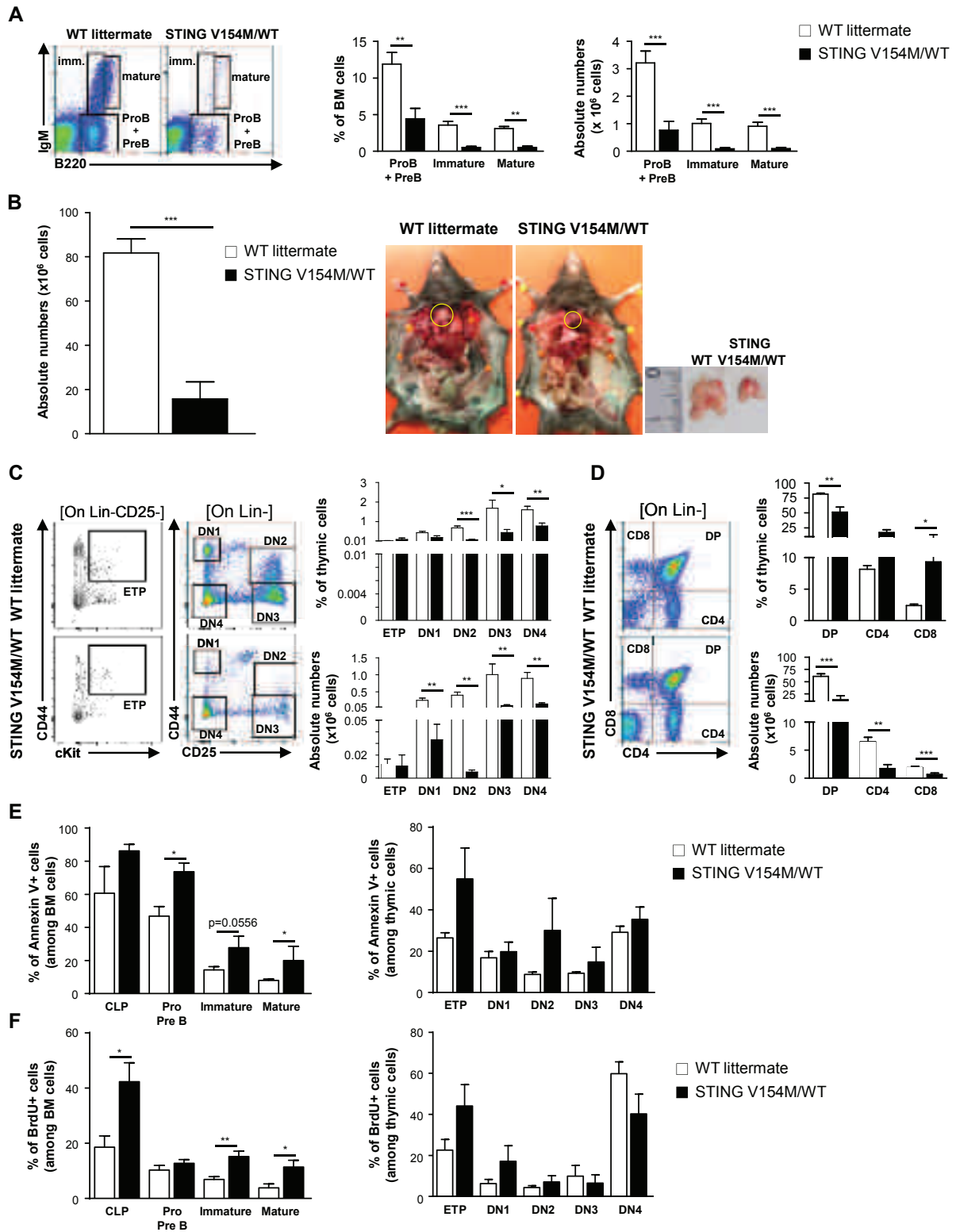
Similar to B cells, splenic CD4⁺ and CD8⁺ T cells displayed a hyperactivated profile at steady state, as shown by an overexpression of the CD25 activation marker (Fig 5, A). STING V154M/WT T cells also displayed a profound activation defect after stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 (Fig 5, A) along with decreased proliferation and increased cell necrosis and apoptosis (Fig 5, B and C). These results showed that mature T cells from STING V154M/WT mice have an intrinsic proliferative defect that cannot compensate the increased mortality. Thus the very low production of immunoglobulins *in vivo* could be the combined consequence of increased B- and T-cell apoptosis, leading to a low number of B and T cells, and a lack of T-cell help required for B-cell activation and differentiation into plasma cells.

The SCID observed in STING V154M/WT mice is type I interferon independent

Given that aspects of the SAVI phenotype have been proposed to reflect enhanced type I interferon signaling, we analyzed the expression of ISGs in STING V154M/WT mice. Expression of *Isg15*, *Ift1*, and *Cxcl10*/IFN- γ -inducible protein 10 was significantly increased in total splenocytes (Fig 6, A) and confirmed in splenic sorted B cells from STING mutant mice (Fig 6, B). Expression of IFN- α and IFN- β was also greater in these cells (Fig 6, B), as expected with a STING GOF mutation.

To evaluate the effect of excessive type I interferon production on the phenotype of STING V154M/WT mice, we bred them with IFNAR KO animals. As expected, ISG expression returned to basal levels in STING V154M/WT IFNAR KO animals (Fig 6, A).

FIG 2. Murine STING V154M heterozygous mutation is associated with a profound combined immunodeficiency phenotype. **A, Left**, Total WBC count ($\times 10^3$ cells/ μ L; $n = 5$ in each group). **Right**, Percentages of immune cell subpopulations in whole blood cells assessed by using flow cytometry ($n \geq 9$ in each group). **B, Left**, RBC count ($\times 10^6$ cells/ μ L). **Right**, Hemoglobin levels (in grams per deciliter; $n = 5$ in each group). **C**, Flow cytometry phenotypic characterization of splenic cells (indicated both as percentages and absolute numbers; $n \geq 13$ in each group). **Upper panel**, Main splenic populations in the spleens of WT littermate mice (*open bars*) and STING V154M/WT mice (*black bars*). **Middle panel, left**, B-cell subpopulations gated on B220⁺IgM⁺ cells, with representative dot plots from WT littermate and STING V154M/WT mice. Gates show transitional 1 (T1; CD21/CD35^{low}CD23^{low}), transitional 2 (T2; CD21/CD35^{high}CD23^{high}), follicular (Fo; CD21/CD35^{int}CD23^{high}), and marginal zone (Mz; CD21/CD35^{high}CD23^{low}) populations. **Middle panel, right**, Representative dot plots of granulocytes (Gr1^{high}Mac1⁺), monocytes (Gr1^{int}Mac1⁺), and NK cells (CD49b⁺NK1.1⁺). **Lower panel**, T-cell subpopulations gated on CD4⁺ and CD8⁺ T cells, respectively, with representative dot plots from WT littermate and STING V154M/WT mice. Gates show effector memory (*Eff. mem.*; CD44⁺CD62L⁻), central memory (*Cen. mem.*; CD44^{high}CD62L⁺), and naive (CD44^{low}CD62L⁺) T-cell populations. **D**, Levels of total IgM, IgG, and IgA (in micrograms per milliliter) were measured in sera of WT littermate (*open squares*) and STING V154M/WT (*solid circles*) mice. Each *dot* represents the result for 1 animal. *ND*, Nondetectable. Mice were 2 to 5 months old. *Bars* represent means \pm SEMs. * $P < .05$, ** $P < .01$, and *** $P < .001$, Mann-Whitney test.



However, weight loss (Fig 6, C), hypogammaglobulinemia (Fig 6, D), SCID phenotype (decrease of B, T, and NK cells), and expansion of monocytes and granulocytes were not reversed (Fig 6, E). This indicated that the blockade in T-cell, B-cell, and NK cell development observed in STING V154M/WT mice is not type I interferon dependent. However, the antiproliferative and prodeath effect of the STING V154M mutation in T cells was reversed partially in double-mutant animals (Fig 6, F and G), thus indicating both interferon-dependent and independent effects of STING GOF.

DISCUSSION

Development of lymphopenia affecting T and NK cells is a common feature of patients carrying a STING V155M mutation and other mutations, such as N154S or V147L.^{15,16} Total B-cell counts in these patients are in the normal range, although memory and switched memory B-cell counts are decreased.^{15,16} IgG and IgA hypergammaglobulinemia is seen in several patients with SAVI. Our data demonstrate that introduction of a STING V154M mutation in mice (corresponding to the V155M mutation in human subjects) leads to development of a SCID phenotype (T, B, and NK lymphopenia) that is more profound than any thus far described in a patient with SAVI, as well as an important growth delay and a dramatic reduction in survival. These mice also demonstrated marked IgM, IgG, and IgA hypogammaglobulinemia. We conclude that both the T- and B-cell lymphopenia are at least partly the consequence of a blockade in early T- and B-cell progenitor development, therefore highlighting an unforeseen role of STING in lymphoid development.

Proliferation and apoptosis analyses performed on V154M/WT lymphocyte progenitors showed both proliferative expansion and increased apoptosis. Therefore the increased apoptosis of lymphoid progenitors possibly accounts for the observed peripheral lymphopenia in STING V154M/WT mice. Similar observations have been made previously in different systems, such as *Drosophila* or mouse embryonic fibroblasts,²⁸⁻³⁰ where

the authors concluded on a causal link between apoptosis and proliferation. Indeed, a compensatory proliferation after cell death can be triggered by caspases and be responsible for the induction of adjacent surviving cells proliferation to replace dying cells.^{28,29,31} Moreover, Cabatingan et al³² have proposed a mechanism in which homeostatic B-cell proliferation is a regulatory process related to the intrinsic B-cell defect. Further experiments, such as transcriptome analysis in successive stages of B- and T-cell development, are needed to better understand the developmental arrest of lymphoid progenitors in STING V154M/WT mice.

Several hypotheses can be proposed to explain the lymphocyte development blockade observed in STING V154M/WT mice but not in patients with SAVI. First, the level of STING expression could be different in early T- and B-cell progenitors between human subjects and mice.

Second, one can speculate that partners of STING and/or target genes implicated in lymphocyte development are distinct between species. These potential differences can lead to a toxic effect on lymphoid progenitors that is more pronounced in mice or not reversed by compensatory mechanisms existing in human subjects.

In addition, we observed an absence of LNs in STING V154M/WT mice. This could be, at least in part, the consequence of an absence of lymphoid tissue-inducing cells, members of an emerging family of innate lymphoid cells (ILCs) that play a key role in the development of LNs and Peyer patches. ILCs develop from the common innate lymphoid progenitor stage coming from CLP progenitors in BM.³³ Therefore, considering the blockade of lymphoid cell development in STING V154M/WT mice after the CLP stage, one could speculate that the ontogeny of ILCs is also affected.

In addition, lymphotoxin (LT) α -deficient mice are also lacking LNs, demonstrating an important role for lymphoid tissue-inducing cell-derived LT α in secondary lymphoid organ development during embryogenesis.³⁴⁻³⁶ Preliminary results confirmed that LT α expression is decreased in T cells from STING V154M/WT mice.

FIG 3. The defect observed in B- and T-cell populations occurs early in their development in the BM and thymus. **A,** Immunophenotyping of B cells in the BM. *Left,* Representative dot plots from WT littermate and STING V154M/WT mice. Gates show pro-B and pre-B cells (IgM⁻B220^{low}) and immature (*imm*; IgM⁺B220^{low}) and mature (IgM⁺B220^{high}) B cells. *Right,* Mean \pm SEM of percentages and absolute numbers in WT (*open bars*) and STING V154M/WT (*black bars*) mice ($n \geq 6$ in each group). **B,** *Left,* Total number of thymocytes in WT littermate (*open bars*) and STING V154M/WT (*black bars*) mice ($n = 17$ in each group). *Right,* Pictures illustrating the abnormal thymus observed in STING V154M/WT mice compared with WT littermate mice (7-week-old mice). **C,** Immunophenotyping of early T-cell progenitors (ETP) and double-negative (DN) cells in the thymus. *Left,* Representative dot plots from WT and STING V154M/WT mice. Gates show early T-cell progenitors (Lin⁻CD44⁺CD25⁻c-Kit⁺) and the double-negative (DN) fractions DN1 (Lin⁻CD44⁺CD25⁻), DN2 (Lin⁻CD44⁺CD25⁺), DN3 (Lin⁻CD44⁻CD25⁺), and DN4 (Lin⁻CD44⁻CD25⁻). *Right,* Mean \pm SEM of percentages and absolute numbers in WT littermate (*open bars*) and STING V154M/WT (*black bars*) mice ($n \geq 6$ in each group). **D,** Immunophenotyping of double-positive (DP) and single-positive cells in the thymus. *Left,* Representative dot plots from WT littermate and STING V154M/WT mice. Gates show the double-positive (Lin⁻CD8⁺CD4⁺) and single-positive fractions (CD4: Lin⁻CD4⁺CD8⁻/CD8: Lin⁻CD4⁻CD8⁺). Percentages and absolute numbers in WT littermate (*open bars*) and STING V154M/WT (*black bars*) mice ($n \geq 6$ in each group). **E,** Cell death analysis by means of flow cytometry with Annexin V staining. The first graph represents percentages of Annexin V⁺ cells in CLP, pro-B and pre-B, immature, and mature stages in BM. The second graph represents each stage of T-cell lineage in thymus. *Open bars,* WT littermate mice; *black bars,* STING V154M/WT mice ($n = 5$ in each group). **F,** Proliferation analysis in progenitors using flow cytometry with BrdU staining. The first graph represents percentages of BrdU⁺ cells in BM progenitors, and the second graph represents thymic progenitors. *Open bars,* WT littermate mice; *black bars,* STING V154M/WT mice ($n = 5$ in each group). Mice were 2 to 5 months old. *Bars* represent means \pm SEMs. * $P < .05$, ** $P < .01$, and *** $P < .001$, Mann-Whitney test.

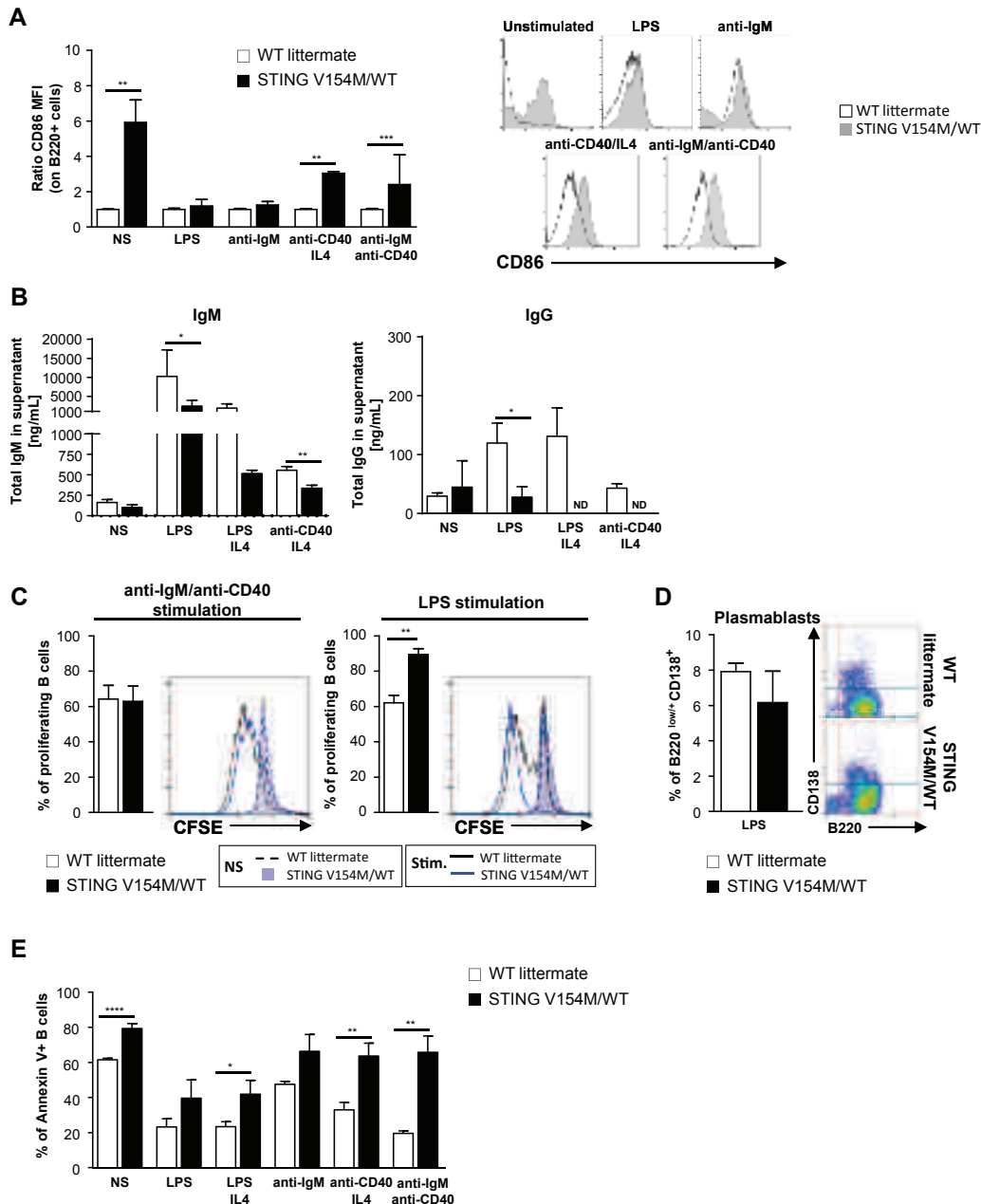


FIG 4. STING V154M/WT B cells display intrinsic functional defects. **A, Left,** Ratio of CD86 mean fluorescence intensity (MFI) gated on B220⁺ cells after 3 days of culture of sorted splenic B cells, in unstimulated cells (NS), or after stimulation with LPS (10 μ g/mL), anti-IgM (10 μ g/mL), anti-CD40/IL-4 (1 μ g/mL to 5 ng/mL), and anti-IgM/anti-CD40 (10 μ g/mL to 1 μ g/mL; $n \geq 5$ in each group). **Right,** Histograms show representative overlays for WT littermate (white) and STING V154M/WT (gray) mice. **B,** Total IgM and IgG levels (in nanograms per milliliter) were measured in supernatants after 3 days of culture of total splenocytes from STING V154M/WT (black bars) or WT littermate (open bars) mice ($n > 5$ in each group) with LPS (10 μ g/mL), LPS/IL-4 (10 μ g/mL to 5 ng/mL), or anti-CD40/IL-4 (1 μ g/mL to 5 ng/mL). ND, Nondetectable. **C,** Percentage of proliferating B cells after 4 days of stimulation with a combination of anti-IgM (10 μ g/mL) and anti-CD40 (1 μ g/mL) or with LPS (10 μ g/mL). Histograms show representative overlays ($n = 5$ in each group). CFSE, Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. **D, Left,** Percentage of plasmablasts (B220^{low/+} CD138⁺) after 3 days of stimulation of B cells with LPS (10 μ g/mL). Open bars, WT littermate mice; black bars, STING V154M/WT mice ($n = 6$ in each group). **Right,** Representative dot plots. **E,** Percentage of B-cell apoptosis (Annexin V⁺ cells) after 2 days of stimulation of splenocytes with LPS (10 μ g/mL), LPS/IL-4 (10 μ g/mL to 5 ng/mL), anti-IgM (10 μ g/mL), anti-CD40/IL-4 (1 μ g/mL to 5 ng/mL), and anti-IgM/anti-CD40 (10 μ g/mL to 1 μ g/mL; $n > 10$ in each group). Mice were 2 to 5 months old. Bars represent means \pm SEMs. * $P < .05$, ** $P < .01$, *** $P < .001$, and **** $P < .0001$, Mann-Whitney test.

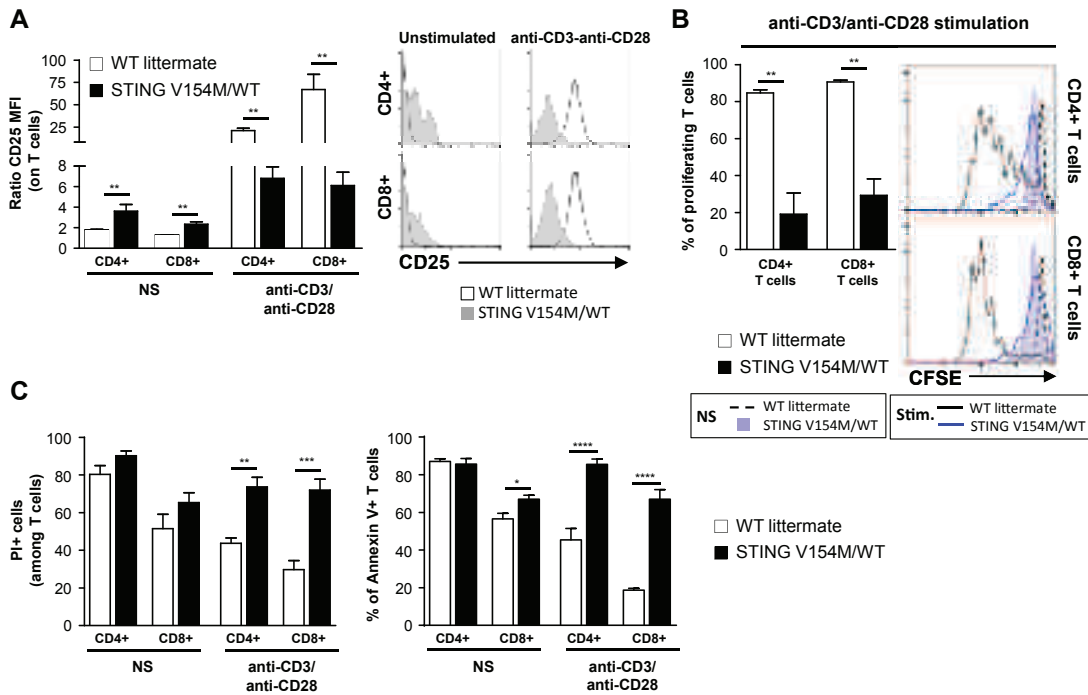


FIG 5. STING V154M/WT T cells display intrinsic functional defects. **A, Left,** Ratio of CD25 mean fluorescence intensity (*MFI*) gated on CD4⁺ or CD8⁺ cells after 3 days of splenocyte culture, in unstimulated cells (*NS*), or after stimulation with anti-CD3/anti-CD28 (10 μ g/mL each) for WT littermate (*white*) and STING V154M/WT (*gray*) mice ($n = 6$ in each group). **B, Left,** Percentage of proliferating T cells after 4 days of stimulation of splenocytes from WT littermate (*white*) and STING V154M/WT (*black*) mice with anti-CD3/anti-CD28 (10 μ g/mL each; $n \geq 6$ in each group). **Right,** Histograms show representative overlays. **C, Left,** Percentage of T cell death (propidium iodide [*PI*]⁺ cells) at steady state and after stimulation of splenocytes with anti-CD3/anti-CD28 (10 μ g/mL each) for 3 days ($n \geq 6$ in each group). **Right,** Percentage of T-cell death (Annexin V⁺ cells) at steady state and after stimulation of splenocytes with anti-CD3/anti-CD28 (10 μ g/mL each) for 2 days ($n > 10$ in each group). Mice were 2 to 5 months old. *Bars* represent means \pm SEMs. ** $P < .01$, *** $P < .001$, and **** $P < .0001$, Mann-Whitney test.

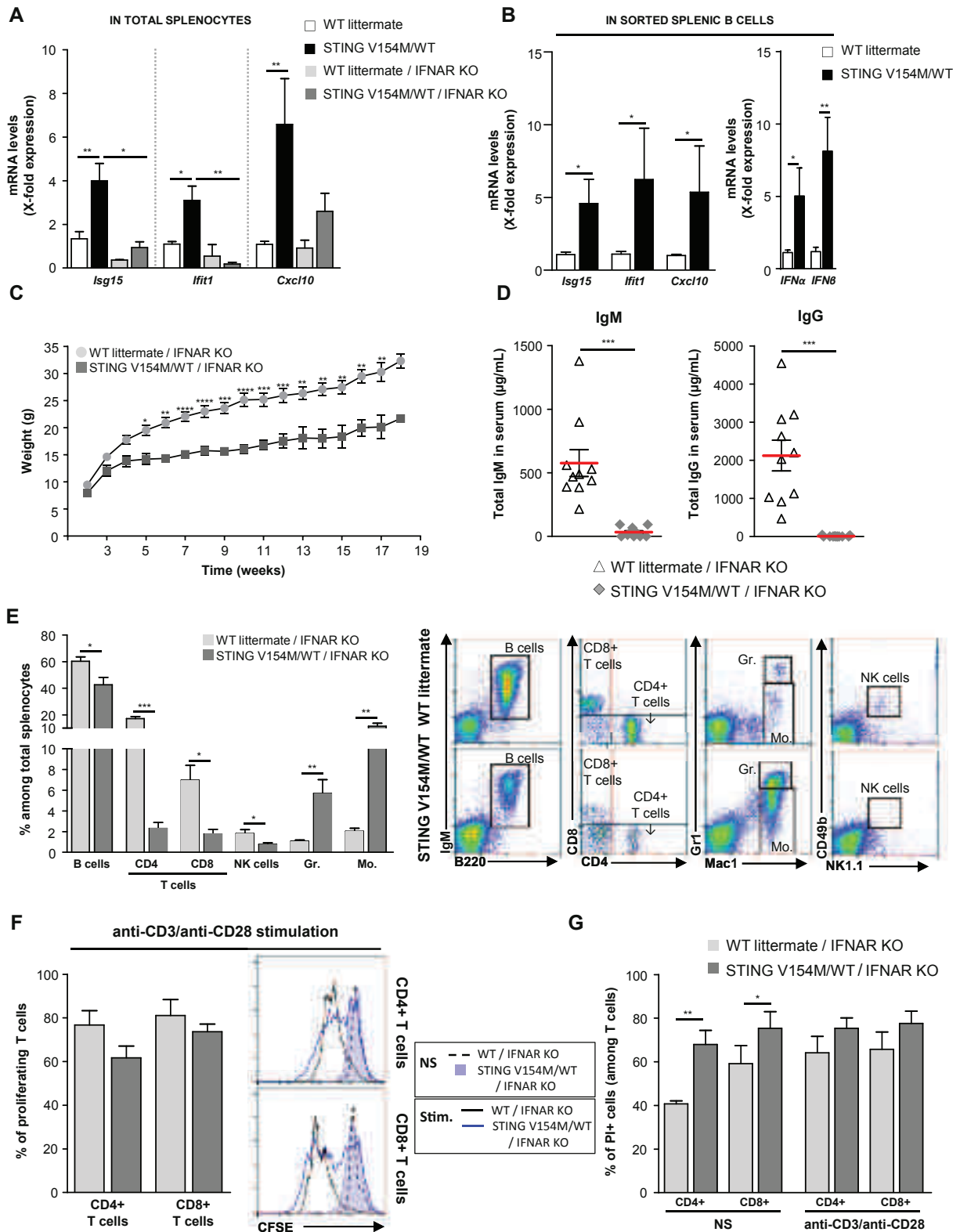
Finally, mature B and T cells displayed intrinsic defects characterized by a hyperactivation status at steady state and by a defect of activation and proliferation in mature T cells. We showed that the hypogammaglobulinemia was not the consequence of a B cell–intrinsic proliferation or differentiation defect. However, we detected an increase of apoptosis in B and T cells. Therefore it is plausible that the low immunoglobulin titers accompanying B-cell lymphopenia relate to a lack of T-cell help.

Another common molecular feature of the SAVI phenotype for all the mutations described thus far is an increased expression of ISGs. In STING V154M/WT mice we detected a significant interferon signature in splenocytes and sorted B cells. The magnitude of the interferon signature in our mice (almost 5-fold) is close to that described in murine models of the type I interferonopathy Aicardi-Goutières syndrome carrying the homozygous RNaseH2 G37S point mutation^{37,38} and animals deficient for *Samhd1*.³⁹ To our surprise KO of IFNAR in STING V154M/WT mice rescued neither the defect in B-cell, T-cell, and NK cell development nor the profound hypogammaglobulinemia and did not reverse the expansion of myeloid cells, suggesting that type I interferon does not play a causal role in the SCID phenotype of STING V154M/WT mice. However, the *in vitro* proliferative defect and the prodeath phenotype of mature T cells were partially reversed by IFNAR deficiency.

These data suggest potential multiple effects of STING GOF, comprising a type I interferon–independent blockade of

lymphocyte development at early stages on the one hand and an anti-proliferative effect in T cells, which is partially type I interferon dependent on the other hand. A defect of T-cell proliferation in patients with SAVI has been described recently but was not reversed by type I interferon or TNF neutralization *in vitro*.⁴⁰ One difference between the 2 experimental models is the fact that T cells in our mutant mice developed in an *in vivo* IFNAR KO environment, as opposed to an *ex vivo/in vitro* setting. In addition, one cannot exclude the existence of species-specific mechanisms in the control of T-cell proliferation through the STING/type I interferon pathway. Finally, our data showed that the partial rescue of the antiproliferative effect of STING in IFNAR KO T cells could not reverse the low immunoglobulin production recorded in STING V154M/WT mice.

We observed some inflammatory manifestations in STING V154M/WT mice, although with variable expression. These included signs of pulmonary and renal inflammation in 45% and 27% of the animals, respectively, which was associated with an increased production of inflammatory cytokines. We did not record any lung fibrosis or skin lesions, which is distinct from the overall clinical picture of SAVI. The variable penetrance of pulmonary and renal inflammation is in accordance with the human disease state, which is also characterized by variable expression, spanning early-onset systemic inflammation with mutilating skin lesions and lethal pulmonary inflammation^{15,16} through “idiopathic” lung fibrosis^{21,23} and isolated chilblain



lupus inherited stably across several generations.²⁴ In addition, an intrafamilial disease expression variability is also observed in human subjects.¹⁶ The inconstant expression of organ inflammation in the STING V154M/WT model suggests that environmental factors (animal facility environment and potential interaction with microbiota) are needed. Moreover, these results confirmed that renal damages observed are not a consequence of the long-term antibiotic treatment because only some mutant mice (27%), but none of the treated control mice, presented with kidney inflammation.

Warner et al⁴¹ recently described another model of STING GOF, the N153S model, corresponding to the N154S mutation in patients with SAVI. These mice had an inflammatory disease with pulmonary inflammation in the absence of fibrosis and skin inflammation associated with an immune deficiency, including T-cell lymphopenia. They concluded that some features of N153S mice were different from those seen in STING N154S SAVI patients with SAVI. Altogether, the data obtained from STING GOF mutations in mice (N153S and V154M) are in support of partial differential effects of STING pathway in human subjects and mice. The 2 animal models have common characteristics, such as T-cell and NK cell lymphopenia and the existence of inflammatory features. The antiproliferative effect of STING N153S GOF was not assessed by Warner et al, but an *in vitro* proliferative defect is seen both in the STING V155M and in STING N154S human lymphocytes (F. Rieux-Laucat, unpublished results).¹⁶

However, some differences between the STING N153S and V154M models are also observed. Indeed, the STING V154M mice described here are characterized by B-cell lymphopenia and a marked hypogammaglobulinemia, whereas STING N153S mice demonstrated normal B-cell counts and hyper-IgM. This hyperproduction, in the context of a T-cell lymphopenia in STING N153S mice, is not explained for the moment, but it might relate to a defective T-B cooperation in germinal centers. The lack of hyper-IgM in the V154M model suggests that B-cell precursors are more affected than those of the N153S model. Whether this relates to differential expression levels of the mutants or to different effects on STING partners remains to be established.

Finally, expression of organic lesions was also different between the 2 models. It has been shown that human N154S and V155M mutations result in constitutive ER STING exit and thus activate

STING independently of cGAMP binding.¹⁴ Moreover, both mutations are localized in the DD domain of STING and form constitutive and stable dimers.^{15,16} However, some mutation-dependent effects might be envisaged to explain the phenotypic differences between these 2 models. Further experiments (eg, genome-wide transcriptome profiling) comparing N153S and V154M murine cells will be necessary to elucidate such differences. One might also question a possible difference in the stability of the 2 mutant proteins.

In addition, considering the important role of STING in viral and bacterial sensing, we cannot exclude differences in environmental factors (animal facility environment and health status) between the 2 models. The survival of the V154M/WT mice was statistically increased after treatment with enrofloxacin, a broad-spectrum antibiotic, perhaps arguing in favor of a microbially dependent effect. However, an extensive bacteriologic analysis did not detect any infection related to pathogens targeted by this antibiotic in our mice. An alternative possibility is that enrofloxacin treatment had an effect on the intestinal microbiota composition and that STING interaction with the microbiota can affect the mice phenotype, notably because STING is activated by cyclic dinucleotides and that such CDNs can be produced by gut microbiota.^{42,43} Indeed, STING seems to be highly implicated in the gut homeostasis, as shown in STING-deficient mice.⁴² Thus we can suppose that a fine regulation of Sting is necessary to maintain this homeostasis and would explain variations between mice, depending on interactions with the environment. Moreover, authors showed that IgA seem to be essential for gut homeostasis because they decrease the commensal bacterial penetration in the intestinal epithelium.⁴² Therefore IgA deficiency in our GOF model could also have an effect on intestinal microbiota and gut homeostasis.

Considering these findings, this new mouse model constitutes an important model in which to explore the role of STING in lymphocyte development and to further improve our understanding of pathophysiologic mechanisms of lymphopenia in patients with SAVI on the one hand and SCID (including severe hypogammaglobulinemia) on the other. Finally, the type I interferon-independent mechanism of SCID development can have important implications in the future treatment strategy of patients with SAVI.

FIG 6. The SCID phenotype in STING V154M/WT mice is type I interferon independent, but the antiproliferative effect in T cells is partly interferon dependent. **A** and **B**, RT-qPCR analysis of ISG in total splenocytes (Fig 6, A) and in sorted mature splenic B cells (Fig 6, B) of WT littermate (*open bars*), STING V154M/WT (*black bars*), STING WT/IFNAR KO (*light gray bars*), and STING V154M/WT/IFNAR KO (*dark gray bars*). mRNA levels of 3 ISGs ($n \geq 5$ in each group; Fig 6, A and B) and of IFN- α and IFN- β ($n \geq 3$ in each group; Fig 6, B) were measured by using quantitative RT-PCR. **C**, Weight curves of STING WT/IFNAR KO mice (*light gray circles*) and STING V154M/WT/IFNAR KO mice (*dark gray squares*). Each *dot* represents at least 8 mice. **D**, Flow cytometry phenotypic characterization of splenic cells from WT/IFNAR KO (*light gray*) and STING V154M/WT/IFNAR KO (*dark gray*) mice ($n = 10$ in each group). *Left*, Bar graphs show mean \pm SEM percentages ($n = 10$ in each group). *Right*, Representative dot plots of each population: B cells (IgM⁺B220⁺), CD4⁺ T cells (CD4⁺CD8⁻), CD8⁺ T cells (CD4⁻CD8⁺), granulocytes (Gr⁻; Gr1^{high}Mac1⁺), monocytes (Mo⁻; Gr1^{int}Mac1⁺), and NK cells (CD49b⁺NK1.1⁺). **E**, Total IgM and IgG levels (in micrograms per milliliter) were measured in serum of WT/IFNAR KO (*open triangles*) and STING V154M/WT/IFNAR KO (*gray diamonds*) mice. Each *dot* represents 1 animal. **F**, *Left*, Percentage of proliferating T cells after 4 days of stimulation of splenocytes from WT/IFNAR KO (*light gray*) and STING V154M/WT/IFNAR KO (*dark gray*) mice with anti-CD3/anti-CD28 (10 μ g/mL each; $n = 10$ in each group). *Right*, Histogram shows representative overlays. **G**, Percentage of T-cell death (propidium iodide [PI]⁺ cells) at steady state and after stimulation of splenocytes with anti-CD3/anti-CD28 (10 μ g/mL each) for 3 days ($n = 10$ in each group). Mice were 2 to 5 months old. *Bars* represent means \pm SEMs. * $P < .05$, ** $P < .01$, *** $P < .001$, and **** $P < .0001$, Mann-Whitney test.

We thank D. Bock, M. Duval, D. Lamon, S. Reibel-Foisset, and K. Sablon for excellent animal care. We thank V. Flacher, F. Gros, and C. Mueller (CNRS UPR 3572 "Immunopathology and Therapeutic Chemistry"/Laboratory of Excellence Medalis, Institute of Molecular and Cellular Biology [IBMC], Strasbourg, France) for scientific discussions.

Key messages

- A STING V154M/WT murine model demonstrated a SCID affecting B, T, and NK cells, with a significant expansion of monocytes and granulocytes. This SCID phenotype was independent of the type I interferon pathway, despite the observation of a significant upregulation of interferon-induced gene transcripts.
- An antiproliferative effect was noticed in T cells, which was partially interferon dependent.
- Variable inflammation of the lung and kidney was observed.

REFERENCES

1. Ishikawa H, Barber GN. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* 2008;455:674-8.
2. Jin L, Waterman PM, Jonscher KR, Short CM, Reisdorph NA, Cambier JC. MPYS, a novel membrane tetraspanner, is associated with major histocompatibility complex class II and mediates transduction of apoptotic signals. *Mol Cell Biol* 2008;28:5014-26.
3. Sun W, Li Y, Chen L, Chen H, You F, Zhou X, et al. ERIS, an endoplasmic reticulum IFN stimulator, activates innate immune signaling through dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:8653-8.
4. Zhong B, Yang Y, Li S, Wang Y-Y, Li Y, Diao F, et al. The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation. *Immunity* 2008;29:538-50.
5. Marinho FV, Benmerzoug S, Oliveira SC, Ryffel B, Quesniaux VFJ. The emerging roles of STING in bacterial infections. *Trends Microbiol* 2017;25:906-18.
6. Cai X, Chiu Y-H, Chen ZJ. The cGAS-cGAMP-STING pathway of cytosolic DNA sensing and signaling. *Mol Cell* 2014;54:289-96.
7. Melki I, Rose Y, Ugenti C, Van Eyck L, Frémond M-L, Kitabayashi N, et al. Disease-associated mutations identify a novel region in human STING necessary for the control of type I interferon signaling. *J Allergy Clin Immunol* 2017;140:543-52.e5.
8. Barber GN. STING-dependent cytosolic DNA sensing pathways. *Trends Immunol* 2014;35:88-93.
9. Panday A, Inda ME, Bagam P, Sahoo MK, Osorio D, Batra S. Transcription factor NF- κ B: an update on intervention strategies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2016;64:463-83.
10. Chen H, Sun H, You F, Sun W, Zhou X, Chen L, et al. Activation of STAT6 by STING is critical for antiviral innate immunity. *Cell* 2011;147:436-46.
11. Burdette DL, Vance RE. STING and the innate immune response to nucleic acids in the cytosol. *Nat Immunol* 2013;14:19-26.
12. Ahn J, Gutman D, Saijo S, Barber GN. STING manifests self DNA-dependent inflammatory disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:19386-91.
13. Roers A, Hiller B, Hornung V. Recognition of endogenous nucleic acids by the innate immune system. *Immunity* 2016;44:739-54.
14. Dobbs N, Burnaevskiy N, Chen D, Gonugunta VK, Alto NM, Yan N. STING activation by translocation from the ER is associated with infection and autoinflammatory disease. *Cell Host Microbe* 2015;18:157-68.
15. Liu Y, Jesus AA, Marrero B, Yang D, Ramsey SE, Sanchez GAM, et al. Activated STING in a vascular and pulmonary syndrome. *N Engl J Med* 2014;371:507-18.
16. Jeremiah N, Neven B, Gentili M, Callebaut I, Maschalidi S, Stolzenberg M-C, et al. Inherited STING-activating mutation underlies a familial inflammatory syndrome with lupus-like manifestations. *J Clin Invest* 2014;124:5516-20.
17. Crow YJ. Type I interferonopathies: a novel set of inborn errors of immunity. *Ann N Y Acad Sci* 2011;1238:91-8.
18. Rodero MP, Crow YJ. Type I interferon-mediated monogenic autoinflammation: the type I interferonopathies, a conceptual overview. *J Exp Med* 2016;213:2527-38.
19. Munoz J, Rodière M, Jeremiah N, Rieux-Laucat F, Oojageer A, Rice GI, et al. Stimulator of interferon genes-associated vasculopathy with onset in infancy: a mimic of childhood granulomatosis with polyangiitis. *JAMA Dermatol* 2015;151:872-7.
20. Omoyinmi E, Melo Gomes S, Nanthapisal S, Woo P, Standing A, Eleftheriou D, et al. Stimulator of interferon genes-associated vasculitis of infancy. *Arthritis Rheumatol* 2015;67:808.
21. Clarke SLN, Pellowe EJ, de Jesus AA, Goldbach-Mansky R, Hilliard TN, Ramanan AV. Interstitial lung disease caused by STING-associated vasculopathy with onset in infancy. *Am J Respir Crit Care Med* 2016;194:639-42.
22. Frémond M-L, Rodero MP, Jeremiah N, Belot A, Jeziorski E, Duffy D, et al. Efficacy of the Janus kinase 1/2 inhibitor ruxolitinib in the treatment of vasculopathy associated with TMEM173-activating mutations in 3 children. *J Allergy Clin Immunol* 2016;138:1752-5.
23. Picard C, Thouvenin G, Kannengiesser C, Dubus J-C, Jeremiah N, Rieux-Laucat F, et al. Severe pulmonary fibrosis as the first manifestation of interferonopathy (TMEM173 mutation). *Chest* 2016;150:e65-71.
24. König N, Fiehn C, Wolf C, Schuster M, Cura Costa E, Tüngler V, et al. Familial chilblain lupus due to a gain-of-function mutation in STING. *Ann Rheum Dis* 2017;76:468-72.
25. Müller U, Steinhoff U, Reis LF, Hemmi S, Pavlovic J, Zinkernagel RM, et al. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 1994;264:1918-21.
26. Schickel JN, Pasquali JL, Soley A, Knapp AM, Decossas M, Kern A, et al. Carabin deficiency in B cells increases BCR-TLR9 costimulation-induced autoimmunity. *EMBO Mol Med* 2012;4:1261-75.
27. Harrell MI, Iritani BM, Ruddell A. Lymph node mapping in the mouse. *J Immunol Methods* 2008;332:170-4.
28. Fan Y, Bergmann A. Apoptosis-induced compensatory proliferation. *The Cell* is dead. *Long live the Cell!* *Trends Cell Biol* 2008;18:467-73.
29. Fan Y, Wang S, Hernandez J, Yenigun VB, Hertlein G, Fogarty CE, et al. Genetic models of apoptosis-induced proliferation decipher activation of JNK and identify a requirement of EGFR signaling for tissue regenerative responses in *Drosophila*. *PLoS Genet* 2014;10:e1004131.
30. Fogarty CE, Bergmann A. Killers creating new life: caspases drive apoptosis-induced proliferation in tissue repair and disease. *Cell Death Differ* 2017;24:1390-400.
31. Ryoo HD, Bergmann A. The role of apoptosis-induced proliferation for regeneration and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012;4:a008797.
32. Cabatingan MS, Schmidt MR, Sen R, Woodland RT. Naive B lymphocytes undergo homeostatic proliferation in response to B cell deficit. *J Immunol* 2002;169:6795-805.
33. Zook EC, Kee BL. Development of innate lymphoid cells. *Nat Immunol* 2016;17:775-82.
34. Kim M-Y, Kim K-S, McConnell F, Lane P. Lymphoid tissue inducer cells: architects of CD4 immune responses in mice and men. *Clin Exp Immunol* 2009;157:20-6.
35. Kruglov AA, Grivennikov SI, Kuprash DV, Winsauer C, Prepens S, Seleznik GM, et al. Nonredundant function of soluble LT α 3 produced by innate lymphoid cells in intestinal homeostasis. *Science* 2013;342:1243-6.
36. Lane P, Gaspal FM, McConnell FM, Kim MY, Anderson G, Withers DR. Lymphoid tissue inducer cells: innate cells critical for CD4⁺ T cell memory responses? *Ann N Y Acad Sci* 2012;1247:1-15.
37. Pokatayev V, Hasin N, Chon H, Cerritelli SM, Sakhuja K, Ward JM, et al. RNase H2 catalytic core Aicardi-Goutières syndrome-related mutant invokes cGAS-STING innate immune-sensing pathway in mice. *J Exp Med* 2016;213:329-36.
38. Mackenzie KJ, Carroll P, Lettice L, Tarnauskaitė Ž, Reddy K, Dix F, et al. Ribonuclease H2 mutations induce a cGAS-STING-dependent innate immune response. *EMBO J* 2016;35:831-44.
39. Maelfait J, Bridgeman A, Benlahrech A, Cursi C, Rehwinkel J. Restriction by SAMHD1 limits cGAS-STING-dependent innate and adaptive immune responses to HIV-1. *Cell Rep* 2016;16:1492-501.
40. Cerboni S, Jeremiah N, Gentili M, Gehrmann U, Conrad C, Stolzenberg M-C, et al. Intrinsic antiproliferative activity of the innate sensor STING in T lymphocytes. *J Exp Med* 2017;214:1769-85.
41. Warner JD, Irizarry-Caro RA, Bennion BG, Ai TL, Smith AM, Miner CA, et al. STING-associated vasculopathy develops independently of IRF3 in mice. *J Exp Med* 2017;214:3279-92.
42. Canesso MCC, Lemos L, Neves TC, Marim FM, Castro TBR, Veloso ÉS, et al. The cytosolic sensor STING is required for intestinal homeostasis and control of inflammation. *Mucosal Immunol* 2017;20:1-15.
43. Barber GN. STING: infection, inflammation and cancer. *Nat Rev Immunol* 2015;15:760-70.

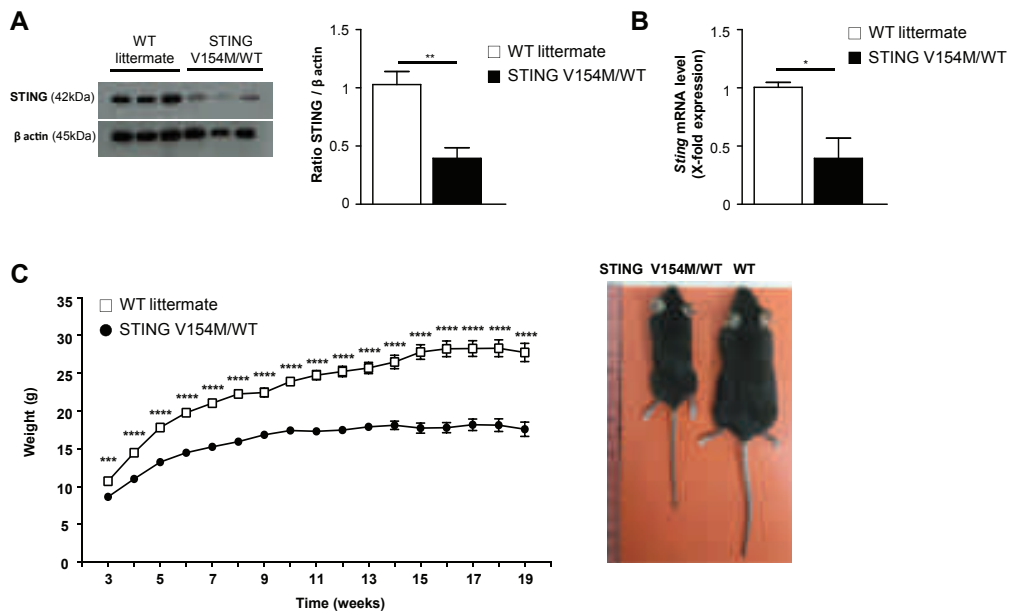


FIG E1. Weight loss and STING expression in STING V154M/WT mice. **A**, Detection of STING by using immunoblot analysis on sorted splenic B cells (*left*, representative gel; *right*, quantification of Sting expression; $n = 6$ mice in each group). **B**, Expression of Sting mRNA assessed by using RT-qPCR after RNA extraction of sorted splenic B cells from WT littermate (*open bars*) and STING V154M/WT (*black bars*) mice ($n \geq 4$ in each group). **C**, *Left*, Weight curves of WT littermate mice (*open squares*) and STING V154M/WT mice (*black circles*). Each *dot* represents at least 17 mice. *Right*, Representative picture of a STING V154M/WT versus a WT littermate mouse, both female (age at analysis, 3 months). *Bars* represent means \pm SEMs. * $P < .05$, ** $P < .01$, *** $P < .001$, and **** $P < .0001$, Mann-Whitney test.

A

	Mouse ID	LUNGS				KIDNEYS		LIMBS		
		Age	Antibiotic	Alveolar inflammation	Perivascular inflammation	Fibrosis	Inflammation	Fibrosis	Articular inflammation / bone erosion	Vascular involvement
WT littermate	#1	5m	0	+	0	ND	0	0	0	0
	#2	4m	0	0	+	0	0	0	0	Vascular obstruction (digital SVN)
	#3	2m	+	0	0	0	0	0	0	0
	#4	2m	+	0	0	0	0	0	0	0
	#5	2.5m	+	+	+	0	0	0	0	0
	#6	3m	+	+	0	0	0	0	0	0
	#7	3m	+	0	+	0	0	0	0	0
	#8	3m	+	0	+	0	0	0	0	0
	#9	2.5m	+	+	+	0	0	0	0	0
STING V154M/WT	#10	5m	0	++++	0	ND	+	ND	0	Cellular aggregates in digits vessels' lumen
	#11	4m	0	0	0	0	0	0	0	0
	#12	4m	0	0	0	+++	0	0	0	0
	#13	4m	0	0	0	0	0	0	0	0
	#14	2m	+	0	0	0	+	++	0	0
	#15	2m	+	0	0	0	+	++	0	0
	#16	2.5m	+	0	+	0	0	0	0	0
	#17	2.5m	+	+	++	+	0	0	0	0
	#18	3m	+	+	++	0	0	0	0	0
	#19	3m	+	0	0	0	0	0	0	0
	#20	2.5m	+	++	+	0	0	0	0	0

Abbreviations : (ND) not determined, (SVN) subcutaneous vascular network
Lesions' severity scale : (0) not observed, (+) minimal, (++) slight, (+++) moderate, (++++) severe

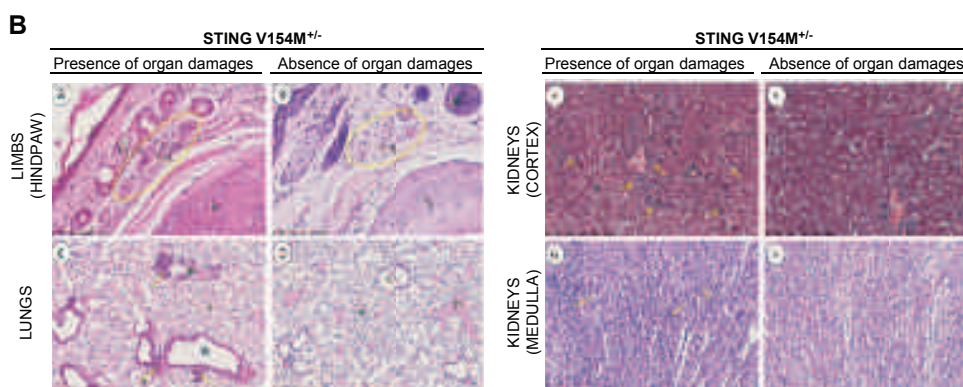


FIG E2. Histologic analysis showing that STING V154M/WT mice present incomplete penetrance of a lung and renal inflammatory phenotype. **A**, Summary of histologic analysis performed on 11 STING V154M/WT mice versus 9 WT littermate mice. Each experiment is presented with a different color in the *Mouse ID* column. Some mice were treated with the antibiotic (enrofloxacin, see the Methods section), as indicated in the second column. **B**, Representative pictures of STING V154M/WT mice with organ damage (left; [A], [C], and [E]) or absence of organ damage (right; [B], [D], and [F]). (A) and (B), Hind paws; (C) and (D), lungs; (E) and (F), kidneys (cortex). (A)-(D), (G), and (H), Hematoxylin and eosin stain; (E) and (F), Masson trichrome stain (fibrosis is demonstrated in blue). *Ellipses* circle the subcutaneous vascular network, which is occasionally obstructed with cellular material. *Dotted arrows* indicate inflammatory foci in lung and kidney medulla. *Arrows* point to fibrosis in the renal cortex. A, Alveolar parenchyma; B, bone; Br, bronchia; BV, blood vessel; E, epidermis; G, glomeruli; HF, hair follicle; T, tubules. *Scale bars* correspond to 100 μ m on (A) and (B), 500 μ m on (C) and (D), and 250 μ m on (E) to (H).

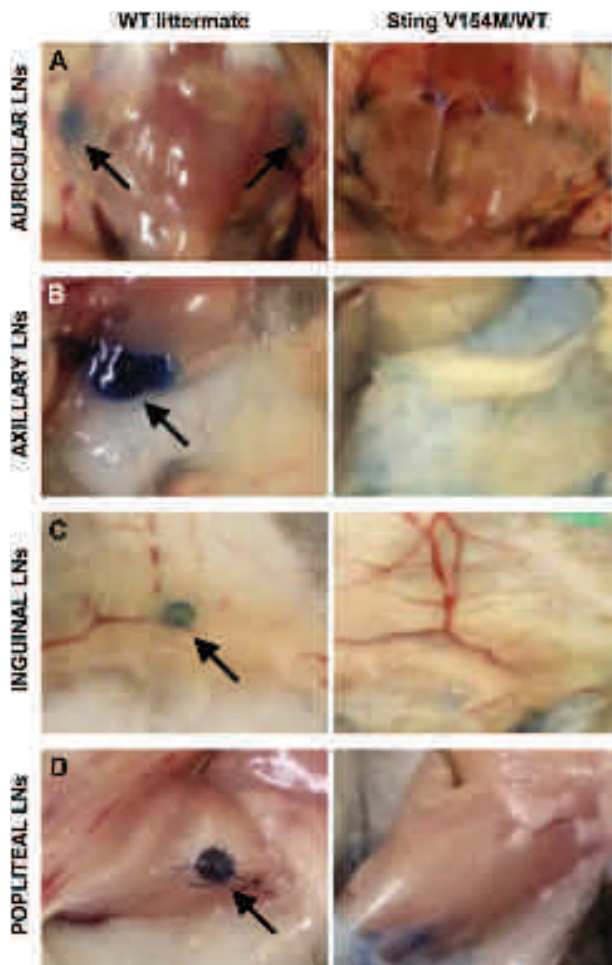


FIG E3. Absence of LNs in STING V154M/WT mice compared with WT littermates. Pictures are of a WT littermate (*left column*) and a STING V154M/WT (*right column*) mouse (7-week-old mice). **A**, Auricular LNs. **B**, Axillary LNs. **C**, Inguinal LNs. **D**, Popliteal LNs. LNs (*arrow*) were labeled with 5% Evans blue dye after subcutaneous injection in the front legs, hindfoot, and ears. Pictures are representative of 3 distinct experiments. The phenotype was identical at different ages (7-, 12-, and 20-week-old mice).

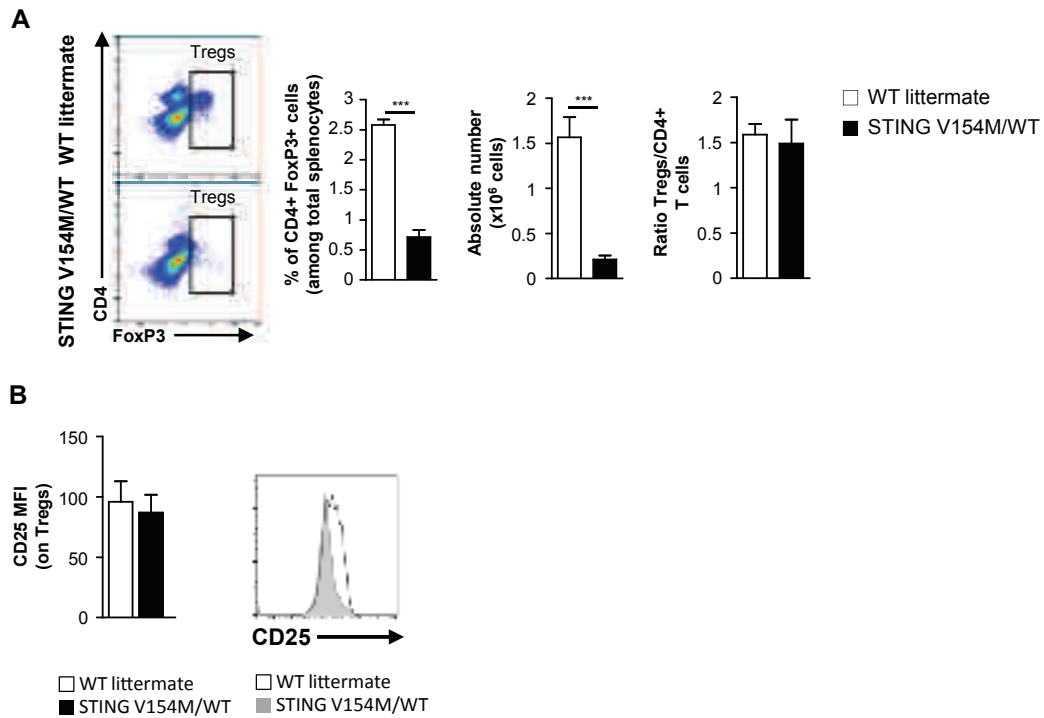


FIG E4. Effect of STING GOF on Treg cells and their activation status. **A, Left,** Representative dot plots of the relevant population both for WT littermate and STING V154M/WT mice ($n \geq 10$ in each group). **Right,** Histograms showing percentages and absolute numbers of Treg cells (CD4⁺Foxp3⁺) and the ratio Treg cells/total CD4⁺ T cells. WT littermate mice are represented with *open bars* and STING V154M/WT mice with *black bars*. **B,** Expression of CD25 on Treg cells. Histogram showing CD25 mean fluorescence intensity (MFI); $n \geq 4$ in each group) and a representative overlay. Mice were 2 to 5 months old. *Bars* represent means \pm SEMs. *** $P < .001$, Mann-Whitney test.

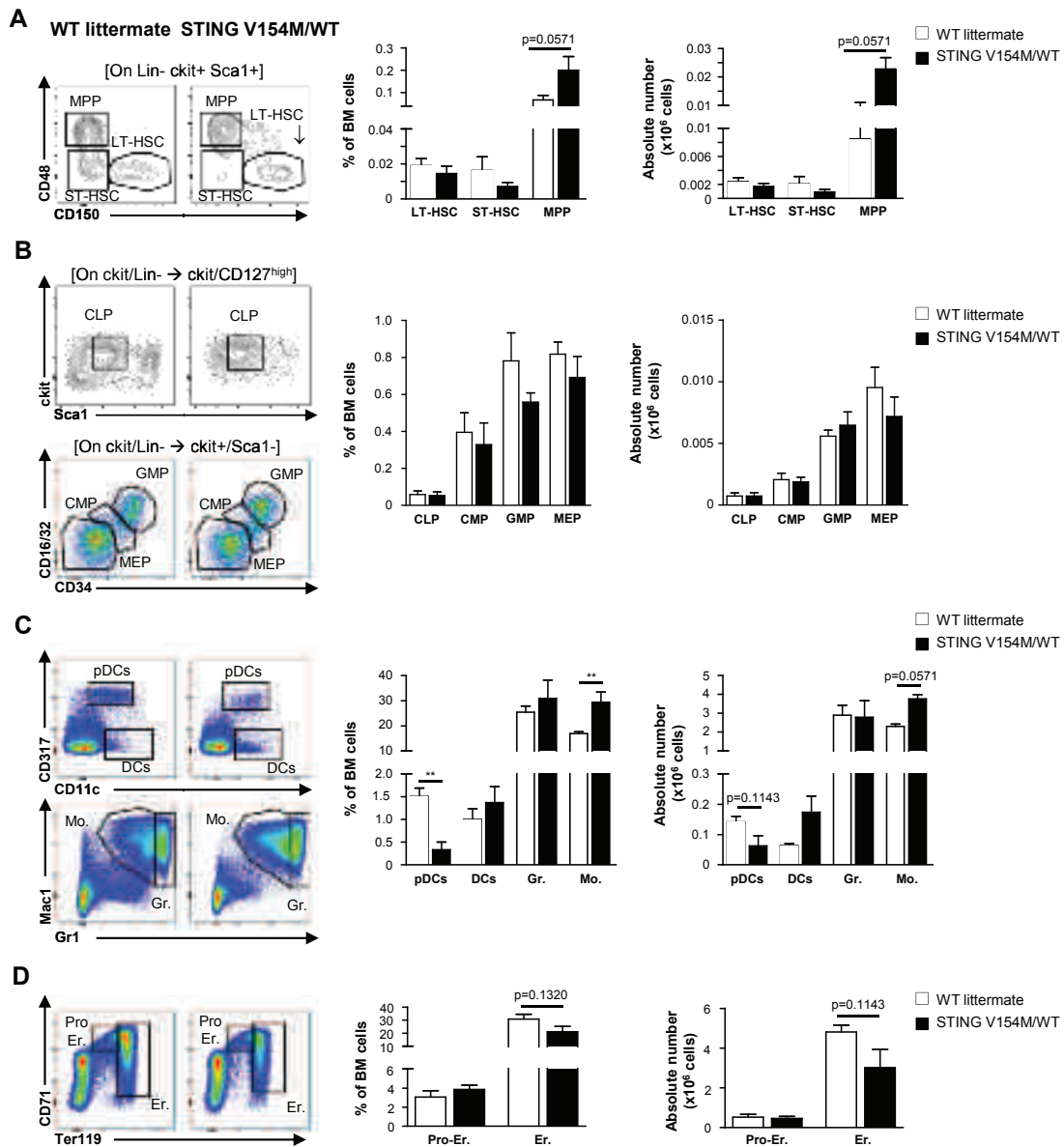


FIG E5. Despite a defect in hematopoietic cell development after engagement in the B- and T-cell lineage, early BM progenitors are not affected in STING V154M/WT mice. Each *panel on the left* shows representative dot plots of the relevant population, both for WT littermate and STING V154M/WT mice ($n \geq 3$ in each group). Each population is shown in chronological order of appearance in development in the BM. Percentages (*middle*) and absolute numbers (*right*) represented for WT littermate (*open bars*) and STING V154M/WT (*black bars*) mice. **A, Left,** Gates show long-term (LT-HSC; $\text{Lin}^- \text{Sca1}^+ \text{c-Kit}^+ \text{CD48}^- \text{CD150}^+$) and short-term (ST-HSC; $\text{Lin}^- \text{Sca1}^+ \text{c-Kit}^+ \text{CD48}^- \text{CD150}^-$) HSCs and the multipotent progenitor (MPP; $\text{Lin}^- \text{Sca1}^+ \text{c-Kit}^+ \text{CD48}^+ \text{CD150}^-$) populations. **B, Left,** Gates show the common lymphoid progenitor (CLP; $\text{Lin}^- \text{CD127}^{\text{high}} \text{c-Kit}^{\text{low}} \text{Sca1}^{\text{low}}$), common myeloid progenitor (CMP; $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+ \text{Sca1}^- \text{CD16/CD32}^{\text{int}} \text{CD34}^{\text{int}}$), granulocyte/macrophage progenitor (GMP; $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+ \text{Sca1}^- \text{CD16/CD32}^{\text{high}} \text{CD34}^{\text{high}}$), and the megakaryocyte/erythrocyte progenitor (MEP; $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+ \text{Sca1}^- \text{CD16/CD32}^- \text{CD34}^-$). **C, Left,** Gates show conventional dendritic cell (DCs; $\text{CD317}^+ \text{CD11c}^+$), plasmacytoid dendritic cell (pDCs; $\text{CD317}^+ \text{CD11c}^+$), monocyte (Mo.; $\text{Gr1}^{\text{int}} \text{Mac1}^+$), and granulocyte ($\text{Gr1}^{\text{high}} \text{Mac1}^+$) populations. **D, Left,** Gates represent the megakaryocyte/erythrocyte lineage with proerythrocytes (Pro-Er.; $\text{CD71}^+ \text{Ter119}^{\text{low}}$) and erythrocytes (Er.; $\text{CD71}^+ \text{Ter119}^+$). Bars represent means \pm SEMs. $**P < .01$, Mann-Whitney test.

RESULTATS

PARTIE II

Matériel et méthodes – partie II

Les souris STING V154M/WT ainsi que les souris STING V154M/WT-IFNAR KO ont précédemment été décrites dans le papier « Severe combined immunodeficiency in STING V154M/WT mice » présenté page 103 (Bouis, 2018). Le phénotype de ces dernières, ainsi que les méthodes utilisées pour l'analyse des résultats développés dans cette nouvelle partie et déjà décrites en page 103, ne seront pas détaillées dans cette partie.

Nous ne développerons ici que les nouvelles techniques utilisées et ne figurant pas dans le Matériel et Méthodes de l'article sus-mentionné.

Western Blot

Les lysats cellulaires sont préparés tels que décrit précédemment, puis déposés sur gel et transférés sur membrane PVDF (Bouis, 2018). Ces membranes sont ensuite incubées avec des anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre les protéines phospho-Akt (Cell Signaling, #9271), Akt total (Cell Signaling, #9272). Ces protéines sont ensuite détectées avec des anticorps secondaires de chèvre anti-lapin couplés à la peroxydase de raifort (111-035-008, Jackson ImmunoResearch). Un anticorps anti-actine β (Santa Cruz) est utilisé comme contrôle de charge.

Différenciation des cellules médullaires de souris *in vitro*

Culture des cellules OP9 et OP9-DL1

Les cellules stromales OP9, et cellules dérivées OP9-DL1 (cellules OP9 modifiées afin d'exprimer le ligand du récepteur Notch, Delta-like-1) sont cultivées dans du milieu MEM alpha 1900 (Gibco) supplémenté de 20% de SVF décomplémenté (Dutscher), 1mM de Pyruvate de sodium, 50 μ g/ml de gentamycine et de 1% Pénicilline/Streptomycine (Gibco). Elles sontensemencées en plaques 24 puits 24h avant la co-culture de façon à être à confluence au début de la co-culture.

Co-culture avec les cellules médullaires

Une suspension de cellules médullaires est obtenue à partir d'un broyat des fémurs, des tibias, des os iliaques et du sternum des souris d'intérêt. Après numération, les cellules hématopoïétiques immatures sont purifiées par tri magnétique (tri négatif). Pour cela les cellules sont incubées avec des anticorps monoclonaux IgG de rat dirigés contre plusieurs marqueurs de cellules matures de souris,

Lin (CD3, CD4, CD8, CD11b, CD19, CD49b, Gr1 et Ter119), puis avec un anticorps de mouton dirigé contre les IgG de rat couplé à des billes magnétiques (DynaBeads-Sheep anti-Rat IgG, InVivoGen #11035). Les cellules marquées sont retenues sur un aimant afin d'isoler les cellules immatures (ou Lin⁻). Ces cellules sont ensuite mises en co-culture avec les cellules OP9 ou OP9-DL1, à raison de 50×10^3 cellules/ml de cellules médullaires, sur un tapis de cellules stromales confluentes, dans une plaque 24 puits.

Le milieu de culture OP9 est supplémenté d'IL-7 (2.5% pour la culture de lymphocytes T sur OP9-DL1, 10% pour la culture de lymphocytes B sur OP9) ainsi que de Flt3L (2.5% pour les deux types de culture). Les cellules sont ensuite mises à l'incubateur pendant 5 jours à 37°C, puis les cellules sont récupérées et les cellules médullaires inférieures à 70µm sont filtrées et récupérées. Elles sont ensuite comptées et remises en culture à 50×10^3 cellules/ml sur un nouveau tapis d'OP9 (ou OP9-DL1) mis en plaque la veille. Les cellules médullaires restantes sont marquées et leur stade de différenciation est analysé en cytomètre de flux. Ce processus est répété tous les 5 jours pendant 25 jours.

Grefe de moelle osseuse

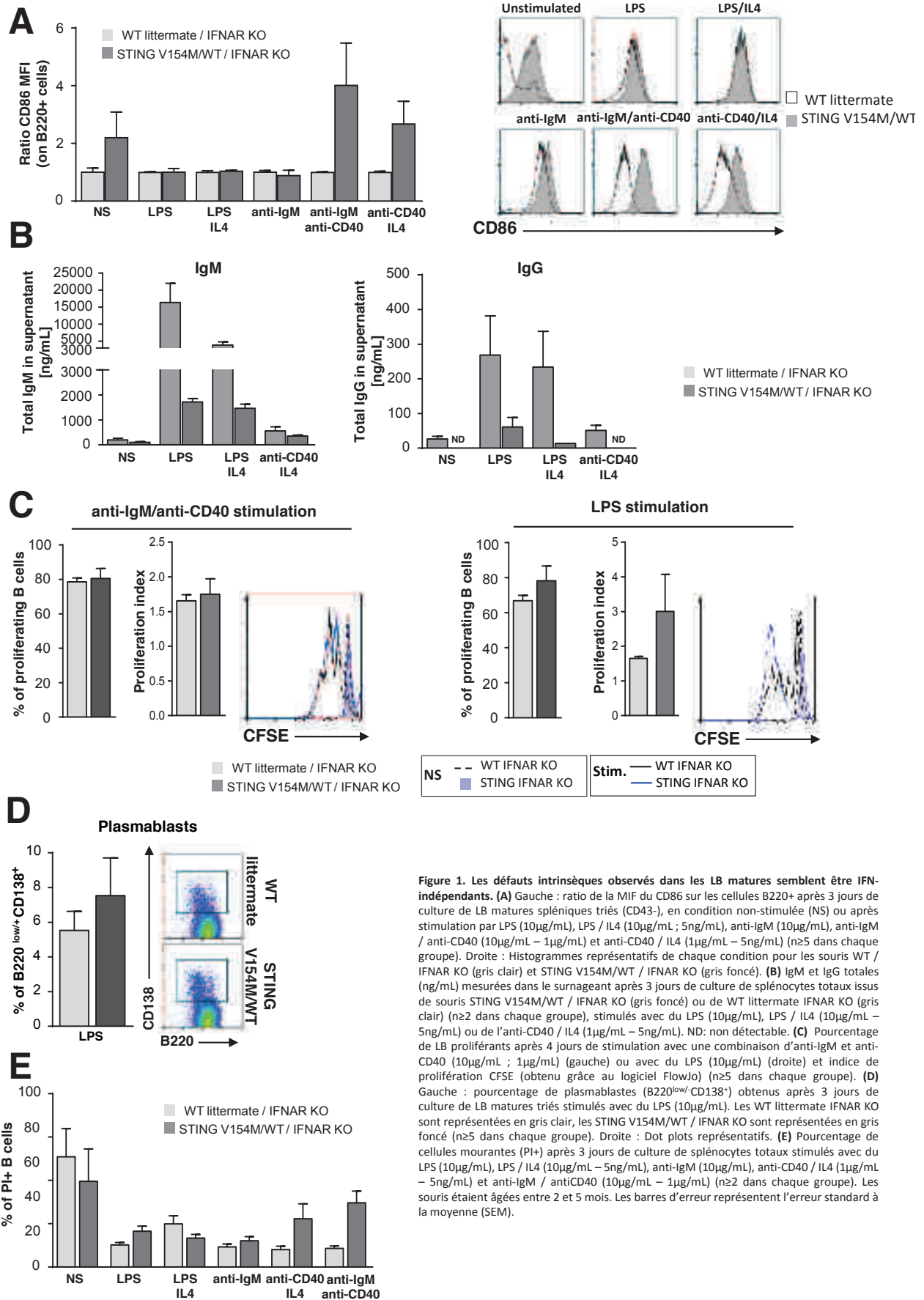
Transfert de cellules de moelle osseuse de souris sauvages (WT) dans des souris STING V154M/WT ou WT littermate

Les souris (7 souris STING V154M/WT et 7 souris contrôles de la même portée, de fond génétique C57BL/6 Ly5.2+, c'est-à-dire CD45.2+) sont irradiées aux rayons X avec une dose de 9Gy 24h avant le transfert. Les cellules médullaires totales des souris donneuses sauvages Ly5.1+ (CD45.1+) sont isolées et reprises dans du milieu IMDM à raison de 2×10^6 cellules/ml. 1×10^6 de cellules médullaires sauvages sont ensuite injectées par voie intra-veineuse dans la queue des souris irradiées STING V154M/WT et contrôles, le lendemain de l'irradiation.

Transfert de cellules médullaires STING V154M/WT et contrôles dans des souris sauvages

De la même façon que dans le transfert de moelle osseuse précédent, 1×10^6 cellules issues de la moelle osseuse de souris STING V154M/WT et contrôles (CD45.2+) sont injectées par voie intra-veineuse dans la queue de souris sauvages Ly5.1.2 hétérozygotes CD45.1.2+.

Un et 2 mois après le transfert de moelle osseuse, la prise de greffe des cellules transférées est évaluée à partir de cellules de sang périphérique par un marquage CD45.1 et CD45.2 permettant d'identifier les cellules greffées des cellules de la souris hôtes. Au bout de 3 mois, les souris greffées seront sacrifiées et les cellules de la rate, de la moelle osseuse et du thymus sont analysées par cytométrie en flux avec des anticorps reconnaissant les marqueurs précédemment décrits (Bouis, 2018).



Résultats Partie II

Les défauts intrinsèques observés dans les LB matures semblent être IFN I-indépendants

Le SAVI étant considéré comme une interféronopathie, c'est-à-dire une pathologie conduisant à l'augmentation de la production des IFN I et de l'expression d'ISGs, nous avons précédemment voulu vérifier si le phénotype SCID observé dans nos souris STING V154M/WT était dépendant des IFN I ou non. Pour ce faire, nous avons croisé nos souris d'intérêt avec des souris déficientes pour le récepteur aux IFN I (IFNAR KO) (Fig. 6 de l'article, [Bouis, 2018](#)).

Il s'est avéré que la majeure partie du phénotype observé dans les souris STING V154M/WT était indépendant des IFN I (Fig. 6, C, D, E de l'article, [Bouis, 2018](#)). Cependant, après analyse plus précise du compartiment T, nous avons pu constater que l'action anti-proliférative de STING dans les LT matures, de même que l'augmentation de leur mortalité cellulaire, pouvaient être partiellement réversées chez les souris STING V154M/WT / IFNAR KO (Fig. 6, F, G de l'article, [Bouis, 2018](#)). Ceci nous amène donc à la conclusion que le gain-de-fonction de STING conduit à des effets à la fois dépendants et indépendants des IFN I.

De façon à compléter cette analyse, nous nous sommes dans un second temps intéressés au compartiment des LB matures chez les souris STING V154M/WT / IFNAR KO, afin d'étudier le caractère, IFN-dépendant ou non, du phénotype des LB matures dans les souris STING V154M/WT.

De la même façon que pour les LB STING V154M/WT (Fig. 4, A de l'article, [Bouis, 2018](#)), l'analyse par cytométrie de flux montre que les LB issus des souris STING V154M/WT / IFNAR KO présentent une augmentation de l'expression du CD86, un marqueur d'activation des LB, à la fois à l'état basal (NS), mais aussi après stimulation avec un anticorps anti-IgM et un anticorps anti-CD40, ou avec un anticorps anti-CD40 et de l'IL-4 ([Fig. 1, A](#)).

Considérant l'importante réduction de la sécrétion d'immunoglobulines (Ig) après stimulation *in vitro* de LB STING V154M/WT (Fig. 6, B de l'article, [Bouis, 2018](#)), nous nous sommes également intéressés aux Ig sécrétées dans le surnageant de culture après stimulation de LB STING V154M/WT / IFNAR KO. De la même façon que les LB des souris STING V154M/WT, ces LB présentent un défaut de sécrétion des IgM et IgG (détecté par ELISA) après stimulation par du LPS, par LPS et IL-4 ou par anti-CD40 et IL-4 ([Fig. 1, B](#)).

Cette fois encore, ce défaut de sécrétion n'est pas la conséquence d'une anomalie liée à la prolifération des LB (Fig. 6, C de l'article, [Bouis, 2018](#)) puisque tant après stimulation par un anticorps

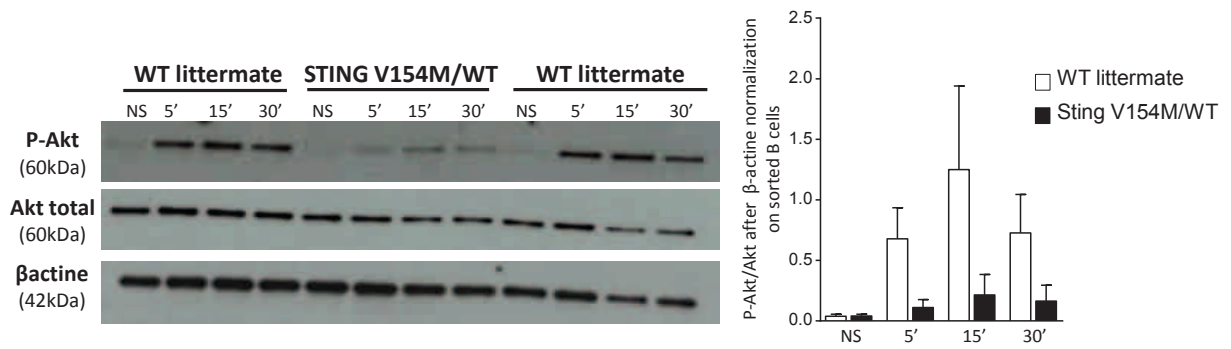


Figure 2. La voie Akt semble être impactée dans les LB de STING V154M/WT. Détection de P-Akt, Akt et β-actine par Western-Blot dans des LB spléniques triés et stimulés aux temps indiqués (NS : non stimulé, 5min, 15min ou 30min) par un anticorps anti-IgM (10µg/mL) et un anti-CD40 (1µg/mL). Gauche : Membrane représentative ; Droite : Quantification de l'expression de P-Akt après normalisation par un contrôle interne (β-actine) (n≥3 dans chaque groupe). Les souris étaient âgées entre 2 et 5 mois. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard à la moyenne (SEM).

anti-IgM et un anticorps anti-CD40, ou par du LPS, les LB STING V154M/WT / IFNAR KO restent capables de proliférer normalement, d'après l'analyse de l'incorporation de CFSE par cytométrie de flux (**Fig. 1, C**). Ce défaut de sécrétion n'est pas non plus lié à une différenciation altérée des LB en plasmocytes, d'après l'analyse de l'expression des marqueurs B220 et CD138 par cytométrie en flux (**Fig. 1, D**) (Fig. 4, D de l'article, **Bouis, 2018**).

Enfin, nous avons analysé la mortalité cellulaire par incorporation d'iodure de propidium (PI, *propidium iodide*) et nous avons retrouvé dans l'ensemble l'augmentation de la mortalité cellulaire observée dans les LB STING V154M/WT après stimulation (Fig. 4, E de l'article, **Bouis, 2018**), notamment par LPS, anti-IgM/anti-CD40 et anti-CD40/IL4 (**Fig. 1, E**). Cette mortalité est cependant un peu plus importante dans les STING V154M/WT, quelle que soit la stimulation. Néanmoins, nous avons moins d'animaux dans cette seconde analyse et les techniques utilisées pour l'analyse de la mortalité cellulaire, dans l'article et dans cette seconde partie, ne sont pas tout à fait les mêmes (% PI+ ici, % Annexin 5+ dans l'article). Il faudra donc confirmer ces résultats sur un nombre plus important d'animaux.

Ces résultats indiquent donc que, bien que le phénotype des LT matures soit partiellement dépendant des IFN I, les défauts intrinsèques observés dans le compartiment B ne semblent, quant à eux, pas liés aux IFN I.

Une indépendance du phénotype des cellules exprimant le mutant V154M de STING vis à vis des IFN I laisse supposer une autre voie régulée par STING

Compte tenu du fait que le phénotype observé semble être quasiment intégralement indépendant de la voie des IFN I, et étant donné que l'activation constitutive de STING occasionne un phénotype délétère chez la souris N154S qui serait IRF3 indépendant (voir Discussion, **Warner, 2017**), nous nous sommes alors demandés quelles pouvaient être les voies alternatives activées par STING. Nous avons pu constater à l'état basal une hyperactivation des LB issus de souris STING V154M/WT et STING V154M/WT / IFNAR KO, mais aussi en cas de stimulation avec un anticorps anti-CD40. C'est pourquoi nous nous sommes intéressées aux voies de signalisation activées par le CD40, et en particulier la voie Akt. La voie Akt semble être un bon candidat car les LB exprimant la mutation de STING semblent proliférer correctement mais meurent de manière plus importante.

J'ai donc stimulé des LB spléniques triés (CD43-) de souris STING V154M/WT et contrôles littermate, avec des anticorps anti-IgM et anti-CD40 et analysé l'activation de la voie Akt par Western-Blot. Bien que j'ai pu observer par cytométrie en flux une activation plus importante des LB après cette stimulation, il s'avère qu'au contraire, cela conduise à une diminution de l'expression de phospho-

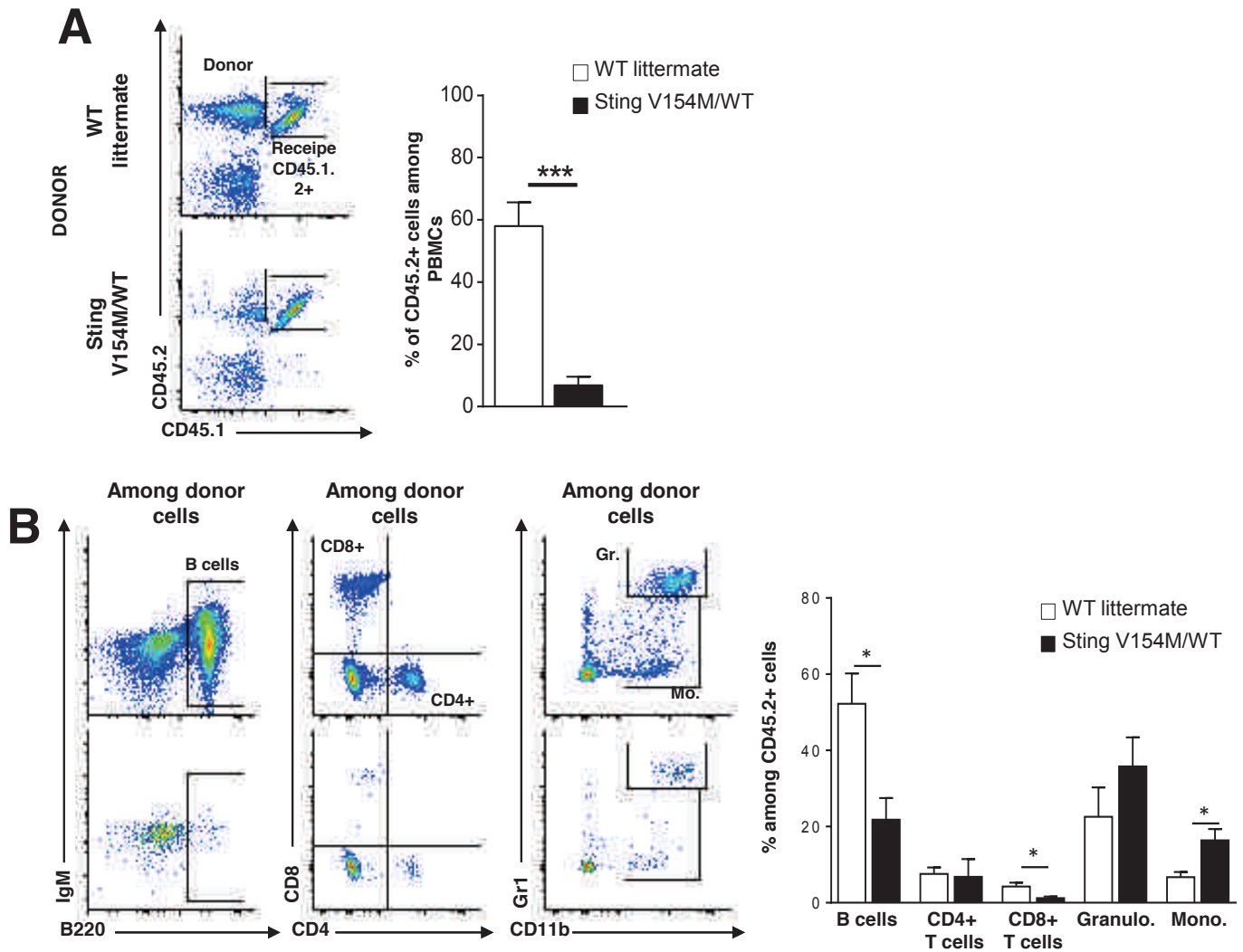
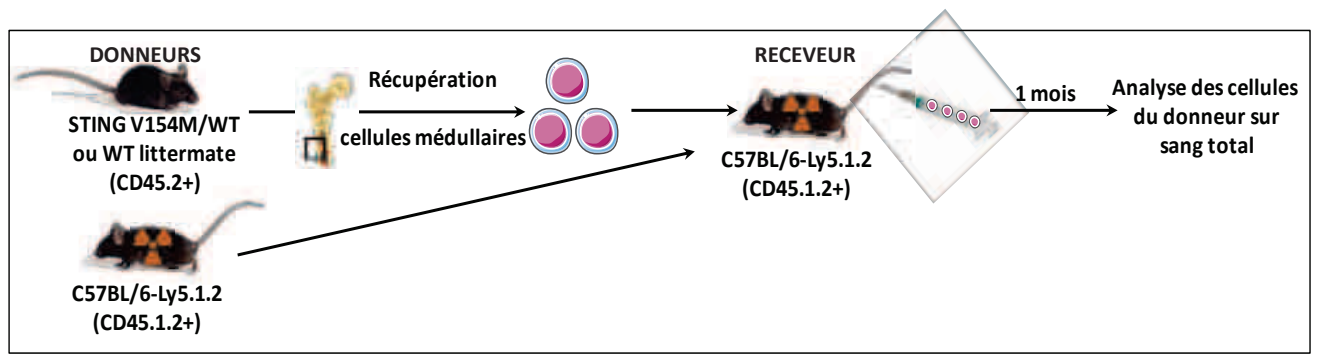


Figure 3. Vérification du caractère intrinsèque aux cellules hématopoïétiques des anomalies observées dans la moelle et le thymus par transfert de moelle osseuse de souris STING V154M/WT ou WT littermate dans des souris sauvages. En haut : représentation schématique du transfert de moelle osseuse effectué. **(A)** Gauche : Dot plots représentatifs permettant la visualisation des cellules issues du donneur (souris STING V154M/WT ou WT littermate, CD45.2+) et du receveur (souris sauvage Ly5.1.2, CD45.1.2+) après marquage par cytométrie en flux sur sang total un mois après le transfert. Droite : Les souris WT littermate sont représentées en blanc dans l'histogramme, les STING V154M/WT en noir (n≥7 dans chaque groupe). **(B)** Gauche : Dots plots représentatifs des LB (B220+ IgM+), LT CD4+, LT CD8+, granulocytes (Gr. Gr1^{high}CD11b⁺) et monocytes (Mo. Gr1^{int/low}CD11b⁺). Droite : Représentation graphique des résultats, les souris WT littermate sont représentées en blanc et les STING V154M/WT en noir (n≥7 dans chaque groupe). Les souris irradiées étaient âgées de 6 semaines, les donneuses entre 3 et 5 mois. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard à la moyenne (SEM). *, p<0.05, ***, p<0.001, Test de Mann-Whitney.

Akt (P-Akt) (Fig. 2). Cette diminution est en accord avec les résultats d'apoptose (Fig. 4, E de l'article, Bouis, 2018), où l'on observe une augmentation de la mort cellulaire dans les LB des souris STING V154M/WT comparé aux souris contrôles. En effet, Akt est un acteur central dans la survie cellulaire. Une diminution de son expression pourrait donc promouvoir l'apoptose et expliquer la forte mortalité des LB observée.

Le défaut développemental précoce observé dans la moelle et le thymus des souris STING V154M/WT est lié à une anomalie intrinsèque aux cellules hématopoïétiques

Afin d'étudier plus en détails le défaut de maturation lymphocytaire observé dans la moelle osseuse et le thymus des souris STING V154M/WT, nous avons réalisé des expériences de transfert de moelle osseuse. Deux types de transferts ont été réalisés afin de mettre en évidence l'origine (stromale ou hématopoïétique) du défaut développemental dans les souris STING V154M/WT.

Un premier transfert de cellules médullaires issues de souris STING V154M/WT ou de souris contrôles littermate (toutes de fond génétique C57BL/6 CD45.2+, c'est-à-dire Ly5.2+) a été réalisé dans des souris WT de type Ly5.1.2 hétérozygotes (CD45.1.2+). Des souris hétérozygotes CD45.1.2+ sont utilisées dans ce cas car ces souris sont plus faciles à obtenir en croisement (fertilité supérieure), par rapport à des souris CD45.1+ homozygotes, et que cette expérience nécessite un nombre important d'animaux. Nous pourrions facilement distinguer, par un double marquage CD45.1 et CD45.2, les cellules du receveur (CD45.1+/CD45.2+) des cellules du donneur (CD45.1-/CD45.2+).

Au bout d'un mois, la reconstitution de la moelle osseuse est vérifiée par analyse des populations hématopoïétiques présentes dans le sang, par cytométrie de flux. Ainsi, nous avons pu constater que, dans le cas où les souris Ly5.1.2 étaient transférées avec des cellules médullaires issues de souris WT littermate, une reconstitution normale avait lieu chez les souris irradiées avec plus de 60% de cellules CD45.2+ présentes en périphérie (Fig.3, A), avec présence de LB (B220+ IgM+), de LT CD4+, LT CD8+ et de cellules myéloïdes (granulocytes [Gr1^{high} CD11b+] et monocytes [Gr1^{low} CD11b+]) (Fig. 3, B).

A contrario, la prise de greffe est mauvaise lorsque nous transférons des cellules médullaires de souris STING V154M/WT dans des souris WT irradiées. En effet, les souris reconstituées possèdent moins de 10% de cellules CD45.2+ en périphérie (Fig.3, A). Ces cellules semblent maturer et proliférer moins bien, car les populations lymphoïdes sont peut détectables en périphérie. En revanche, il semblerait que, bien que les cellules CD45.2+ soient peu nombreuses chez les souris STING V154M/WT, les populations myéloïdes aient moins de mal à se développer par rapport aux lymphocytes (Fig. 3, B), ce qui est en corrélation, sur la base de ces facteurs étudiés, avec le phénotype des cellules sanguines des souris STING V154M/WT non issues de transfert de moelle osseuse (Fig. 2, A de l'article, Bouis, 2018).

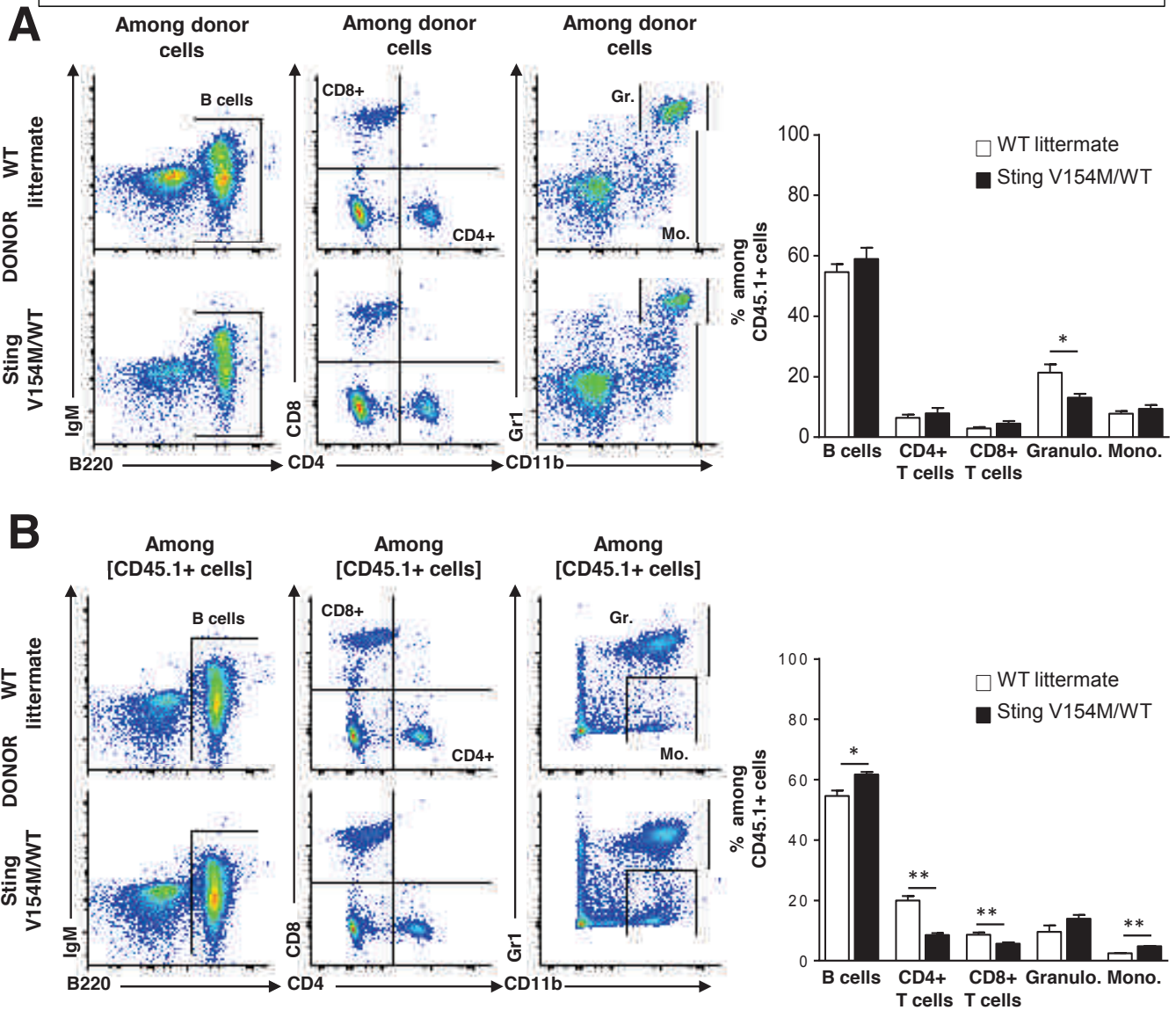
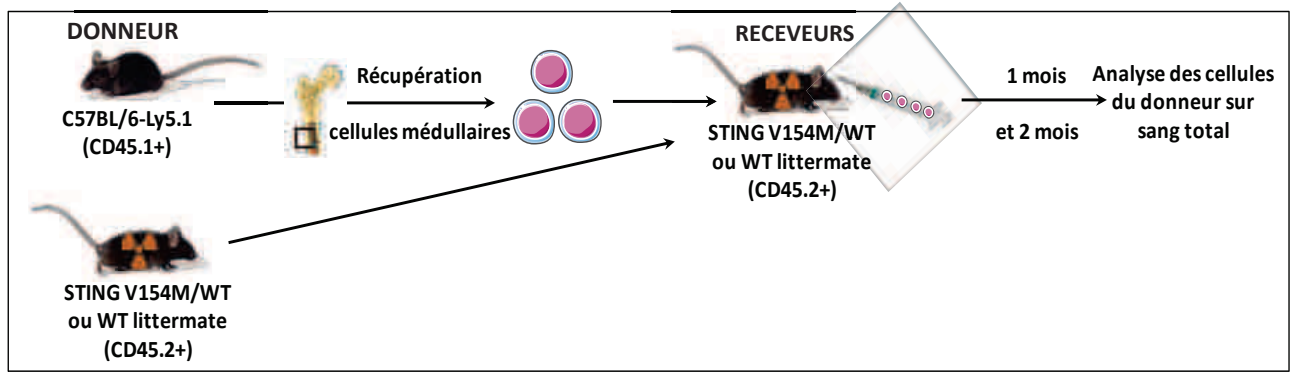


Figure 4. Vérification du caractère intrinsèque aux cellules hématopoïétiques des anomalies observées dans la moelle et le thymus par transfert inverse de moelle osseuse de souris sauvages dans des souris STING V154M/WT ou WT littermate. En haut : représentation schématique du transfert de moelle osseuse effectué. **(A)** Gauche : Dots plots représentatifs des LB (B220+ IgM+) , LT CD4+ , LT CD8+ , granulocytes (Gr. Gr1^{high}CD11b⁺) et monocytes (Mo. Gr1^{int/low}CD11b⁺) présents dans le sang total après 1 mois après le transfert. Droite : Représentation graphique des résultats, les souris WT littermate sont représentées en blanc et les STING V154M/WT en noir (n≥5 dans chaque groupe). **(B)** Dots plots représentatifs des LB, LT CD4+ , LT CD8+ , granulocytes et monocytes présents dans le sang total 2 mois après le transfert. Droite : Représentation graphique des résultats, les souris WT littermate sont représentées en blanc et les STING V154M/WT en noir (n≥5 dans chaque groupe). Les souris irradiées étaient âgées de 6 semaines, les donneuses entre 6 et 9 semaines. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard à la moyenne (SEM). *, p<0.05, **, p<0.01, Test de Mann-Whitney.

Ainsi, le défaut de développement lymphocytaire détecté chez les souris STING V154M/WT semble être d'origine hématopoïétique. Le transfert inverse est cependant nécessaire avant de conclure définitivement.

Ce transfert inverse consiste en l'injection de cellules médullaires de souris WT (Ly5.1, CD45.1+) dans des souris STING V154M/WT ou WT littermate irradiées (CD45.2+). Après un mois, l'analyse des cellules hématopoïétiques issues du sang périphérique par cytométrie de flux nous permet de noter une bonne prise de greffe. En effet, à la fois chez les souris STING V154M/WT et les souris contrôles littermate receveuses, les cellules hématopoïétiques du donneur (CD45.1+) semblent se développer normalement (**Fig. 4, A**). Cette première analyse nous permet de supposer un rôle intrinsèque aux cellules hématopoïétiques dans le phénotype des souris STING V154M/WT, sans impact visible du stroma médullaire.

Deux mois post-greffe, cependant (**Fig. 4, B**), nous pouvons constater que bien que les souris STING V154M/WT aient une reconstitution médullaire *a priori* normale, il semblerait cependant que les LT se développent moins bien que chez les WT littermate. En effet, tant les proportions des LT CD4+ que celles des LT CD8+ semblent abaissées chez les STING V154M/WT reconstituées par rapport aux contrôles. Cela laisserait ainsi supposer, en plus du défaut d'origine hématopoïétique, un léger défaut du stroma des souris STING V154M/WT, peut-être restreint à l'environnement thymique.

Les cellules thymiques des souris STING V154M/WT semblent présenter un défaut d'expression du récepteur Notch, nécessaire à leur différenciation

Compte tenu du défaut de développement des LT ainsi que du potentiel défaut du stroma thymique évoqué ci-dessus, nous nous sommes intéressés à l'expression du récepteur Notch exprimé par les cellules hématopoïétiques (**voir Partie IV II-2.1. Entrée de l'ETP dans le thymus, page 85**). Un défaut d'expression du récepteur ou de son ligand pourraient en effet grandement impacter la différenciation des LT, compte tenu de l'importance de la voie Notch dans ce développement.

De façon intéressante, des résultats préliminaires semblent indiquer un défaut d'expression du récepteur Notch, ou un défaut d'activation de ce récepteur (**Fig. 5**). En effet, l'expression de la partie intracellulaire de Notch (NICD), clivée en cas de liaison avec son ligand, semble diminuée au stade DN2 chez les souris STING V154M/WT par rapport aux souris WT. Pour rappel, les cellules DN2 prolifèrent beaucoup et nécessitent fortement la voie Notch, or il s'agit aussi du stade auquel on peut observer le blocage le plus important dans la différenciation des LT dans les souris STING V154M/WT *ex vivo*, à la fois en nombre absolu et en pourcentage de cellules (**Fig. 3, C de l'article Bouis, 2018**).

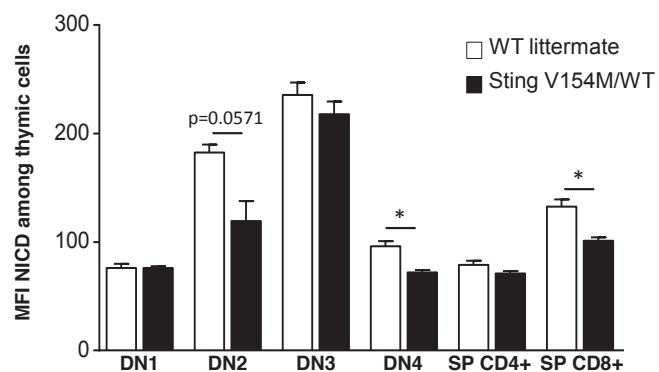
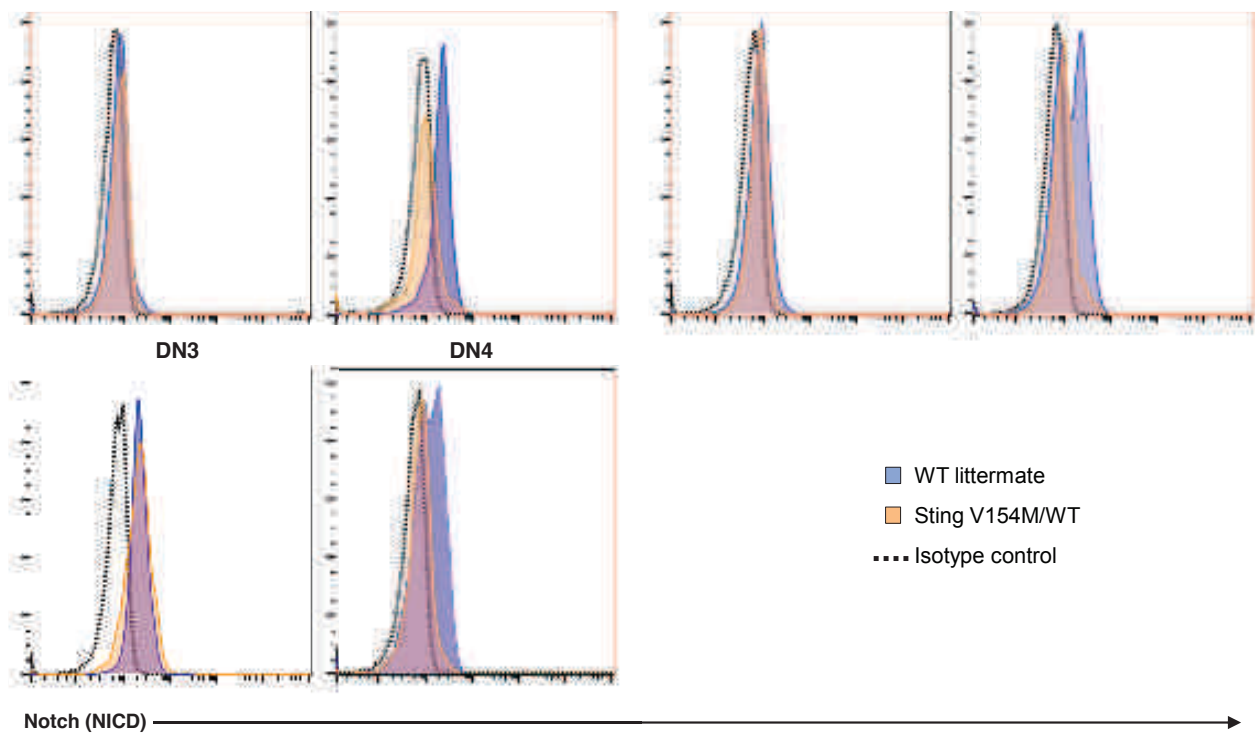


Figure 5. Les cellules thymiques des souris STING V154M/WT semblent présenter un défaut d'expression du récepteur Notch. Haut : Histogrammes représentatifs pour chaque population thymique : Double négative DN1 (Lin- CD44+ CD25-), DN2 (Lin- CD44+ CD25+), DN3 (Lin- CD44- CD25+), DN4 (Lin- CD44- CD25-), et simples positives SP CD4+ (CD4+) et SP CD8+ (CD8+). La souris WT littermate est représentée en bleu, la STING V154M/WT en orange et le contrôle isotypique figure en pointillés. Bas : Représentation graphique des résultats, les souris WT littermate sont représentées en blanc et les STING V154M/WT en noir (n=4 dans chaque groupe). Les souris étaient âgées de 4 mois. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard à la moyenne (SEM). *, $p<0.05$, Test de Mann-Whitney.

Cependant, au stade DN3, cette expression augmente pour les STING V154M/WT, se normalisant alors par rapport aux WT, suggérant donc une signalisation Notch qui pourrait se développer normalement mais qui semble altérée particulièrement au stade DN2.

De plus, on constate que les souris STING V154M/WT semblent aussi présenter une diminution d'expression de NICD au stade DN4, pouvant indiquer un défaut de maturation et de passage au stade DP. Des études montrent d'ailleurs que Notch serait requis pour le passage du stade DN vers le stade DP. Finalement, l'expression de NICD apparaît diminuée dans les cellules SP CD8+. Le rôle de Notch au stade SP n'est pas bien défini, néanmoins, des études ont montré que la voie Notch pourrait favoriser la différenciation vers le stade SP8 (Laky, 2008 ; Dervovic, 2013).

Néanmoins, NICD étant sujet à un recyclage important, il se pourrait que cette expression diminuée soit l'effet d'un turnover plus important chez les souris STING V154M/WT et il sera intéressant de compléter cette étude préliminaire par l'analyse de l'expression du récepteur à la membrane, ainsi qu'une analyse de l'expression, par qRT-PCR, des gènes cibles de Notch, tels que ceux codant pour GATA3, t-Bet ou IL-4.

Caractérisation du blocage développemental précoce des progéniteurs de LB et LT issus des souris STING V154M/WT, par différenciation *in vitro*

Afin d'étudier plus en détails les stades de différenciation des progéniteurs qui pourraient être impactés par le gain de fonction de STING dans les souris STING V154M/WT, et de compléter les résultats obtenus *ex vivo* avec l'analyse par cytométrie de flux des progéniteurs médullaires (Fig. E5 de l'article, Bouis 2018), nous avons utilisé un système de culture *in vitro* à l'aide d'une lignée de cellules stromales dérivées de la moelle osseuse, les OP9. Dans le cas d'une culture de progéniteurs T, ces cellules OP9 sont modifiées afin d'exprimer le ligand de Notch, Delta-like 1, permettant une différenciation exclusive vers la lignée T. Une co-culture est ainsi mise en place entre ces cellules OP9 et des cellules médullaires progénitrices triées (Lin⁻ : CD3, CD4, CD8, CD11b, CD19, CD49b, Gr1 et Ter119) à partir de souris STING V154M/WT ou contrôles littermate. Nous avons cultivé ces cellules pendant 25 jours, en analysant leur stade de différenciation tous les 5 jours.

Concernant la différenciation de la lignée des LT (Fig. 6), on peut observer à J10, dans la culture de cellules WT, la présence de cellules DN1, qui se différencient en DN2 peu à peu, avec présence de quelques DN3. Les DN2 sont présentes en grande quantité puisque c'est le stade où les cellules prolifèrent beaucoup avant d'entrer en stade DN3. Au stade DN3, en effet, les cellules prolifèrent beaucoup moins puisqu'elles réarrangent leur TCR par combinaison V(D)J. Elles restent ainsi plus longtemps en DN3. Enfin, à J20 et J23, on observe un passage effectif vers le stade DN3. La culture *in vitro* de cellules médullaires immatures de souris WT littermate sur des cellules OP9-DL1 permet ainsi

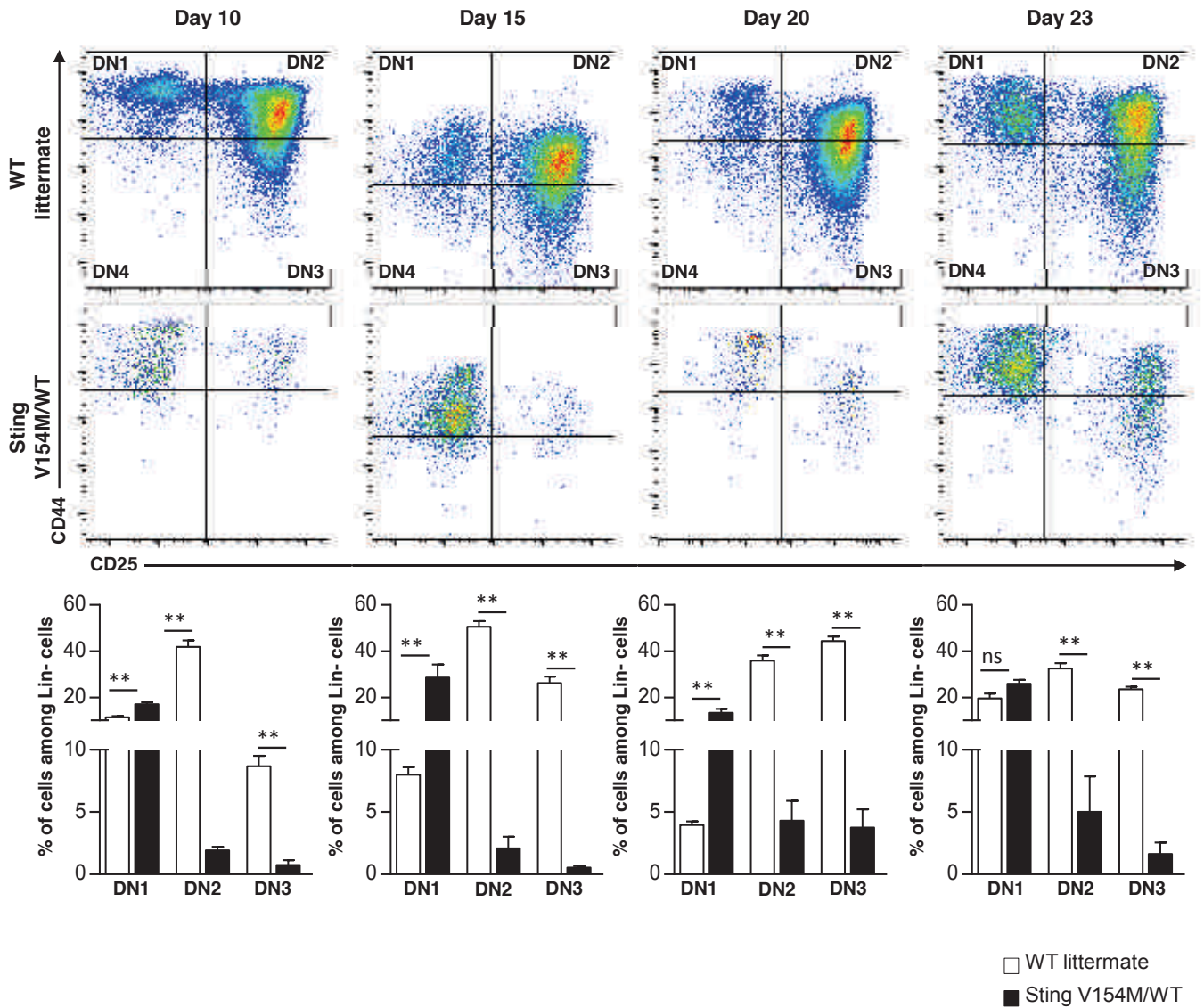


Figure 6. Caractérisation du blocage développemental précoce des LT issus des souris STING V154M/WT, par différenciation *in vitro*. Haut : Dots plots représentatifs des populations double négative DN1 (Lin- CD44+ CD25-), DN2 (Lin- CD44+ CD25+), DN3 (Lin- CD44- CD25), après 10, 15, 20 et 23 jours de culture *in vitro* des cellules progénitrices issues de souris WT littermate ou STING V154M/WT. Ces cellules sont ensemencées tous les 5 jours sur un nouveau tapis de cellules OP9-DL1 (exprimant le ligand Delta-like 1 de Notch) en présence d'IL-7 (2.5%) et de Flt3L (2.5%), et leur stade de différenciation est analysé par cytométrie en flux tous les 5 jours. Bas : Représentation graphique des résultats, les souris WT littermate sont représentées en blanc et les STING V154M/WT en noir (n=5 dans chaque groupe). Les souris étaient âgées de 3 à 5 mois. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard à la moyenne (SEM). **, p<0.01, Test de Mann-Whitney. ns : non significatif.

de les différencier en stades DN. Une culture plus longue semble nécessaire pour obtenir des DN4, bien que de nombreuses publications observent ces cellules au bout de 20 à 22 jours.

De façon cohérente avec les résultats obtenus *in vivo* (Fig. 3 de l'article, Bouis, 2018), nous avons pu observer, dans la culture de cellules médullaires issues de STING V54M/WT sur des OP9-DL1, un blocage quasi complet après le stade DN1 (Fig. 6). Quelques cellules sont capables de se différencier en DN2 mais ce pourcentage semble négligeable comparé aux WT littermate. Ces cellules restent ainsi pour la plupart bloquées en DN1, comme indiqué sur les graphes aux jours 10, 15 et 20, où la population de cellules DN1 est plus importante chez les STING V154M/WT par rapport aux WT littermate. A J23, cependant, il semblerait que la population DN2 augmente légèrement chez les STING V154M/WT par rapport aux jours précédents, probablement dû au fait que cette population est très proliférante. Ainsi, si quelques cellules ont réussi à se différencier en DN2, il est probable qu'ensuite elles aient beaucoup proliféré afin de permettre une différenciation effective en DN3, ce qui semble être le cas à 23 jours.

Concernant la différenciation en progéniteurs de la lignée B, l'étude du cheminement des différents stades de différenciation au moyen de la culture sur OP9 nous a donné des résultats plus difficiles à interpréter. Néanmoins, on peut distinguer le développement des différentes fractions de Hardy.

La culture de cellules médullaires de souris WT permet dès le jour 10 de distinguer les fractions A/B/C, la fraction D semblant être à son maximum dès le début de la culture (Fig. 7, A, B, C, D). Au bout de 15 jours, ces fractions A/B et C prolifèrent de façon importante par rapport à J10. La fraction A diminue ensuite à 20 jours, permettant un passage net vers les fractions B et C qui se maintiennent, tout comme la fraction D dont les proportions restent équivalents à J15 et J20. Puis à 23 jours, les fractions A, B et C diminuent fortement, privilégiant ainsi les stades D et E (Fig. 7, D, E).

Le profil de développement des cellules issues de souris STING V154M/WT semble suivre à peu près la même cinétique, à quelques différences près. En effet, la culture de cellules médullaires de souris STING V154M/WT montre, à J10, une différenciation incomplète des fractions A, B, et C (Fig. 7, A, B, C). Néanmoins la fraction D semble, tout comme pour les WT, être présente dès J10 (Fig. 7, D). A J15, la fraction A semble apparaître, se développant ainsi avec un temps de retard par rapport aux WT littermate (Fig. 7, A). Les fractions B et C suivent la même tendance, leur développement étant tout de même limité (Fig. 7, B, C). A J20, de la même façon que les souris contrôles, la fraction A diminue et on peut observer un développement important des fractions B et C. Ces stades de différenciation semblent donc apparaître avec un temps de latence par rapport aux WT. Enfin, à J23, les fractions A, B et C diminuent et les fractions D et E prolifèrent (Fig. 7, A, B, C, D, E). Tout comme pour les souris

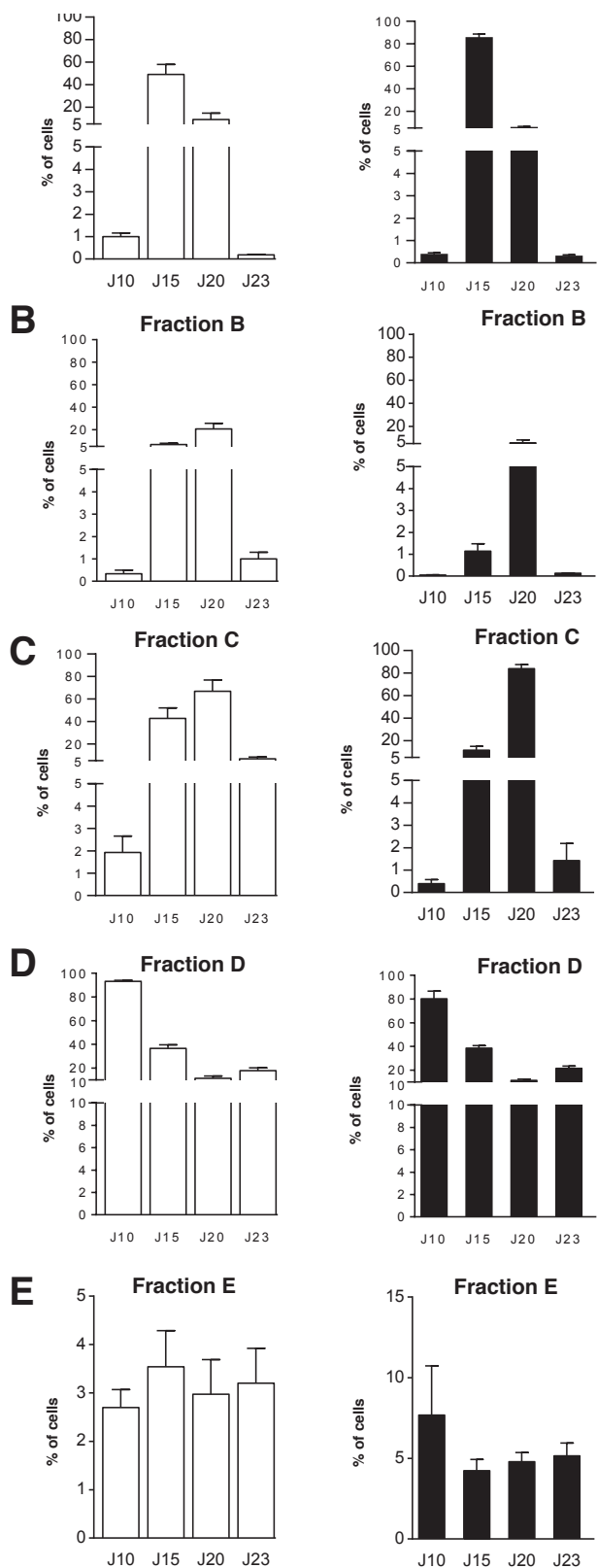


Figure 7. Caractérisation du blocage développemental précoce des LB issus des souris STING V154M/WT, par différenciation *in vitro*. Visualisation des stades de différenciation des fractions de Hardy par cytométrie en flux après ensemencement de cellules progénitrices tous les 5 jours sur un nouveau tapis de cellules OP9 en présence d'IL-7 (10%) et de Flt3L (2.5%) : A (CD43+ B220+ BP1- CD24-), B (CD43+ B220+ BP1- CD24+), C (CD43+ B220+ BP1+ CD24+), D (CD43- B220+ IgM- IgD-) et E (CD43- B220+ IgM+ IgD-). La colonne de gauche représente les souris WT littermate tandis que la colonne de droite montre les souris STING V154M/WT. (A) Marquage des cellules de la fraction A (B) B, (C) C, (D) D et (E) E (n=5 dans chaque groupe). Les souris étaient âgées de 3 à 5 mois. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard à la moyenne (SEM).

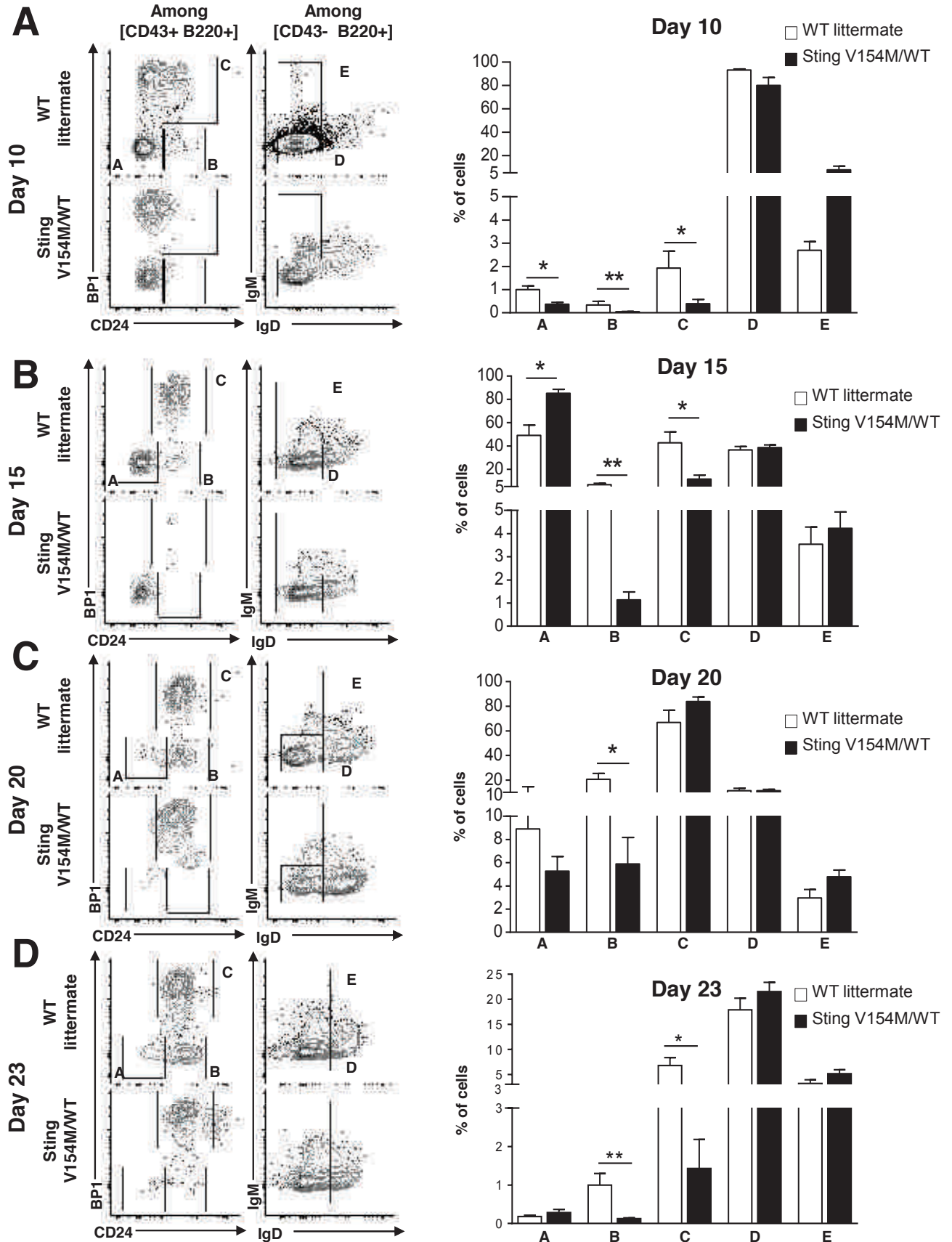
contrôles, les fractions D et E restent relativement constantes, et ces stades ne semblent pas être impactés par le retard observé en début de cycle de différenciation (Fig. 7, D, E).

Si l'on compare directement les fractions des souris STING V154M/WT à celles des souris WT (Fig. 7bis), on peut observer un blocage, statistiquement significatif, dès les premiers jours de développement des cellules porteuses de la mutation V154M. En revanche, les quelques cellules s'étant différenciées avec succès permettent alors un développement normal des fractions D et E (pré-B et immatures) (Fig. 7bis, A). A J15, seule la différenciation des fractions B et C semble être impactée alors qu'au bout de 20 jours, on arrive à retrouver autant de proB (fraction C) et préB (D) pour les cellules des STING V154M/WT, comparé aux WT, dont le pool est cependant déjà diminué et tend à disparaître (Fig. 7bis, B, C). Enfin, à J23, on peut quantifier un défaut de développement des fractions B et C issues des souris STING V154M/WT par rapport aux WT (Fig. 7bis, D). De façon étonnante, alors que l'on observe une forte diminution des cellules immatures (fractions E) *ex vivo* (Fig. 3, A de l'article Bouis, 2018), il s'avère qu'*in vitro* ces cellules ne subissent pas de réel blocage, laissant alors supposer que les facteurs ajoutés en culture permettent de dépasser ce défaut.

L'expression de STING semble varier en fonction des différentes populations de progéniteurs

Afin de vérifier si les différents blocages observés *ex vivo* et *in vitro* au niveau thymique et médullaire sont dus à une différence d'expression de STING dans les différents progéniteurs successifs des lignées B et T, nous avons marqué la protéine par cytométrie en flux. Nous avons dans un premier temps cherché à vérifier si cette expression variait en fonction des populations observées, chez des souris sauvages. En effet, chez une souris WT littermate, aux différents stades DN, l'expression de STING semble la plus forte dans les DN2 au niveau thymique. Il ne semble pas y avoir de différence majeure dans l'expression de STING entre les cellules SPCD4+ et SPCD8+ (Fig. 8, A). De la même façon dans la moelle, le CLP paraît très peu exprimer STING, alors que les pro-préB semblent l'exprimer fortement (Fig. 8, B).

On pourrait ainsi penser que les populations exprimant le plus fortement STING pourraient ainsi être les plus touchées par la mutation V154M affectant la fonction de STING. En effet, un gain-de-fonction entraînant une activation constitutive de la protéine, protéine qui nécessite une forte régulation pour éviter le risque d'entraîner une forte inflammation suite à la production d'IFN I, pourrait entraîner de défauts majeurs dans les populations l'exprimant fortement. En outre, j'ai pu observer au niveau thymique un défaut de développement survenant au stade DN2 *ex vivo* (Fig. 3, C de l'article Bouis, 2018), affectant les LT en périphérie et en particulier les LT CD8+. Au niveau médullaire, le défaut développemental survient après le stade CLP et concerne principalement, dans la lignée des LB, la fraction A de Hardy (pro-préB), n'ayant que peu d'impact pour les fractions B, C et



D, puis touchant les cellules immatures et matures en périphérie. Ces données sur l'expression de Sting dans les progéniteurs sont donc en adéquation avec le phénotype de blocage développemental observé *ex vivo*.

Si l'on compare ensuite cette expression de STING dans les progéniteurs de souris WT littermate avec celles des souris STING V154M/WT, il s'avère que les stades DN2 et DN3 au niveau thymique semblent exprimer STING plus fortement encore que les souris contrôles. Il est alors possible de suggérer que la gravité de l'atteinte observée dans ces populations en particulier pourrait être liée à l'expression plus forte de STING (Fig. 8, C). Enfin, au niveau médullaire, les STING V154M/WT et les WT littermate expriment STING de façon similaire, cette expression étant importante après le CLP, dans les populations pro-préB, immatures et matures (Fig. 8, D). Une différence d'expression entre les 2 groupes de souris n'explique donc pas le phénotype, dans le cas de la lignée des LB.

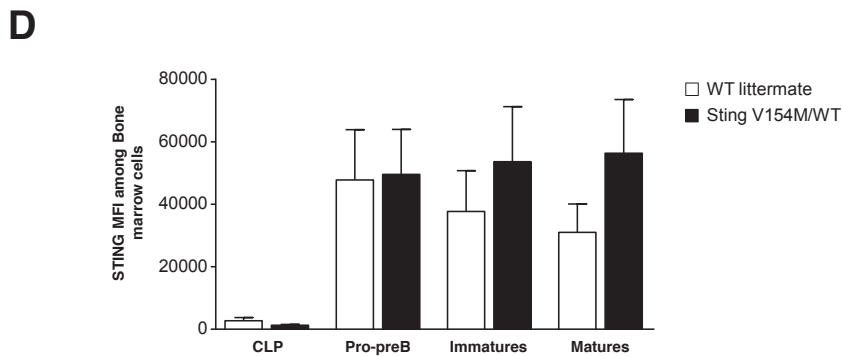
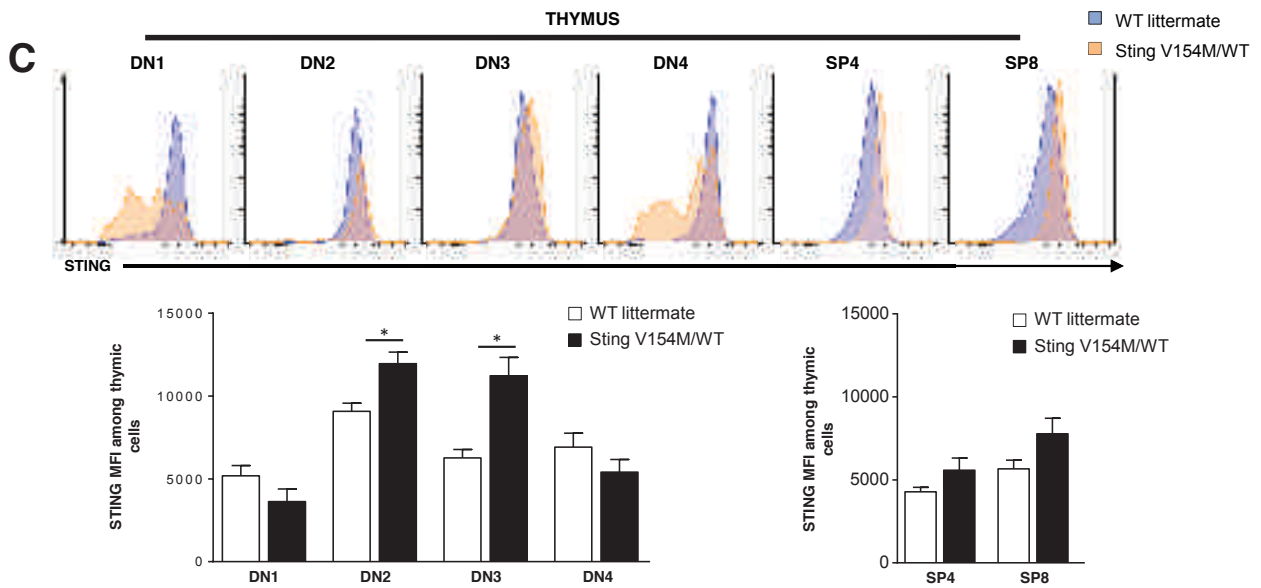
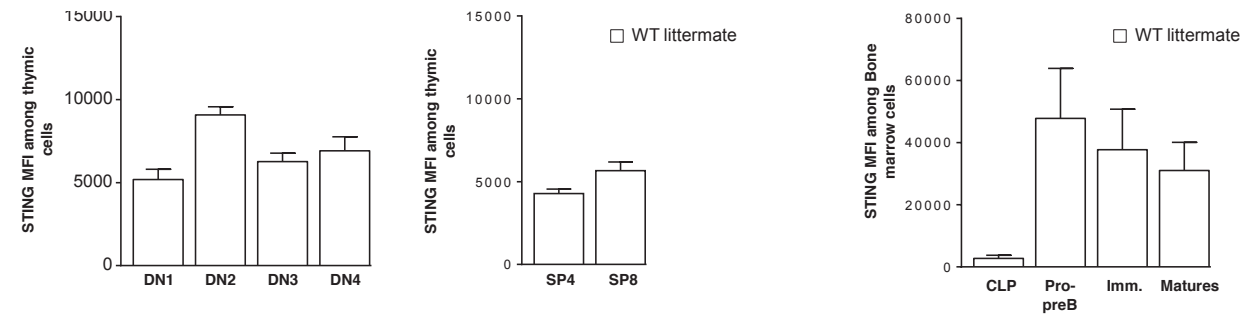


Figure 8. L'expression de STING semble variée en fonction des différentes populations de progéniteurs. (A) MIF représentant l'expression de STING, visualisée par cytométrie en flux, chez des souris WT littermate, dans les progéniteurs thymiques double négatif : DN1 (Lin- CD44+ CD25-), DN2 (Lin- CD44+ CD25+), DN3 (Lin- CD44- CD25) et DN4 (Lin- CD44- CD25-) et les cellules thymiques simples positives : SP CD4+ et SP CD8+. (B) Expression de STING dans les progéniteurs médullaires chez une souris WT littermate : CLP (Lin- Kit^{low} Sca1^{low} CD127+), pro-préB (B220- IgM-), immatures (B220int/+ IgM+) et matures (B220+ IgM+). (C) Expression de STING dans les progéniteurs thymiques, analyse comparative entre les souris contrôles (barres blanches) et Sting V154M/WT (barres noires). Le panel du haut montre des histogrammes représentatifs pour les populations étudiées. (D) Expression comparative de STING dans les progéniteurs médullaires. (n≥4 dans chaque groupe). Les souris étaient âgées de 3 à 5 mois (n≥6 dans chaque groupe). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard à la moyenne (SEM). *, p<0.05, Test de Mann-Whitney.

DISCUSSION

Phénotype des souris STING V154M/WT versus SAVI

Comme mentionné précédemment, le phénotype des souris STING V154M/WT présente certaines similitudes avec la pathologie humaine, bien qu'il ne la récapitule pas complètement (**Tableau 12**). En effet, on peut observer chez les patients une lymphopénie affectant les LT et, de façon globale, une leucopénie (**voir Partie III IV-3.2. Caractéristiques biologiques des patients SAVI, page 75**). De plus, certains patients présentent une infiltration de neutrophiles au niveau de la peau et une anémie, traits que l'on retrouve chez la souris V154M/WT. Néanmoins, alors que les patients peuvent présenter une vasculopathie sévère pouvant entraîner une nécrose, ainsi qu'une importante atteinte pulmonaire de type fibrose, je n'ai pu observer qu'une atteinte variable au niveau des poumons chez la souris STING V154M/WT, et aucune lésion cutanée. De plus, l'atteinte pulmonaire observée chez une partie des souris est une atteinte inflammatoire mais non une fibrose, d'après les marquages réalisés en histologie. Chez les patients SAVI, une expression variable est cependant observée. Par exemple, parmi les premiers patients décrits, sur les 6 porteurs de la mutation, seuls 3 d'entre eux présentaient une fibrose pulmonaire ([Liu, 2014](#)), de la même façon que tous les patients diagnostiqués jusqu'à présent ne présentent pas tous d'atteinte cutanée. On peut émettre plusieurs hypothèses pour expliquer cette différence de phénotype entre les patients et notre modèle murin : des facteurs environnementaux, des effets différents de la signalisation de STING entre l'Homme et la souris, ou encore une différence d'expression de STING dans différents types cellulaires, comme par exemple dans les progéniteurs médullaires. En outre, Liu et collègues ont pu observer que STING est exprimé notamment dans les monocytes, mais aussi de manière importante dans les LT et les cellules NK, mais n'est pas exprimé dans les neutrophiles et les LB ([Liu, 2014](#)). Il semblerait cependant que chez la souris, on retrouve cette protéine exprimée aussi dans les LB (d'après nos résultats, et d'après les analyses transcriptomiques disponibles sur www.Immgen.org). Par ailleurs, d'après Immgen, l'expression de STING dans les granulocytes est quasiment nulle, comme chez l'Homme. Ainsi, l'expansion de la population granulocytaire n'est probablement pas corrélée à une forte expression de Sting dans cette population, mais pourrait être plutôt due à un mécanisme compensatoire à la lymphopénie. L'analyse de l'expression de Sting dans des granulocytes triés par RT-PCR quantitative serait intéressante afin de confirmer le degré d'expression de Sting dans les granulocytes murins.

Notre modèle se caractérise par un phénotype cependant bien plus sévère, sur certains aspects, que celui observé chez les patients SAVI puisque la souris STING V154M/WT développe un SCID sévère accompagné d'une mortalité élevée. Il semblerait qu'une petite proportion de patients SAVI présentent cependant de la même façon un SCID (avec lymphopénie T, B et NK), mais ceci n'est ni commun ni représentatif du SAVI. Comme mentionné plus haut, ceci peut s'expliquer par une

		PATIENTS SAVI	MODELE MURIN V154M/WT	MODELE MURIN N153S/WT
MINIATURE		Hétérozygote	Hétérozygote	Hétérozygote
PHENOTYPE CLINIQUE	Étiologie	Maladie auto-immune à l'origine de lésions immunitaires	Maladie auto-immune à l'origine de lésions immunitaires	Maladie auto-immune à l'origine de lésions immunitaires
	Race	?	Légère Foxes + Inflammation locale	?
	Path	Maladie auto-immune à l'origine de lésions immunitaires	?	?
PHENOTYPE IMMUNITAIRE	Pathologie	Sécheresse buccale, périostite, atrophie rétrobulbaire, atrophie	Pathologie auto-immune à l'origine de lésions immunitaires	Pathologie auto-immune à l'origine de lésions immunitaires
	CD4	?	?	?
	CD8	?	?	?
	CD19	?	?	?
ORGANES LYMFOIDES PRIMAIRES	Thymus	?	?	?
	Moelle osseuse	?	?	?
MODELE CHIMERIQUE OU TRANSFERT NON COMPÉTITIF DE MUCOS		?	?	?
ANTICORPS		Hyperlipémie, IgG normales	?	?
AUTO ANTICORPS		?	?	?
CYTOKINES		?	?	?
PHENOTYPES DES LEUCOCYTES MAJURES - Jeunes		?	?	?
IFN	IFN	Signature IFN normale	Signature IFN normale	Signature IFN normale
	IFN	Signature IFN normale	Signature IFN normale	Signature IFN normale
MOUDES SPECIFIQUES	STING	Signature IFN normale	Signature IFN normale	Signature IFN normale
	STING	Signature IFN normale	Signature IFN normale	Signature IFN normale

Tableau 11 : Principales caractéristiques des patients SAVI et des modèles murins V154M et N153S

expression différente de STING entre l'Homme et la souris, ou des différences dans sa signalisation, pouvant alors amener à des partenaires ou gènes cibles différents et conduire alors à un effet toxique plus important chez la souris, ou non réversé par des mécanismes compensatoires pouvant exister chez l'Homme.

Outre le SCID, l'une des caractéristiques remarquables de notre modèle est la présence d'une hypogammaglobulinémie (quasi absence d'IgM et d'IgG, et absence d'IgA). Au contraire, les patients présentent une hypergammaglobulinémie G et A, avec cependant un taux d'IgM normal. Cette hypergammaglobulinémie est retrouvée d'ailleurs dans un second modèle murin gain de fonction de STING que nous développerons plus bas (**Tableau 12**) ([Warner, 2017](#)). Cette différence majeure peut s'expliquer par le rôle inattendu de STING dans le développement hématopoïétique observé dans notre modèle V154M, compte tenu du fait que la mutation V154M est responsable à la fois d'un blocage au niveau de la lignée B, diminuant de ce fait le nombre de LB en périphérie, mais aussi de la lignée T, apportant de ce fait une aide moindre aux LB.

Comme mentionné plus haut, un papier récent, descriptif d'une autre mutation affectant STING (N154S chez l'Homme, N153S chez la souris) et conduisant à un gain-de-fonction de la protéine, reproduit de la même façon certains traits phénotypiques sans pour autant être tout à fait identique à la maladie. Ils retrouvent, à l'identique de notre modèle, une diminution des LT et des cellules NK avec expansion des cellules myéloïdes. Cette diminution importante des LT CD4+ et CD8+ (plus importante pour les LT CD8+, à l'identique de notre modèle) peut s'expliquer notamment par une diminution du nombre de thymocytes, entraînant une diminution des précurseurs des LT, les DN. Cependant, alors que j'ai pu observer dans notre modèle un blocage du développement thymique au stade DN2, Warner et collaborateurs n'ont pas pu mettre en évidence de blocage de développement à un stade particulier. Ils ont cependant confirmé que les défauts imputés aux LT étaient intrinsèques et non liés au stroma, au moyen d'un modèle chimérique (transfert compétitif de moelle osseuse). De la même façon, grâce à un transfert non-compétitif de moelle osseuse, j'ai pu confirmer que les défauts observés dans les LB et les LT étaient intrinsèques aux cellules hématopoïétiques (**Tableau 12**). Néanmoins il reste à confirmer une éventuelle implication additionnelle du stroma puisque deux mois après transfert de moelle osseuse de cellules issues de STING V154M/WT dans des souris WT irradiées, il semblerait néanmoins que les taux de LT soit diminué.

Un microenvironnement altéré peut en effet conduire à une aplasie médullaire, due à une diminution de la prolifération et de l'adhérence des cellules stromales, responsable de la différenciation des cellules hématopoïétiques ([Smith, 2016](#)).

Afin d'étudier plus en détails le développement lymphopoïétique et le blocage observé dans les souris STING V154M/WT, j'ai mis en place des expériences de co-culture de cellules médullaires immatures avec des cellules stromales dites OP9 dérivées de la moelle osseuse. Ces expériences ont pu mettre en évidence que les lignées B et T présentent, comme observé *ex vivo*, un blocage dès les premiers stades de différenciation, confirmant l'origine hématopoïétique du défaut. Cependant, pour les LT, comme mentionné plus haut, des défauts au niveau des niches thymiques, et/ou un manque de facteurs de différenciation tels que l'IL-7 ou Notch chez les souris STING V154M/WT pourraient également être envisagés. Ceci pourrait alors engendrer alors la mise en place d'un environnement défavorable aux cellules hématopoïétiques puisqu'on observe une augmentation de la mortalité cellulaire dans ces organes lymphoïdes primaires. En outre, la cellularité est fortement abaissée à la fois dans la moelle osseuse et le thymus, ce dernier n'étant quasiment plus que résiduel chez les STING V154M/WT. Tout ceci amène effectivement à se questionner sur le rôle de STING, outre dans le développement hématopoïétique, dans la mise en place des organes lymphoïdes primaires, le phénotype des cellules stromales et leur aptitude à permettre la différenciation des HSCs.

Il paraît cependant étonnant de ne constater, *a priori*, aucun défaut au niveau des cellules les plus précoces (HSCs, MPP, CLP et CMP), laissant supposer une expression différentielle de STING dans ces cellules. D'après notre analyse de l'expression de STING sur les progéniteurs par cytométrie chez la souris sauvage, il semble que l'expression de Sting soit faible au stade CLP, en comparaison aux stades débutant la lignée T (DN1) et B (pro-préB). Par ailleurs, il pourrait également y avoir une différence d'expression de STING entre les progéniteurs médullaires humains et murins, qui pourrait en partie expliquer les différences observées entre le phénotype des patients SAVI et celui de notre modèle murin.

Compte tenu des résultats obtenus sur Notch dans les souris STING V154M/WT, et son rôle dans le développement intra-thymique, il sera intéressant de compléter cette étude préliminaire par l'analyse de l'expression des gènes cibles de Notch, tels que ceux codant pour GATA3, t-Bet ou IL-4, afin de mieux comprendre l'implication d'une dérégulation de Notch dans le phénotype des souris STING V154M/WT.

Une analyse plus poussée, telle qu'une analyse transcriptomique réalisée aux stades de développement auxquels le blocage est le plus important, serait à envisager afin d'étudier plus en détails le blocage développemental observé dès les premiers stades de différenciation des progéniteurs des souris STING V154M/WT.

Rôle des IFN I dans le phénotype observé

Il était par ailleurs intéressant de s'intéresser de plus près aux rôles des IFN I dans le phénotype des souris, puisqu'une amplification de leur production est l'une des conséquences de l'activation constitutive de STING chez les patients SAVI et dans notre modèle murin. L'étude du rôle des IFN I (et comme nous le développerons plus tard) est important tant par leur impact sur le développement et l'homéostasie médullaire, que par leur impact potentiel sur l'expansion de cellules myéloïdes observée en périphérie.

En effet, Buechler et collègues ont pu démontrer, grâce au modèle lupique murin surexprimant le TLR7 (souris TLR7.1), que ces souris présentaient une expansion massive de cellules myéloïdes en périphérie. Cette expansion était provoquée par l'émergence d'une sous-classe cellulaire issue du GMP, et provoquée par la sécrétion massive d'IFN I. En effet, dans leur modèle, les pDCs activées par la surexpression du TLR7 produisent d'importantes quantités d'IFN I de manière constitutive, promouvant alors le développement des GMP. Un défaut de sécrétion d'IFN I limite au contraire le développement des cellules myéloïdes (Buechler, 2013). Il est donc envisageable que la sécrétion constitutive d'IFN I, en réponse au gain-de-fonction de STING, soit responsable de l'expansion des populations myéloïdes en périphérie. Les IFN I sont d'autre part responsables de la sortie de quiescence des HSCs afin d'induire leur prolifération et différenciation. Cependant, dans des conditions physiologiques, ces cellules retournent ensuite à l'état quiescent afin d'éviter une exposition prolongée aux IFN I qui conduirait à leur apoptose (De Bruin, 2014). Il a en outre été observé que les IFN I peuvent être responsables d'une atteinte de la moelle osseuse conduisant alors à une aplasie médullaire et une cytopénie, notamment en cas d'infection virale. Cette aplasie de la moelle osseuse peut être à la fois due à l'atteinte des cellules hématopoïétiques par le virus, et à la mise en place de la réponse anti-virale, responsable de la production massive d'IFN I et de cytokines pro-inflammatoires (Smith, 2016).

Il est étrange de constater qu'une production exagérée d'IFN I est responsable de tels dégâts quand une sécrétion constitutive est nécessaire à la mise en place de niches des HSCs, à une régulation optimale de la résorption osseuse et au maintien d'une homéostasie leucocytaire.

En outre, il a déjà été constaté qu'un traitement oral par IFN (IFN2a, qui était administré dans certains cas d'atteintes virales telles que les hépatites B et C, ou dans certains cas de cancers comme le mélanome) était responsable chez les patients d'une hypoplasie médullaire, thrombocytopénie et anémie (Hoffman, 1994).

Afin de vérifier l'implication des IFN I dans notre phénotype, j'ai croisé les souris STING V154M/WT avec des souris déficientes pour le récepteur aux IFN I, appelées IFNAR KO. De manière intéressante,

je n'ai pas constaté, chez ces animaux STING V154M/WT / IFNAR KO, de réversion du phénotype au niveau du pourcentage de lymphocytes matures en périphérie. Un marquage des cellules souches serait à réaliser dans des souris STING V154M/WT / IFNAR KO afin de vérifier les proportions des progéniteurs les plus précoces tels que les HSCs et MPP. Ainsi, que ce soit concernant le phénotype SCID ou l'expansion des populations myéloïdes, ni l'un ni l'autre n'est réversé dans des STING V54M/WT / IFNAR KO, montrant ainsi un phénotype indépendant des IFN I. Certains traits mineurs du phénotype, comme le défaut de prolifération ou la mortalité augmentée des LT matures, sont cependant partiellement IFN I dépendants. Ceci peut s'apparenter par exemple à ce qui a été observé dans le cas de l'infection par le VIH, où une surproduction d'IFN α par les pDCs entraînait une augmentation de l'expression de TRAIL (pour *TNF-related apoptosis-inducing ligand*) sur les LT CD4+ et conduisait alors à l'augmentation de la mortalité de ce type cellulaire (Herbeuval, 2005). Les défauts observés dans les LB matures ne semblent, quant à eux, pas être dépendant des IFN I. Il serait donc intéressant d'étudier quelle(s) voie(s) alternative(s) serai(en)t régulée(s) par STING et occasionnerai(en)t le phénotype observé (voir plus loin). De plus, il n'a pas été possible de faire une quelconque corrélation entre l'expression de STING et la distribution cellulaire des cellules sécrétrices d'IFN I. De très nombreux types cellulaires sont en effet capables de sécréter des IFN I (les pDCs étant les principales sécrétrices d'IFN α), néanmoins, STING étant exprimé de façon homogène et relativement ubiquitaire, aucun pic d'expression n'est visible pour un type cellulaire sécréteur d'IFN I en particulier (www.lmmgen.org).

L'IFN γ pourrait jouer lui aussi un rôle dans le phénotype observé dans les souris STING V154M/WT. Les effets observés dans notre modèle tendent à le supposer, puisqu'après des analyses multiplex permettant le dosage de 13 cytokines anti- et pro-inflammatoires, j'ai pu observer une augmentation de la concentration d'IFN γ (2,1 pg/mL chez les souris WT vs 10,2 pg/mL chez les souris STING V154M/WT). D'autre part, l'un des gènes faisant partie de notre signature IFN, *Cxcl10*, est induit, outre par les IFN I, par l'IFN II.

Il est actuellement connu que l'IFN γ altère de façon importante l'hématopoïèse en facilitant la différenciation des HSCs et empêchant leur auto-renouvellement. En conséquence, ces HSCs entrent dans un phénotype exhaustif et ne permettent plus la production de cellules hématopoïétiques. L'action inhibitrice de l'IFN γ est dépendante d'une exposition chronique (De Bruin, 2014). Or, compte tenu du fait que cette cytokine est majoritairement produite par les cellules NK et les LT activés (ainsi que par les cellules stromales), et que les LT des souris STING V154M/WT sont constitutivement activés, il n'est pas improbable qu'ils soient responsables d'une sécrétion continue à la fois d'IFN I et II.

Comme mentionné plus haut, j'ai pu observer dans notre modèle murin STING V154M/WT une anémie et, de façon cohérente, une diminution des progéniteurs des érythrocytes (pro-érythroblastes, érythroblastes). Nous avons supposé que cela pouvait être secondaire à l'inflammation observée dans notre modèle. Cela pourrait aussi être dû à une surexpression d'IFN γ qui perturberait l'homéostasie érythrocytaire en inhibant les premiers stades de différenciation des érythrocytes mais aussi en augmentant l'hémophagocytose par les macrophages activés par l'IFN γ (De Bruin, 2014). En effet, des souris transgéniques exprimant un dominant négatif pour IFNGR, et ainsi produisant des macrophages insensibles à l'IFN γ , ne présentent pas d'hémophagocytose (Zoller, 2011).

Une publication récente a d'ailleurs mis en évidence le fait que l'expression de STING pouvait être régulée par l'IFN γ via STAT1, dans les kératinocytes humains (Nishikawa, 2018). Il n'est donc pas impossible que l'on se retrouve face à une boucle d'autoamplification. L'IFN γ serait sécrété par les LT activés par STING V154M à l'état basal, qui permettrait ensuite à son tour d'activer STING. Il serait donc intéressant de s'intéresser plus en détails à l'IFN γ et son lien avec STING, par exemple via l'étude de souris KO pour le récepteur à cette cytokine (IFNGR). Il pourrait par ailleurs être intéressant de vérifier l'expression de l'IFNGR dans les LT en particulier, mais aussi dans les LB, puisque le phénotype observé dans ces cellules est IFN I indépendant. Bien que les IFN aient un rôle important dans l'aplasie de la moelle osseuse, et compte tenu du fait que le phénomène n'est pas réversé dans les souris STING V154M/WT / IFNAR KO, il est probable qu'il y ait un effet purement intrinsèque au gain de fonction de STING.

En effet, un papier récent a pu montrer, en mimant une infection bactérienne par injection de c-di-GMP dans un modèle murin (donc une activation de STING), que cette injection était responsable d'une diminution du nombre de progéniteurs médullaires. De plus, ce traitement au c-di-GMP diminue les capacités de repopulation via transfert de moelle WT dans des souris WT irradiées, alors que des souris STING KO greffées par une moelle osseuse WT, et traitées au c-di-GMP, présentent une repopulation comparable aux contrôles. Ceci implique donc directement STING dans l'hématopoïèse (Kobayashi, 2015).

De la même façon que dans notre modèle STING V154M/WT, Kobayashi et collaborateurs ont pu observer que l'administration de c-di-GMP à des souris engendrait chez ces dernières une diminution du nombre de globules blancs, plaquettes et du taux d'hémoglobine, et une diminution de la proportion de lymphocytes avec en conséquence une augmentation des populations myéloïdes.

Cependant, contrairement à notre modèle, Kobayashi et collaborateurs ont suggéré que cette diminution du nombre de HSC n'était pas attribuable à une augmentation de l'apoptose. J'ai pu constater le contraire grâce à un marquage par annexine V dans nos progéniteurs. De plus, ce

phénomène était compensé par une augmentation de la prolifération des progéniteurs (CLP, pro-preB et LB immatures, ainsi que l'ETP et les cellules DN), que j'ai mise en évidence au moyen d'un marquage au BrdU. Ceci suggère alors que le gain-de-fonction STING est responsable d'effet plus délétère qu'une activation au c-di-GMP, ce qui paraît cohérent compte tenu du fait que la mutation V154M est responsable d'une activation constitutive de la protéine.

Quelles voies alternatives à celles des IFN pourraient être activées dans les souris STING V154M/WT ? Une des voies impliquées pourrait être la voie NF- κ B, avec sécrétion importante de cytokines pro-inflammatoires, comme nous avons pu le constater dans notre modèle. De plus, il semblerait que la voie Akt, cruciale pour la prolifération et la survie cellulaire, soit affectée, au moins dans les cellules matures. Il pourrait donc être particulièrement intéressant d'étudier en détails les voies et partenaires impliqués. Ceci pourrait être réalisé par des analyses individuelles par Western-Blot (voie par voie), ou par la technique CyTOF, ou encore au moyen de membranes de Western-Blot multiarray, coatées pour permettre la détection de nombreuses protéines phosphorylées. Par ailleurs, nous avons recherché parmi les DIP aujourd'hui décrits chez l'Homme lesquels pouvaient avoir un phénotype proche de celui des souris STING V154M/WT, afin d'en approcher le mécanisme. Le seul que nous avons noté est le déficit en ADA (**voir Partie V II-2. SCID T-B-NK-, page 94**). En effet, les patients présentent un taux bas de LT, de LB et de NK et d'anticorps. Cependant les patients présentent également une hyperéosinophilie sévère que nous n'avons pas observée dans nos souris.

Rôle de Sting dans le développement des ganglions lymphatiques et rôle des LTI

Outre l'effet observé sur les populations matures en périphérie, nous avons pu constater que nos souris STING V154M/WT ne présentaient aucun ganglion lymphatique, ni plaque de Peyer. Ceci a été vérifié par coloration au bleu Evans après injection dans les pattes et les oreilles. Ce défaut développemental pourrait s'expliquer par une absence de LTI, cellules à l'origine de l'organogénèse des structures lymphoïdes, et issues du CLP au niveau médullaire. Bien qu'aucun défaut dans cette population en particulier (CLP) n'ait été observé, un blocage apparaît dès l'entrée dans la lignée B (stade pré-proB). Nous pourrions alors supposer qu'un défaut développemental pourrait aussi impacter l'ontogénie des ILCs, notamment en raison de l'absence de cellules NK, membre des ILC1 et issues du CLP.

En outre, des souris KO pour STING présentent, à l'inverse de nous et de façon cohérente, une fréquence augmentée d'ILC1 et 3 et une diminution des ILC2 ([Canesso, 2017](#)).

Cependant, alors que les cellules NK possèdent leur propre progéniteur (pNK, issu directement du CLP, sans intermédiaire par l'ILCP), les ILC sont issues de l'ILCP, lui-même issu du CLP (**voir Partie IV, II-3. Les lymphocytes innés, page 89**). Un marquage de ce progéniteur ainsi que des autres ILCs serait à envisager afin de comprendre ce défaut développemental dans l'organogénèse des ganglions.

J'ai commencé des tests afin de déterminer l'âge optimal des souris permettant de marquer les LT_i, puisque les ganglions se développent au stade embryonnaire et finissent leur maturation quelques semaines après la naissance. Ces LT_i nécessitent en outre un signal particulier pour se développer, via la lymphotoxine alpha/beta (LT α 1 β 2), forme membranaire d'association de LT α et de LT β . Kruglov et collaborateurs ont en effet pu mettre en évidence une absence de ganglions lymphatiques chez des animaux déficients dans la voie de la LT α ou de la LT β (Kruglov, 2013). Des résultats préliminaires de PCR quantitative en temps réel semblent d'ailleurs montrer une expression diminuée de la LT α dans des LT matures triés de nos souris STING V154M/WT comparé aux souris WT (X-fold de 1.02 pour les souris WT littermate, vs 0.4 pour les LT de STING V154M/WT, n=2 dans chaque groupe).

En outre, cette absence de LT_i pourrait être à l'origine non seulement d'un défaut d'organogénèse des ganglions lymphatiques et plaques de Peyer, mais aussi d'une absence des LT CD4⁺ mémoires (comme observé chez les patients SAVI) et d'une défense incomplète contre des pathogènes au niveau intestinal en raison d'un défaut de sécrétion des IgA. Il n'a pas été possible de détecter des IgA chez les souris STING V154M/WT, à la fois au niveau sérique, mais aussi au niveau intestinal, dosage effectuée au moyen d'un lavage intestinal (données non montrées).

Or, la production d'IgA est en effet cruciale dans la défense de l'organisme contre les pathogènes intestinaux. L'IgA peut être directement sécrétée (sans aide de la part des LT) par les cellules B1 situés dans la cavité péritonéale, mais aussi de façon T-dépendante dans les plaques de Peyer. En cas d'absence de LT_i (liée ou non à une absence de LT α β), l'organogénèse des plaques de Peyer est bloquée et la sécrétion d'IgA en est alors fortement impactée. Concernant la sécrétion d'IgA indépendante des LT, il semblerait que cette dernière soit elle aussi régulée par la LT α β exprimée par les ILCs (Kruglov, 2013).

De plus, Kruglov et collègues purent mettre en évidence que cette LT α β contrôlerait aussi la composition du microbiote, son absence impactant fortement sur la défense de l'hôte contre des pathogènes intestinaux (Kruglov, 2013). En effet, Lane et collaborateurs mirent une fois encore en évidence l'importance des LT_i dans la défense intestinale, qui seraient l'origine de la formation de cryptopatches nécessaires à cette défense. Les cryptes de l'intestin sont les lieux de formation de cellules épithéliales nécessaires à la création de la barrière intestinale. Leur génération dépend de signaux et notamment de l'interaction entre la chimiokine CCL20 (sécrétée par les cellules

épithéliales) permettant d'attirer les LTI (exprimant son récepteur, CCR6). Proches de ces cryptes se situent des cryptopatches, des regroupements de cellules composés de LTI et de DCs. Ces LTI peuvent sécréter de l'IL-17 suite à une stimulation par les DCs après détection de pathogènes intestinaux (Lane, 2012). Une absence de LTI pourrait donc résulter en une défense très amoindrie de l'hôte contre des pathogènes intestinaux.

Enfin, Kim et collaborateurs mirent en évidence le fait que la maintenance des LT CD4+ mémoires, permettant une défense appropriée contre des infections bactériennes, dépendait de signaux membranaires délivrés notamment par les LTI (via OX40 et CD30). Un défaut d'expression de l'OX40L et du CD30L sur les LTI serait alors responsable d'une réponse immunitaire mémoire dépendante des LT CD4+ altérée dans la rate et l'intestin (Kim, 2009).

De plus, il est aujourd'hui connu que la défense de l'embryon (et du nouveau né) contre des pathogènes résulte dans la transmission de la mère à l'enfant d'IgG de haute affinité. Ce transfert de réponse immunitaire mémoire est rendu possible via les LT CD4+ mémoires, qui seraient absents en cas de défaut de LTI (Lane, 2012). Il serait ainsi raisonnable de penser qu'en l'absence de défense immunitaire liée à un défaut de LB mais aussi de LT chez la mère, l'embryon serait incapable de survivre. Concernant notre modèle, je n'ai jamais réussi à obtenir de petits issus de femelles STING V154M/WT (les portées ne provenaient alors que de mâles STING V154M/WT croisés avec des femelles WT) et en conséquence, il n'a jamais été possible non plus d'obtenir d'animaux homozygotes. Il pourrait ne pas s'agir de stérilité dans le cas de nos souris STING V154M/WT mais d'un avortement *in utero* impliquant alors STING dans l'embryogénèse. Ainsi, il serait intéressant de vérifier les fonctions ovariennes des souris pour confirmer ou infirmer cette hypothèse. De la même façon, dans le second modèle mentionné précédemment (N153S), Warner et collaborateurs ont pu observer que l'homozygotie était létale dans leur modèle, et que les petits (qu'ils soient homozygotes ou hétérozygotes pour la mutation) issus des femelles STING N153S ne survivaient pas à la gestation. Il a par ailleurs été démontré que la signalisation de Notch, que l'on sait altérée dans notre modèle murin, est fortement impliquée et nécessaire à la différenciation des HSC. En effet, une surexpression de NICD dans les cellules souches embryonnaires murines conduit à une augmentation de la différenciation des HSCs au cours de la différenciation des corps embryoïdes, amas sphériques de cellules simulant *in vitro* la gastrulation qui permet la mise en place des feuillettes embryonnaires (De la Garza, 2017 ; Butko, 2016). L'on pourrait donc penser que STING, de par son action sur la voie Notch, entraîne alors des défauts au cours de l'embryogénèse, empêchant la mise en place de l'embryon dans l'utérus et ainsi responsable d'une stérilité chez les femelles porteuses de la mutation.

Rôle du stress du RE

De nombreuses publications, dont la nôtre, ont pu mettre en évidence, en cas de gain de fonction de STING, des défauts plus importants dans les LT par rapports aux autres types cellulaires (Cerberoni, 2017 ; Larkin, 2018 ; Warner, 2017 ; Bouis, 2018).

Nous avons en effet observé une diminution drastique des LT CD4+ et LT CD8+, beaucoup plus importante que celle observée pour les LB. Cette diminution est corrélée avec une augmentation de l'apoptose des LT ainsi qu'un défaut de prolifération. Larkin et collaborateurs ont d'ailleurs pu observer, après séquençage d'ARN, une augmentation des voies d'apoptose et de la cascade de signalisation des caspases suite à la stimulation de STING dans les LT par du DMXAA. Ils ont conclu à une induction de la voie de l'UPR (avec importante surexpression de gènes impliqués dans l'UPR) et un échec pour ces cellules à résoudre le stress du RE occasionné. Ceci conduit ainsi à une augmentation de la mortalité cellulaire, et serait une réponse spécifique aux LT, en plus de la voie canonique permettant de produire les IFN I (Larkin, 2018).

Il serait ainsi intéressant de s'intéresser de plus près au stress du RE, en premier lieu par cytométrie en flux avec marquage des membranes du RE (au moyen de l'ER tracker), afin de vérifier si les LT issus de nos souris STING V154M/WT présentent une expansion de la taille de cette organelle. Dans un second temps, nous pourrions vérifier l'expression des gènes de l'UPR (comme par exemple ceux codant pour IRE-1 α , ATF6, PERK, XBP1, Bip et CHOP) par PCR quantitative en temps réel dans des LT triés. En outre, un stress du RE a déjà été associé à STING, comme mécanisme de défense suite à une infection par des bactéries Gram+. Cette voie passerait par une inactivation de mTOR, responsable alors de l'activation de l'UPR (Moretti, 2017). Il est intéressant de constater que les souris STING V154M/WT présentent une diminution de l'expression de Akt, à l'origine de l'activation de mTOR. Il est donc envisageable que l'activation constitutive de STING dans notre modèle soit responsable d'un stress important du RE, probablement non-résolu comme le suggère Larkin et collaborateurs (Larkin, 2018).

Rôle du microbiote

Enfin, j'ai pu observer dans notre modèle une inflammation au niveau pulmonaire et rénal, bien que la pénétrance soit variable, puisque seuls 45% et 27% des animaux STING V154/WT sont touchés, respectivement. Cette variabilité est retrouvée chez les patients SAVI. En effet, il est important de noter que certaines manifestations du SAVI chez l'Homme sont caractérisées par une pénétrance variable, puisque certains patients, en plus d'une vasculopathie, ont une atteinte pulmonaire associée à une inflammation chronique sévère. D'autres présentent au contraire un phénotype

cutané plus important avec lésions ulcérales. Les cas les plus sévères cependant sont associés à des mutations *de novo* (par rapport aux cas familiaux) (Liu, 2014 ; Jeremiah, 2014 ; Munoz, 2015 ; Omoyimni, 2015 ; Fremont, 2016 ; Picard, 2016 ; Clarke, 2016 ; Konig, 2015).

Néanmoins nous n'avons observé aucune fibrose pulmonaire ou lésion ulcérales chez nos souris.

Des facteurs environnementaux pourraient être à l'origine d'une telle variabilité dans notre modèle STING V154M/WT. En effet, il a déjà été décrit une forte influence du microbiote sur la voie STING, qui pourrait expliquer les différences observées non seulement avec les patients SAVI, mais aussi avec le second modèle murin N153S (Warner, 2017). Nos souris ont en effet été traitées par l'antibiotique enrofloxacin, compte tenu de leur forte mortalité. Ce traitement a amélioré leur survie. Une désorganisation de la flore commensale chez les souris STING V154M/WT pourrait ainsi impacter fortement sur le phénotype observé. Des différences de microbiote pourraient expliquer une amélioration de la survie de nos animaux, favorisée par le traitement antibiotique. De plus, nous avons transféré la lignée STING V154M/WT dans une animalerie ayant un statut sanitaire plus propre (animalerie SOPF, pour specific and opportunistic pathogen free, Orléans) que l'animalerie conventionnelle de notre institut. Dans ce nouvel environnement SOPF, les souris STING V154M/WT conservent le phénotype SCID, moins sévère cependant (avec une proportion et un nombre plus importants de LB et légèrement plus de LT), et leur survie est largement améliorée, et ceci sans traitement antibiotique (données non publiées). Ceci constitue un autre argument en faveur de l'impact de l'environnement sur le phénotype SCID des souris STING V154M/WT.

En outre, l'importance du microbiote dans le développement et la maintenance d'un système immunitaire efficace a déjà été démontré, notamment parce que les tissus du tractus gastro-intestinal comptent plus de cellules immunitaires que l'ensemble des tissus lymphoïdes secondaires. De plus, cette homéostasie intestinale est, entre autres, régulée par les LT régulateurs (Littman, 2011 ; Franklin, 2017). Les souris STING V154M/WT présentant un nombre très abaissé de LT CD4⁺ (et donc de Treg), on peut ainsi penser qu'un cercle vicieux se met en place : une altération du microbiote aggravant le phénotype observé, et les conséquences du SCID responsables de la dysbiose intestinale.

Lignée STING V154M/WT « rescued »

Enfin, nous avons pu remarquer au cours de nos recherches, qu'au moment de la redérivation de la lignée vers la seconde animalerie mentionnée plus haut (SOPF, CDTA, Orléans), une autre « lignée » a pu émerger. En effet, j'ai constaté lors des phénotypages effectués sur les animaux SOPF, que

certaines d'entre eux, bien que possédant la mutation dans l'ADN génomique, présentaient un phénotype similaire aux WT contrôles. Ces souris (que nous avons appelées « rescued ») ne sont d'une part plus stériles pour les femelles, ne présentent pas de SCID, produisent des anticorps (IgM et IgG totales) et n'ont pas de signature IFN. Par séquençage, nous nous sommes rendus compte que, bien que la mutation W154M soit présente dans l'ADN génomique, celle-ci n'était pas exprimée et donc non retrouvée lors du séquençage de l'ADN complémentaire. Ce phénomène de réversion du phénotype est intéressant puisqu'il montre que le phénotype SCID est directement dépendant de l'expression de la mutation V154M. De plus, il pourrait mettre en jeu des mécanismes épigénétiques, permettant uniquement à l'allèle WT d'être exprimé. Nous n'avons pas observé dans la région promotrice du gène *Sting* d'empreintes spécifiques de méthylation. Une étude approfondie serait nécessaire afin de comprendre les mécanismes mis en jeu pour n'exprimer que l'allèle WT et non le muté.

Conclusion générale

Bien que le phénotype de la souris STING V154M/WT ne récapitule pas complètement la pathologie humaine SAVI, notre modèle est intéressant afin de comprendre plus en détails le rôle de STING dans le développement lymphocytaire, dans la fonction des lymphocytes matures, ainsi que dans le développement ganglionnaire. Ainsi, ce modèle peut aider à la compréhension des mécanismes mis en jeu, à la fois dans la lymphopénie observée chez les patients SAVI, mais aussi au développement de SCID chez certains d'entre eux. Cela pourrait aussi bénéficier à la compréhension de pathologies de type SCID chez l'Homme, dont les mécanismes ne seraient pas encore connus.

BIBLIOGRAPHIE

- **Abe, J., Izawa, K., Nishikomori, R., Awaya, T., Kawai, T., Yasumi, T., Hiragi, N., Hiragi, T., Ohshima, Y., and Heike, T.** (2013). Heterozygous TREX1 p.Asp18Asn mutation can cause variable neurological symptoms in a family with Aicardi-Goutieres syndrome/familial chilblain lupus. *Rheumatology* 52, 406-408.
- **Abe, T., and Barber, G.N.** (2014). Cytosolic-DNA-mediated, STING-dependent proinflammatory gene induction necessitates canonical NF-kappaB activation through TBK1. *Journal of virology* 88, 5328-5341.
- **Abe, T., Harashima, A., Xia, T., Konno, H., Konno, K., Morales, A., Ahn, J., Gutman, D., and Barber, G.N.** (2013). STING recognition of cytoplasmic DNA instigates cellular defense. *Molecular cell* 50, 5-15.
- **Ablasser, A., Goldeck, M., Cavlar, T., Deimling, T., Witte, G., Rohl, I., Hopfner, K.P., Ludwig, J., and Hornung, V.** (2013). cGAS produces a 2'-5'-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING. *Nature* 498, 380-384.
- **Ablasser, A., Schmid-Burgk, J.L., Hemmerling, I., Horvath, G.L., Schmidt, T., Latz, E., and Hornung, V.** (2013). Cell intrinsic immunity spreads to bystander cells via the intercellular transfer of cGAMP. *Nature* 503, 530-534.
- **Adolfsson, J., Borge, O.J., Bryder, D., Theilgaard-Monch, K., Astrand-Grundstrom, I., Sitnicka, E., Sasaki, Y., and Jacobsen, S.E.** (2001). Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. *Immunity* 15, 659-669.
- **Aguirre, S., Maestre, A.M., Pagni, S., Patel, J.R., Savage, T., Gutman, D., Maringer, K., Bernal-Rubio, D., Shabman, R.S., Simon, V., et al.** (2012). DENV inhibits type I IFN production in infected cells by cleaving human STING. *PLoS pathogens* 8, e1002934.
- **Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I.L.** (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404, 193-197.
- **Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O.** (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801.
- **Alers, S., Loffler, A.S., Wesselborg, S., and Stork, B.** (2012). Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Molecular and cellular biology* 32, 2-11.
- **Allen, I.C., Moore, C.B., Schneider, M., Lei, Y., Davis, B.K., Scull, M.A., Gris, D., Roney, K.E., Zimmermann, A.G., Bowzard, J.B., et al.** (2011). NLRX1 protein attenuates inflammatory responses to infection by interfering with the RIG-I-MAVS and TRAF6-NF-kappaB signaling pathways. *Immunity* 34, 854-865.
- **Allman, D., Sambandam, A., Kim, S., Miller, J.P., Pagan, A., Well, D., Meraz, A., and Bhandoola, A.** (2003). Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors. *Nature immunology* 4, 168-174.
- **Amsen, D., Blander, J.M., Lee, G.R., Tanigaki, K., Honjo, T., and Flavell, R.A.** (2004). Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell* 117, 515-526.
- **Anand, P.K., Malireddi, R.K., Lukens, J.R., Vogel, P., Bertin, J., Lamkanfi, M., and Kanneganti, T.D.** (2012). NLRP6 negatively regulates innate immunity and host defence against bacterial pathogens. *Nature* 488, 389-393.
- **Apasov, S.G., Blackburn, M.R., Kellems, R.E., Smith, P.T., and Sitkovsky, M.V.** (2001). Adenosine deaminase deficiency increases thymic apoptosis and causes defective T cell receptor signaling. *The Journal of clinical investigation* 108, 131-141.
- **Archer, K.A., Durack, J., and Portnoy, D.A.** (2014). STING-dependent type I IFN production inhibits cell-mediated immunity to *Listeria monocytogenes*. *PLoS pathogens* 10, e1003861.

- **Arimochi, H., Sasaki, Y., Kitamura, A., and Yasutomo, K.** (2016). Dysfunctional immunoproteasomes in autoinflammatory diseases. *Inflammation and regeneration* 36, 13.
- **Balada, E., Selva-O'Callaghan, A., Felip, L., Ordi-Ros, J., Simeon-Aznar, C.P., Solans-Laque, R., and Vilardell-Tarres, M.** (2016). Sequence analysis of TMEM173 exon 5 in patients with systemic autoimmune diseases. *Autoimmunity* 49, 12-16.
- **Barbalat, R., Ewald, S.E., Mouchess, M.L., and Barton, G.M.** (2011). Nucleic acid recognition by the innate immune system. *Annual review of immunology* 29, 185-214.
- **Barbalat, R., Lau, L., Locksley, R.M., and Barton, G.M.** (2009). Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands. *Nature immunology* 10, 1200-1207.
- **Barber, G.N.** (2014). STING-dependent cytosolic DNA sensing pathways. *Trends in immunology* 35, 88-93.
- **Barber, G.N.** (2015). STING: infection, inflammation and cancer. *Nature reviews. Immunology* 15, 760-770.
- **Barker, J.E.** (1994). Sl/Sld hematopoietic progenitors are deficient in situ. *Experimental Hematology* 22(2), 174-177.
- **Barreda, D.R., Hanington, P.C., and Belosevic, M.** (2004). Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. *Developmental and comparative immunology* 28, 509-554.
- **Bauer, B., and Steinle, A.** (2017). HemiTAM: A single tyrosine motif that packs a punch. *Science signaling* 10.
- **Bauernfeind, F., and Hornung, V.** (2013). Of inflammasomes and pathogens--sensing of microbes by the inflammasome. *EMBO molecular medicine* 5, 814-826.
- **Behrendt, R., and Roers, A.** (2014). Mouse models for Aicardi-Goutieres syndrome provide clues to the molecular pathogenesis of systemic autoimmunity. *Clinical and experimental immunology* 175, 9-16.
- **Behrendt, R., Schumann, T., Gerbaulet, A., Nguyen, L.A., Schubert, N., Alexopoulou, D., Berka, U., Lienenklaus, S., Peschke, K., Gibbert, K., et al.** (2013). Mouse SAMHD1 has antiretroviral activity and suppresses a spontaneous cell-intrinsic antiviral response. *Cell reports* 4, 689-696.
- **Bhandoola, A., and Sambandam, A.** (2006). From stem cell to T cell: one route or many? *Nature reviews. Immunology* 6, 117-126.
- **Bilginer, Y., Duzova, A., Topaloglu, R., Batu, E.D., Boduroglu, K., Gucer, S., Bodur, I., and Alanay, Y.** (2016). Three cases of spondyloenchondrodysplasia (SPENCD) with systemic lupus erythematosus: a case series and review of the literature. *Lupus* 25, 760-765.
- **Bose, D.** (2017). cGAS/STING Pathway in Cancer: Jekyll and Hyde Story of Cancer Immune Response. *International journal of molecular sciences* 18.
- **Botos, I., Segal, D.M., and Davies, D.R.** (2011). The structural biology of Toll-like receptors. *Structure* 19, 447-459.
- **Bouis, D., Kirstetter, P., Arbogast, F., Lamon, D., Delgado, V., Jung, S., Ebel, C., Jacobs, H., Knapp, A.M., Jeremiah, N., et al.** (2018). Severe combined immunodeficiency in stimulator of interferon genes (STING) V154M/wild-type mice. *The Journal of allergy and clinical immunology*.
- **Bousfiha, A., Jeddane, L., Picard, C., Ailal, F., Bobby Gaspar, H., Al-Herz, W., Chatila, T., Crow, Y.J., Cunningham-Rundles, C., Etzioni, A., et al.** (2018). The 2017 IUIS Phenotypic Classification for Primary Immunodeficiencies. *Journal of clinical immunology* 38, 129-143.
- **Bousfiha, A.A., Jeddane, L., Ailal, F., Al Herz, W., Conley, M.E., Cunningham-Rundles, C., Etzioni, A., Fischer, A., Franco, J.L., Geha, R.S., et al.** (2013). A phenotypic approach for IUIS PID classification and diagnosis: guidelines for clinicians at the bedside. *Journal of clinical immunology* 33, 1078-1087.

- **Boyd, R.L., Tucek, C.L., Godfrey, D.I., Izon, D.J., Wilson, T.J., Davidson, N.J., Bean, A.G., Ladyman, H.M., Ritter, M.A., and Hugo, P.** (1993). The thymic microenvironment. *Immunology today* 14, 445-459.
- **Bray, S.J.** (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nature reviews. Molecular cell biology* 7, 678-689.
- **Brehm, A., Liu, Y., Sheikh, A., Marrero, B., Omoyinmi, E., Zhou, Q., Montealegre, G., Biancotto, A., Reinhardt, A., Almeida de Jesus, A., et al.** (2015). Additive loss-of-function proteasome subunit mutations in CANDLE/PRAAS patients promote type I IFN production. *The Journal of clinical investigation* 125, 4196-4211.
- **Brubaker, S.W., Bonham, K.S., Zanoni, I., and Kagan, J.C.** (2015). Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annual review of immunology* 33, 257-290.
- **Brunette, R.L., Young, J.M., Whitley, D.G., Brodsky, I.E., Malik, H.S., and Stetson, D.B.** (2012). Extensive evolutionary and functional diversity among mammalian AIM2-like receptors. *The Journal of experimental medicine* 209, 1969-1983.
- **Buechler, M.B., Teal, T.H., Elkon, K.B., and Hamerman, J.A.** (2013). Cutting edge: Type I IFN drives emergency myelopoiesis and peripheral myeloid expansion during chronic TLR7 signaling. *Journal of immunology* 190, 886-891.
- **Bune, A.J., Hayman, A.R., Evans, M.J., and Cox, T.M.** (2001). Mice lacking tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5) have disordered macrophage inflammatory responses and reduced clearance of the pathogen, *Staphylococcus aureus*. *Immunology* 102, 103-113.
- **Burdette, D.L., Monroe, K.M., Sotelo-Troha, K., Iwig, J.S., Eckert, B., Hyodo, M., Hayakawa, Y., and Vance, R.E.** (2011). STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. *Nature* 478, 515-518.
- **Burdette, D.L., and Vance, R.E.** (2013). STING and the innate immune response to nucleic acids in the cytosol. *Nature immunology* 14, 19-26.
- **Bustamante, J., Boisson-Dupuis, S., Abel, L., and Casanova, J.L.** (2014). Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: genetic, immunological, and clinical features of inborn errors of IFN-gamma immunity. *Seminars in immunology* 26, 454-470.
- **Butko, E., Pouget, C., and Traver, D.** (2016). Complex regulation of HSC emergence by the Notch signaling pathway. *Developmental biology* 409, 129-138.
- **Canesso, M.C.C., Lemos, L., Neves, T.C., Marim, F.M., Castro, T.B.R., Veloso, E.S., Queiroz, C.P., Ahn, J., Santiago, H.C., Martins, F.S., et al.** (2018). The cytosolic sensor STING is required for intestinal homeostasis and control of inflammation. *Mucosal immunology* 11, 820-834.
- **Ceredig, R., and Rolink, A.G.** (2012). The key role of IL-7 in lymphopoiesis. *Seminars in immunology* 24, 159-164.
- **Chang, A.N., Cantor, A.B., Fujiwara, Y., Lodish, M.B., Droho, S., Crispino, J.D., and Orkin, S.H.** (2002). GATA-factor dependence of the multitype zinc-finger protein FOG-1 for its essential role in megakaryopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 9237-9242.
- **Chen, L.L., Yang, L., and Carmichael, G.G.** (2010). Molecular basis for an attenuated cytoplasmic dsRNA response in human embryonic stem cells. *Cell cycle* 9, 3552-3564.
- **Chen, Q., Sun, L., and Chen, Z.J.** (2016). Regulation and function of the cGAS-STING pathway of cytosolic DNA sensing. *Nature immunology* 17, 1142-1149.
- **Chen, Y., Hwang, S.L., Chan, V.S., Chung, N.P., Wang, S.R., Li, Z., Ma, J., Lin, C.W., Hsieh, Y.J., Chang, K.P., et al.** (2013). Binding of HIV-1 gp120 to DC-SIGN promotes ASK-1-dependent activation-induced apoptosis of human dendritic cells. *PLoS pathogens* 9, e1003100.
- **Cheng, A., Ross, K.E., Kaldis, P., and Solomon, M.J.** (1999). Dephosphorylation of cyclin-dependent kinases by type 2C protein phosphatases. *Genes & development* 13, 2946-2957.

- **Cheng, P., and Gabrilovich, D.** (2008). Notch signaling in differentiation and function of dendritic cells. *Immunologic research* 41, 1-14.
- **Cheng, P., Nefedova, Y., Corzo, C.A., and Gabrilovich, D.I.** (2007). Regulation of dendritic-cell differentiation by bone marrow stroma via different Notch ligands. *Blood* 109, 507-515.
- **Chia, J., Eroglu, F.K., Ozen, S., Orhan, D., Montealegre-Sanchez, G., de Jesus, A.A., Goldbach-Mansky, R., and Cowen, E.W.** (2016). Failure to thrive, interstitial lung disease, and progressive digital necrosis with onset in infancy. *Journal of the American Academy of Dermatology* 74, 186-189.
- **Chien, Y., Kim, S., Bumeister, R., Loo, Y.M., Kwon, S.W., Johnson, C.L., Balakireva, M.G., Romeo, Y., Kopelovich, L., Gale, M., Jr., et al.** (2006). RalB GTPase-mediated activation of the IkappaB family kinase TBK1 couples innate immune signaling to tumor cell survival. *Cell* 127, 157-170.
- **Chinyengeter, F., Sekula, D.J., Lu, Y., Giustini, A.J., Sanglikar, A., Kawakami, M., Ma, T., Burkett, S.S., Eisenberg, B.L., Wells, W.A., et al.** (2015). Mice null for the deubiquitinase USP18 spontaneously develop leiomyosarcomas. *BMC cancer* 15, 886.
- **Chiu, Y.H., Macmillan, J.B., and Chen, Z.J.** (2009). RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell* 138, 576-591.
- **Ciofani, M., Knowles, G.C., Wiest, D.L., von Boehmer, H., and Zuniga-Pflucker, J.C.** (2006). Stage-specific and differential notch dependency at the alphabeta and gammadelta T lineage bifurcation. *Immunity* 25, 105-116.
- **Ciofani, M., and Zuniga-Pflucker, J.C.** (2005). Notch promotes survival of pre-T cells at the beta-selection checkpoint by regulating cellular metabolism. *Nature immunology* 6, 881-888.
- **Civril, F., Deimling, T., de Oliveira Mann, C.C., Ablasser, A., Moldt, M., Witte, G., Hornung, V., and Hopfner, K.P.** (2013). Structural mechanism of cytosolic DNA sensing by cGAS. *Nature* 498, 332-337.
- **Clarke, S.L., Pellowe, E.J., de Jesus, A.A., Goldbach-Mansky, R., Hilliard, T.N., and Ramanan, A.V.** (2016). Interstitial Lung Disease Caused by STING-associated Vasculopathy with Onset in Infancy. *American journal of respiratory and critical care medicine* 194, 639-642.
- **Coban, C., Ishii, K.J., Kawai, T., Hemmi, H., Sato, S., Uematsu, S., Yamamoto, M., Takeuchi, O., Itagaki, S., Kumar, N., et al.** (2005). Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *The Journal of experimental medicine* 201, 19-25.
- **Colucci, F., Samson, S.I., DeKoter, R.P., Lantz, O., Singh, H., and Di Santo, J.P.** (2001). Differential requirement for the transcription factor PU.1 in the generation of natural killer cells versus B and T cells. *Blood* 97, 2625-2632.
- **Conlon, J., Burdette, D.L., Sharma, S., Bhat, N., Thompson, M., Jiang, Z., Rathinam, V.A., Monks, B., Jin, T., Xiao, T.S., et al.** (2013). Mouse, but not human STING, binds and signals in response to the vascular disrupting agent 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid. *Journal of immunology* 190, 5216-5225.
- **Crow, Y.J.** (2011). Type I interferonopathies: a novel set of inborn errors of immunity. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1238, 91-98.
- **Crow, Y.J.** (2015). Type I interferonopathies: mendelian type I interferon up-regulation. *Current opinion in immunology* 32, 7-12.
- **Crow, Y.J., and Casanova, J.L.** (2014). STING-associated vasculopathy with onset in infancy--a new interferonopathy. *The New England journal of medicine* 371, 568-571.
- **da Silva Correia, J., Miranda, Y., Leonard, N., Hsu, J., and Ulevitch, R.J.** (2007). Regulation of Nod1-mediated signaling pathways. *Cell death and differentiation* 14, 830-839.
- **Darnell, J.E., Jr., Kerr, I.M., and Stark, G.R.** (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264, 1415-1421.

- **Davies, B.W., Bogard, R.W., Young, T.S., and Mekalanos, J.J.** (2012). Coordinated regulation of accessory genetic elements produces cyclic di-nucleotides for *V. cholerae* virulence. *Cell* 149, 358-370.
- **de Bruin, A.M., Voermans, C., and Nolte, M.A.** (2014). Impact of interferon-gamma on hematopoiesis. *Blood* 124, 2479-2486.
- **De La Garza, A., Sinha, A., and Bowman, T.V.** (2017). Concise Review: Hematopoietic Stem Cell Origins: Lessons from Embryogenesis for Improving Regenerative Medicine. *Stem cells translational medicine* 6, 60-67.
- **de Weerd, N.A., and Nguyen, T.** (2012). The interferons and their receptors--distribution and regulation. *Immunology and cell biology* 90, 483-491.
- **de Weerd, N.A., Samarajiwa, S.A., and Hertzog, P.J.** (2007). Type I interferon receptors: biochemistry and biological functions. *The Journal of biological chemistry* 282, 20053-20057.
- **DeFilippis, V.R., Alvarado, D., Sali, T., Rothenburg, S., and Fruh, K.** (2010). Human cytomegalovirus induces the interferon response via the DNA sensor ZBP1. *Journal of virology* 84, 585-598.
- **Dempsey, A., and Bowie, A.G.** (2015). Innate immune recognition of DNA: A recent history. *Virology* 479-480, 146-152.
- **Deng, L., Liang, H., Xu, M., Yang, X., Burnette, B., Arina, A., Li, X.D., Mauceri, H., Beckett, M., Darga, T., et al.** (2014). STING-Dependent Cytosolic DNA Sensing Promotes Radiation-Induced Type I Interferon-Dependent Antitumor Immunity in Immunogenic Tumors. *Immunity* 41, 843-852.
- **Dervovic, D.D., Liang, H.C., Cannons, J.L., Elford, A.R., Mohtashami, M., Ohashi, P.S., Schwartzberg, P.L., and Zuniga-Pflucker, J.C.** (2013). Cellular and molecular requirements for the selection of in vitro-generated CD8 T cells reveal a role for Notch. *Journal of immunology* 191, 1704-1715.
- **Dey, B., Dey, R.J., Cheung, L.S., Pokkali, S., Guo, H., Lee, J.H., and Bishai, W.R.** (2015). A bacterial cyclic dinucleotide activates the cytosolic surveillance pathway and mediates innate resistance to tuberculosis. *Nature medicine* 21, 401-406.
- **Diamond, M.S., Kinder, M., Matsushita, H., Mashayekhi, M., Dunn, G.P., Archambault, J.M., Lee, H., Arthur, C.D., White, J.M., Kalinke, U., et al.** (2011). Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors. *The Journal of experimental medicine* 208, 1989-2003.
- **Ding, L., Dong, G., Zhang, D., Ni, Y., and Hou, Y.** (2015). The regional function of cGAS/STING signal in multiple organs: One of culprit behind systemic lupus erythematosus? *Medical hypotheses* 85, 846-849.
- **Dorhoi, A., Desel, C., Yermeev, V., Pradl, L., Brinkmann, V., Mollenkopf, H.J., Hanke, K., Gross, O., Ruland, J., and Kaufmann, S.H.** (2010). The adaptor molecule CARD9 is essential for tuberculosis control. *The Journal of experimental medicine* 207, 777-792.
- **Doulatov, S., Notta, F., Laurenti, E., and Dick, J.E.** (2012). Hematopoiesis: a human perspective. *Cell stem cell* 10, 120-136.
- **Durbin, J.E., Fernandez-Sesma, A., Lee, C.K., Rao, T.D., Frey, A.B., Moran, T.M., Vukmanovic, S., Garcia-Sastre, A., and Levy, D.E.** (2000). Type I IFN modulates innate and specific antiviral immunity. *Journal of immunology* 164, 4220-4228.
- **Eckard, S.C., Rice, G.I., Fabre, A., Badens, C., Gray, E.E., Hartley, J.L., Crow, Y.J., and Stetson, D.B.** (2014). The SKIV2L RNA exosome limits activation of the RIG-I-like receptors. *Nature immunology* 15, 839-845.
- **Eitel, J., Suttorp, N., and Opitz, B.** (2010). Innate immune recognition and inflammasome activation in *listeria monocytogenes* infection. *Frontiers in microbiology* 1, 149.
- **Erman, B., Bilic, I., Hirschmugl, T., Salzer, E., Cagdas, D., Esenboga, S., Akcoren, Z., Sanal, O., Tezcan, I., and Boztug, K.** (2015). Combined immunodeficiency with CD4 lymphopenia and sclerosing

cholangitis caused by a novel loss-of-function mutation affecting IL21R. *Haematologica* 100, e216-219.

- **Essers, M.A., Offner, S., Blanco-Bose, W.E., Waibler, Z., Kalinke, U., Duchosal, M.A., and Trumpp, A.** (2009). IFN α activates dormant haematopoietic stem cells in vivo. *Nature* 458, 904-908.
- **Fabre, A., Charroux, B., Martinez-Vinson, C., Roquelaure, B., Odul, E., Sayar, E., Smith, H., Colomb, V., Andre, N., Hugot, J.P., et al.** (2012). SKIV2L mutations cause syndromic diarrhea, or trichohepatoenteric syndrome. *American journal of human genetics* 90, 689-692.
- **Famili, F., Wiekmeijer, A.S., and Staal, F.J.** (2017). The development of T cells from stem cells in mice and humans. *Future science OA* 3, FSO186.
- **Fang, R., Wang, C., Jiang, Q., Lv, M., Gao, P., Yu, X., Mu, P., Zhang, R., Bi, S., Feng, J.M., and Jiang, Z.** (2017). NEMO-IKK β Are Essential for IRF3 and NF- κ B Activation in the cGAS-STING Pathway. *Journal of immunology* 199, 3222-3233.
- **Fang, C., Wei, X., and Wei, Y.** (2016). Mitochondrial DNA in the regulation of innate immune responses. *Protein & cell* 7, 11-16.
- **Fenner, J.E., Starr, R., Cornish, A.L., Zhang, J.G., Metcalf, D., Schreiber, R.D., Sheehan, K., Hilton, D.J., Alexander, W.S., and Hertzog, P.J.** (2006). Suppressor of cytokine signaling 1 regulates the immune response to infection by a unique inhibition of type I interferon activity. *Nature immunology* 7, 33-39.
- **Fernandes-Alnemri, T., Yu, J.W., Datta, P., Wu, J., and Alnemri, E.S.** (2009). AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* 458, 509-513.
- **Ferreiros-Vidal, I., Carroll, T., Taylor, B., Terry, A., Liang, Z., Bruno, L., Dharmalingam, G., Khadayate, S., Cobb, B.S., Smale, S.T., et al.** (2013). Genome-wide identification of Ikaros targets elucidates its contribution to mouse B-cell lineage specification and pre-B-cell differentiation. *Blood* 121, 1769-1782.
- **Flinn, A.M., and Gennery, A.R.** (2018). Adenosine deaminase deficiency: a review. *Orphanet journal of rare diseases* 13, 65.
- **Forster, S.C., Tate, M.D., and Hertzog, P.J.** (2015). MicroRNA as Type I Interferon-Regulated Transcripts and Modulators of the Innate Immune Response. *Frontiers in immunology* 6, 334.
- **Franchi, L., Warner, N., Viani, K., and Nunez, G.** (2009). Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunological reviews* 227, 106-128.
- **Franklin, C.L., and Ericsson, A.C.** (2017). Microbiota and reproducibility of rodent models. *Lab animal* 46, 114-122.
- **Freeman, M.** (2008). Rhomboid proteases and their biological functions. *Annual review of genetics* 42, 191-210.
- **Fremond, M.L., Rodero, M.P., Jeremiah, N., Belot, A., Jeziorski, E., Duffy, D., Bessis, D., Cros, G., Rice, G.I., Charbit, B., et al.** (2016). Efficacy of the Janus kinase 1/2 inhibitor ruxolitinib in the treatment of vasculopathy associated with TMEM173-activating mutations in 3 children. *The Journal of allergy and clinical immunology* 138, 1752-1755.
- **Fry, T.J., and Mackall, C.L.** (2005). The many faces of IL-7: from lymphopoiesis to peripheral T cell maintenance. *Journal of immunology* 174, 6571-6576.
- **Fuertes, M.B., Kacha, A.K., Kline, J., Woo, S.R., Kranz, D.M., Murphy, K.M., and Gajewski, T.F.** (2011). Host type I IFN signals are required for antitumor CD8 $^{+}$ T cell responses through CD8 α^{+} dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 208, 2005-2016.
- **Fuertes, M.B., Woo, S.R., Burnett, B., Fu, Y.X., and Gajewski, T.F.** (2013). Type I interferon response and innate immune sensing of cancer. *Trends in immunology* 34, 67-73.

- **Fujiwara, Y., Browne, C.P., Cunniff, K., Goff, S.C., and Orkin, S.H.** (1996). Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 12355-12358.
- **Fukata, M., and Arditi, M.** (2013). The role of pattern recognition receptors in intestinal inflammation. *Mucosal immunology* 6, 451-463.
- **Furr, S.R., Chauhan, V.S., Moerdyk-Schauwecker, M.J., and Marriott, I.** (2011). A role for DNA-dependent activator of interferon regulatory factor in the recognition of herpes simplex virus type 1 by glial cells. *Journal of neuroinflammation* 8, 99.
- **Gall, A., Treuting, P., Elkon, K.B., Loo, Y.M., Gale, M., Jr., Barber, G.N., and Stetson, D.B.** (2012). Autoimmunity initiates in nonhematopoietic cells and progresses via lymphocytes in an interferon-dependent autoimmune disease. *Immunity* 36, 120-131.
- **Gallo, A., Vukic, D., Michalik, D., O'Connell, M.A., and Keegan, L.P.** (2017). ADAR RNA editing in human disease; more to it than meets the I. *Human genetics* 136, 1265-1278.
- **Gao, D., Wu, J., Wu, Y.T., Du, F., Aroh, C., Yan, N., Sun, L., and Chen, Z.J.** (2013). Cyclic GMP-AMP synthase is an innate immune sensor of HIV and other retroviruses. *Science* 341, 903-906.
- **Gao, P., Ascano, M., Wu, Y., Barchet, W., Gaffney, B.L., Zillinger, T., Serganov, A.A., Liu, Y., Jones, R.A., Hartmann, G., et al.** (2013). Cyclic [G(2',5')pA(3',5')p] is the metazoan second messenger produced by DNA-activated cyclic GMP-AMP synthase. *Cell* 153, 1094-1107.
- **Gehrke, N., Mertens, C., Zillinger, T., Wenzel, J., Bald, T., Zahn, S., Tuting, T., Hartmann, G., and Barchet, W.** (2013). Oxidative damage of DNA confers resistance to cytosolic nuclease TREX1 degradation and potentiates STING-dependent immune sensing. *Immunity* 39, 482-495.
- **Geremia, A., and Arancibia-Carcamo, C.V.** (2017). Innate Lymphoid Cells in Intestinal Inflammation. *Frontiers in immunology* 8, 1296.
- **Giliani, S., Mori, L., de Saint Basile, G., Le Deist, F., Rodriguez-Perez, C., Forino, C., Mazzolari, E., Dupuis, S., Elhasid, R., Kessel, A., et al.** (2005). Interleukin-7 receptor alpha (IL-7Ralpha) deficiency: cellular and molecular bases. Analysis of clinical, immunological, and molecular features in 16 novel patients. *Immunological reviews* 203, 110-126.
- **Goldstein, J.L., DeBose-Boyd, R.A., and Brown, M.S.** (2006). Protein sensors for membrane sterols. *Cell* 124, 35-46.
- **Gonugunta, V.K., Sakai, T., Pokatayev, V., Yang, K., Wu, J., Dobbs, N., and Yan, N.** (2017). Trafficking-Mediated STING Degradation Requires Sorting to Acidified Endolysosomes and Can Be Targeted to Enhance Anti-tumor Response. *Cell reports* 21, 3234-3242.
- **Goodridge, H.S., Reyes, C.N., Becker, C.A., Katsumoto, T.R., Ma, J., Wolf, A.J., Bose, N., Chan, A.S., Magee, A.S., Danielson, M.E., et al.** (2011). Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a 'phagocytic synapse'. *Nature* 472, 471-475.
- **Gorman, J.A., Hundhausen, C., Errett, J.S., Stone, A.E., Allenspach, E.J., Ge, Y., Arkatkar, T., Clough, C., Dai, X., Khim, S., et al.** (2017). The A946T variant of the RNA sensor IFIH1 mediates an interferon program that limits viral infection but increases the risk for autoimmunity. *Nature immunology* 18, 744-752.
- **Gough, D.J., Messina, N.L., Clarke, C.J., Johnstone, R.W., and Levy, D.E.** (2012). Constitutive type I interferon modulates homeostatic balance through tonic signaling. *Immunity* 36, 166-174.
- **Gringhuis, S.I., den Dunnen, J., Litjens, M., van der Vlist, M., Wevers, B., Bruijns, S.C., and Geijtenbeek, T.B.** (2009). Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF-kappaB activation through Raf-1 and Syk. *Nature immunology* 10, 203-213.
- **Gringhuis, S.I., den Dunnen, J., Litjens, M., van Het Hof, B., van Kooyk, Y., and Geijtenbeek, T.B.** (2007). C-type lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF-kappaB. *Immunity* 26, 605-616.

- **Gronke, K., Kofoed-Nielsen, M., and Diefenbach, A.** (2016). Innate lymphoid cells, precursors and plasticity. *Immunology letters* 179, 9-18.
- **Guo, H., Konig, R., Deng, M., Riess, M., Mo, J., Zhang, L., Petrucelli, A., Yoh, S.M., Barefoot, B., Samo, M., et al.** (2016). NLRX1 Sequesters STING to Negatively Regulate the Interferon Response, Thereby Facilitating the Replication of HIV-1 and DNA Viruses. *Cell host & microbe* 19, 515-528.
- **Haan, C., Rolvering, C., Raulf, F., Kapp, M., Druckes, P., Thoma, G., Behrmann, I., and Zerwes, H.G.** (2011). Jak1 has a dominant role over Jak3 in signal transduction through gammac-containing cytokine receptors. *Chemistry & biology* 18, 314-323.
- **Haas, K.M., Poe, J.C., Steeber, D.A., and Tedder, T.F.** (2005). B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. *Immunity* 23, 7-18.
- **Hald Andersen, M., Schrama, D., Thor Straten, P., Becker, J.C.** (2006). Cytotoxic T Cells. *Journal of Investigative Dermatology* 126:32-41.
- **Hamilton, J.A., Whitty, G.A., Kola, I., and Hertzog, P.J.** (1996). Endogenous IFN-alpha beta suppresses colony-stimulating factor (CSF)-1-stimulated macrophage DNA synthesis and mediates inhibitory effects of lipopolysaccharide and TNF-alpha. *Journal of immunology* 156, 2553-2557.
- **Hansen, K., Prabakaran, T., Laustsen, A., Jorgensen, S.E., Rahbaek, S.H., Jensen, S.B., Nielsen, R., Leber, J.H., Decker, T., Horan, K.A., et al.** (2014). *Listeria monocytogenes* induces IFNbeta expression through an IFI16-, cGAS- and STING-dependent pathway. *The EMBO journal* 33, 1654-1666.
- **Hardy, R.R., and Hayakawa, K.** (2001). B cell development pathways. *Annual review of immunology* 19, 595-621.
- **Harlin, H., Meng, Y., Peterson, A.C., Zha, Y., Tretiakova, M., Slingluff, C., McKee, M., and Gajewski, T.F.** (2009). Chemokine expression in melanoma metastases associated with CD8+ T-cell recruitment. *Cancer research* 69, 3077-3085.
- **Hata, N., Sato, M., Takaoka, A., Asagiri, M., Tanaka, N., and Taniguchi, T.** (2001). Constitutive IFN-alpha/beta signal for efficient IFN-alpha/beta gene induction by virus. *Biochemical and biophysical research communications* 285, 518-525.
- **Hauck, F., Randriamampita, C., Martin, E., Gerart, S., Lambert, N., Lim, A., Soulier, J., Maciorowski, Z., Touzot, F., Moshous, D., et al.** (2012). Primary T-cell immunodeficiency with immunodysregulation caused by autosomal recessive LCK deficiency. *The Journal of allergy and clinical immunology* 130, 1144-1152 e1111.
- **Heider, M.R., and Munson, M.** (2012). Exorcising the exocyst complex. *Traffic* 13, 898-907.
- **Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., and Akira, S.** (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408, 740-745.
- **Herbeuval, J.P., Hardy, A.W., Boasso, A., Anderson, S.A., Dolan, M.J., Dy, M., and Shearer, G.M.** (2005). Regulation of TNF-related apoptosis-inducing ligand on primary CD4+ T cells by HIV-1: role of type I IFN-producing plasmacytoid dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 13974-13979.
- **Hershko, A., and Ciechanover, A.** (1998). The ubiquitin system. *Annual review of biochemistry* 67, 425-479.
- **Hervas-Stubbs, S., Perez-Gracia, J.L., Rouzaut, A., Sanmamed, M.F., Le Bon, A., and Melero, I.** (2011). Direct effects of type I interferons on cells of the immune system. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17, 2619-2627.
- **Hibbs, M.L., Quilici, C., Kountouri, N., Seymour, J.F., Armes, J.E., Burgess, A.W., and Dunn, A.R.** (2007). Mice lacking three myeloid colony-stimulating factors (G-CSF, GM-CSF, and M-CSF) still

produce macrophages and granulocytes and mount an inflammatory response in a sterile model of peritonitis. *Journal of immunology* 178, 6435-6443.

- **Hill, D.A., and Artis, D.** (2010). Intestinal bacteria and the regulation of immune cell homeostasis. *Annual review of immunology* 28, 623-667.
- **Hoffmann, A., Kirn, E., Krueger, G.R., and Fischer, R.** (1994). Bone marrow hypoplasia and fibrosis following interferon treatment. *In vivo* 8, 605-612.
- **Holm, C.K., Rahbek, S.H., Gad, H.H., Bak, R.O., Jakobsen, M.R., Jiang, Z., Hansen, A.L., Jensen, S.K., Sun, C., Thomsen, M.K., et al.** (2016). Influenza A virus targets a cGAS-independent STING pathway that controls enveloped RNA viruses. *Nature communications* 7, 10680.
- **Hoving, J.C., Wilson, G.J., and Brown, G.D.** (2014). Signalling C-type lectin receptors, microbial recognition and immunity. *Cellular microbiology* 16, 185-194.
- **Hu, H., and Sun, S.C.** (2016). Ubiquitin signaling in immune responses. *Cell research* 26, 457-483.
- **Huang, Z., Chen, X., Yu, B., and Chen, D.** (2012). Cloning and functional characterization of rat stimulator of interferon genes (STING) regulated by miR-24. *Developmental and comparative immunology* 37, 414-420.
- **Hume, D.A., and MacDonald, K.P.** (2012). Therapeutic applications of macrophage colony-stimulating factor-1 (CSF-1) and antagonists of CSF-1 receptor (CSF-1R) signaling. *Blood* 119, 1810-1820.
- **Ishikawa, H., and Barber, G.N.** (2008). STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* 455, 674-678.
- **Ishikawa, H., and Barber, G.N.** (2011). The STING pathway and regulation of innate immune signaling in response to DNA pathogens. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 68, 1157-1165.
- **Ishikawa, H., Ma, Z., and Barber, G.N.** (2009). STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* 461, 788-792.
- **Ivashkiv, L.B., and Donlin, L.T.** (2014). Regulation of type I interferon responses. *Nature reviews. Immunology* 14, 36-49.
- **Iwasaki, A.** (2012). A virological view of innate immune recognition. *Annual review of microbiology* 66, 177-196.
- **Iwasaki, A., and Medzhitov, R.** (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature immunology* 5, 987-995.
- **Iwasaki, A., and Medzhitov, R.** (2010). Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 327, 291-295.
- **Jang, M.A., Kim, E.K., Now, H., Nguyen, N.T., Kim, W.J., Yoo, J.Y., Lee, J., Jeong, Y.M., Kim, C.H., Kim, O.H., et al.** (2015). Mutations in DDX58, which encodes RIG-I, cause atypical Singleton-Merten syndrome. *American journal of human genetics* 96, 266-274.
- **Janke, C., Rogowski, K., Wloga, D., Regnard, C., Kajava, A.V., Strub, J.M., Temurak, N., van Dijk, J., Boucher, D., van Dorsselaer, A., et al.** (2005). Tubulin polyglutamylase enzymes are members of the TTL domain protein family. *Science* 308, 1758-1762.
- **Jeremiah, N., Neven, B., Gentili, M., Callebaut, I., Maschalidi, S., Stolzenberg, M.C., Goudin, N., Fremont, M.L., Nitschke, P., Molina, T.J., et al.** (2014). Inherited STING-activating mutation underlies a familial inflammatory syndrome with lupus-like manifestations. *The Journal of clinical investigation* 124, 5516-5520.
- **Jiang, F., Ramanathan, A., Miller, M.T., Tang, G.Q., Gale, M., Jr., Patel, S.S., and Marcotrigiano, J.** (2011). Structural basis of RNA recognition and activation by innate immune receptor RIG-I. *Nature* 479, 423-427.

- **Jin, L., Waterman, P.M., Jonscher, K.R., Short, C.M., Reisdorph, N.A., and Cambier, J.C.** (2008). MPYS, a novel membrane tetraspanner, is associated with major histocompatibility complex class II and mediates transduction of apoptotic signals. *Molecular and cellular biology* 28, 5014-5026.
- **Jin, L., Xu, L.G., Yang, I.V., Davidson, E.J., Schwartz, D.A., Wurfel, M.M., and Cambier, J.C.** (2011). Identification and characterization of a loss-of-function human MPYS variant. *Genes and immunity* 12, 263-269.
- **Jin, T., Perry, A., Smith, P., Jiang, J., and Xiao, T.S.** (2013). Structure of the absent in melanoma 2 (AIM2) pyrin domain provides insights into the mechanisms of AIM2 autoinhibition and inflammasome assembly. *The Journal of biological chemistry* 288, 13225-13235.
- **Josefsdottir, K.S., Baldrige, M.T., Kadmon, C.S., and King, K.Y.** (2017). Antibiotics impair murine hematopoiesis by depleting the intestinal microbiota. *Blood* 129, 729-739.
- **Kagan, J.C., Su, T., Horng, T., Chow, A., Akira, S., and Medzhitov, R.** (2008). TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nature immunology* 9, 361-368.
- **Kalamvoki, M., and Roizman, B.** (2014). HSV-1 degrades, stabilizes, requires, or is stung by STING depending on ICP0, the US3 protein kinase, and cell derivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, E611-617.
- **Kanazawa, N., Tashiro, K., Inaba, K., and Miyachi, Y.** (2003). Dendritic cell immunoactivating receptor, a novel C-type lectin immunoreceptor, acts as an activating receptor through association with Fc receptor gamma chain. *The Journal of biological chemistry* 278, 32645-32652.
- **Karin, M., Liu, Z., and Zandi, E.** (1997). AP-1 function and regulation. *Current opinion in cell biology* 9, 240-246.
- **Kato, H., Takeuchi, O., Mikamo-Satoh, E., Hirai, R., Kawai, T., Matsushita, K., Hiiragi, A., Dermody, T.S., Fujita, T., and Akira, S.** (2008). Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *The Journal of experimental medicine* 205, 1601-1610.
- **Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K.J., et al.** (2006). Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 441, 101-105.
- **Kato, K., Omura, H., Ishitani, R., and Nureki, O.** (2017). Cyclic GMP-AMP as an Endogenous Second Messenger in Innate Immune Signaling by Cytosolic DNA. *Annual review of biochemistry* 86, 541-566.
- **Kaur, S., Sassano, A., Dolniak, B., Joshi, S., Majchrzak-Kita, B., Baker, D.P., Hay, N., Fish, E.N., and Platanias, L.C.** (2008). Role of the Akt pathway in mRNA translation of interferon-stimulated genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 4808-4813.
- **Kaur, S., Sassano, A., Joseph, A.M., Majchrzak-Kita, B., Eklund, E.A., Verma, A., Brachmann, S.M., Fish, E.N., and Platanias, L.C.** (2008). Dual regulatory roles of phosphatidylinositol 3-kinase in IFN signaling. *Journal of immunology* 181, 7316-7323.
- **Kawai, T., and Akira, S.** (2009). The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *International immunology* 21, 317-337.
- **Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., Ishii, K.J., Takeuchi, O., and Akira, S.** (2005). IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nature immunology* 6, 981-988.
- **Kawai, T., Takeuchi, O., Fujita, T., Inoue, J., Muhlradt, P.F., Sato, S., Hoshino, K., and Akira, S.** (2001). Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *Journal of immunology* 167, 5887-5894.

- **Kim, P.G., Canver, M.C., Rhee, C., Ross, S.J., Harriss, J.V., Tu, H.C., Orkin, S.H., Tucker, H.O., and Daley, G.Q.** (2016). Interferon-alpha signaling promotes embryonic HSC maturation. *Blood* 128, 204-216.
- **Kim, M.Y., Kim, K.S., McConnell, F., and Lane, P.** (2009). Lymphoid tissue inducer cells: architects of CD4 immune responses in mice and men. *Clinical and experimental immunology* 157, 20-26.
- **Kitamura, A., Maekawa, Y., Uehara, H., Izumi, K., Kawachi, I., Nishizawa, M., Toyoshima, Y., Takahashi, H., Standley, D.M., Tanaka, K., et al.** (2011). A mutation in the immunoproteasome subunit PSMB8 causes autoinflammation and lipodystrophy in humans. *The Journal of clinical investigation* 121, 4150-4160.
- **Klarquist, J., Hennies, C.M., Lehn, M.A., Reboulet, R.A., Feau, S., and Janssen, E.M.** (2014). STING-mediated DNA sensing promotes antitumor and autoimmune responses to dying cells. *Journal of immunology* 193, 6124-6134.
- **Klose, C.S., and Artis, D.** (2016). Innate lymphoid cells as regulators of immunity, inflammation and tissue homeostasis. *Nature immunology* 17, 765-774.
- **Kobayashi, H., Kobayashi, C.I., Nakamura-Ishizu, A., Karigane, D., Haeno, H., Yamamoto, K.N., Sato, T., Ohteki, T., Hayakawa, Y., Barber, G.N., et al.** (2015). Bacterial c-di-GMP affects hematopoietic stem/progenitors and their niches through STING. *Cell reports* 11, 71-84.
- **Koch, U., and Radtke, F.** (2011). Mechanisms of T cell development and transformation. *Annual review of cell and developmental biology* 27, 539-562.
- **Kondo, M.** (2010). Lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Immunological reviews* 238, 37-46.
- **Kondo, M., Weissman, I.L., and Akashi, K.** (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91, 661-672.
- **Konig, N., Fiehn, C., Wolf, C., Schuster, M., Cura Costa, E., Tungler, V., Alvarez, H.A., Chara, O., Engel, K., Goldbach-Mansky, R., et al.** (2017). Familial chilblain lupus due to a gain-of-function mutation in STING. *Annals of the rheumatic diseases* 76, 468-472.
- **Konno, H., Konno, K., and Barber, G.N.** (2013). Cyclic dinucleotides trigger ULK1 (ATG1) phosphorylation of STING to prevent sustained innate immune signaling. *Cell* 155, 688-698.
- **Kopan, R., and Ilagan, M.X.** (2009). The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* 137, 216-233.
- **Kranzusch, P.J., Wilson, S.C., Lee, A.S., Berger, J.M., Doudna, J.A., and Vance, R.E.** (2015). Ancient Origin of cGAS-STING Reveals Mechanism of Universal 2',3' cGAMP Signaling. *Molecular cell* 59, 891-903.
- **Kruglov, A.A., Grivennikov, S.I., Kuprash, D.V., Winsauer, C., Prepens, S., Seleznik, G.M., Eberl, G., Littman, D.R., Heikenwalder, M., Tumanov, A.V., and Nedospasov, S.A.** (2013). Nonredundant function of soluble LTalpha3 produced by innate lymphoid cells in intestinal homeostasis. *Science* 342, 1243-1246.
- **Kumar, K.G., Krolewski, J.J., and Fuchs, S.Y.** (2004). Phosphorylation and specific ubiquitin acceptor sites are required for ubiquitination and degradation of the IFNAR1 subunit of type I interferon receptor. *The Journal of biological chemistry* 279, 46614-46620.
- **Kurotaki, D., Yamamoto, M., Nishiyama, A., Uno, K., Ban, T., Ichino, M., Sasaki, H., Matsunaga, S., Yoshinari, M., Ryo, A., et al.** (2014). IRF8 inhibits C/EBPalpha activity to restrain mononuclear phagocyte progenitors from differentiating into neutrophils. *Nature communications* 5, 4978.
- **Lahaye, X., Satoh, T., Gentili, M., Cerboni, S., Conrad, C., Hurbain, I., El Marjou, A., Lacabartz, C., Laky, K., and Fowlkes, B.J.** (2008). Notch signaling in CD4 and CD8 T cell development. *Current opinion in immunology* 20, 197-202.

- **Lelievre, J.D., and Manel, N.** (2013). The capsids of HIV-1 and HIV-2 determine immune detection of the viral cDNA by the innate sensor cGAS in dendritic cells. *Immunity* 39, 1132-1142.
- **Lam, E., Stein, S., and Falck-Pedersen, E.** (2014). Adenovirus detection by the cGAS/STING/TBK1 DNA sensing cascade. *Journal of virology* 88, 974-981.
- **Lamkanfi, M., and Dixit, V.M.** (2012). Inflammasomes and their roles in health and disease. *Annual review of cell and developmental biology* 28, 137-161.
- **Lamkanfi, M., and Dixit, V.M.** (2014). Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* 157, 1013-1022.
- **Lane, P.J., Gaspal, F.M., McConnell, F.M., Kim, M.Y., Anderson, G., and Withers, D.R.** (2012). Lymphoid tissue inducer cells: innate cells critical for CD4+ T cell memory responses? *Annals of the New York Academy of Sciences* 1247, 1-15.
- **Larkin, B., Ilyukha, V., Sorokin, M., Buzdin, A., Vannier, E., and Poltorak, A.** (2017). Cutting Edge: Activation of STING in T Cells Induces Type I IFN Responses and Cell Death. *Journal of immunology* 199, 397-402.
- **Lei, Y., Moore, C.B., Liesman, R.M., O'Connor, B.P., Bergstralh, D.T., Chen, Z.J., Pickles, R.J., and Ting, J.P.** (2009). MAVS-mediated apoptosis and its inhibition by viral proteins. *PloS one* 4, e5466.
- **LeibundGut-Landmann, S., Gross, O., Robinson, M.J., Osorio, F., Slack, E.C., Tsoni, S.V., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V., Brown, G.D., Ruland, J., and Reis e Sousa, C.** (2007). Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nature immunology* 8, 630-638.
- **Levine, B., Mizushima, N., and Virgin, H.W.** (2011). Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* 469, 323-335.
- **Levy, D.E., Marie, I.J., and Durbin, J.E.** (2011). Induction and function of type I and III interferon in response to viral infection. *Current opinion in virology* 1, 476-486.
- **Li, L., Yin, Q., Kuss, P., Maliga, Z., Millan, J.L., Wu, H., and Mitchison, T.J.** (2014). Hydrolysis of 2'3'-cGAMP by ENPP1 and design of nonhydrolyzable analogs. *Nature chemical biology* 10, 1043-1048.
- **Li, T., and Chen, Z.J.** (2018). The cGAS-cGAMP-STING pathway connects DNA damage to inflammation, senescence, and cancer. *The Journal of experimental medicine* 215, 1287-1299.
- **Li, T., Diner, B.A., Chen, J., and Cristea, I.M.** (2012). Acetylation modulates cellular distribution and DNA sensing ability of interferon-inducible protein IFI16. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 10558-10563.
- **Li, X., Shu, C., Yi, G., Chaton, C.T., Shelton, C.L., Diao, J., Zuo, X., Kao, C.C., Herr, A.B., and Li, P.** (2013). Cyclic GMP-AMP synthase is activated by double-stranded DNA-induced oligomerization. *Immunity* 39, 1019-1031.
- **Li, Y., Wilson, H.L., and Kiss-Toth, E.** (2017). Regulating STING in health and disease. *Journal of inflammation* 14, 11.
- **Li, Z., Liu, G., Sun, L., Teng, Y., Guo, X., Jia, J., Sha, J., Yang, X., Chen, D., and Sun, Q.** (2015). PPM1A regulates antiviral signaling by antagonizing TBK1-mediated STING phosphorylation and aggregation. *PLoS pathogens* 11, e1004783.
- **Liang, Q., Seo, G.J., Choi, Y.J., Kwak, M.J., Ge, J., Rodgers, M.A., Shi, M., Leslie, B.J., Hopfner, K.P., Ha, T., et al.** (2014). Crosstalk between the cGAS DNA sensor and Beclin-1 autophagy protein shapes innate antimicrobial immune responses. *Cell host & microbe* 15, 228-238.
- **Lin, Y.C., Jhunjunwala, S., Benner, C., Heinz, S., Welinder, E., Mansson, R., Sigvardsson, M., Hagman, J., Espinoza, C.A., Dutkowski, J., et al.** (2010). A global network of transcription factors, involving E2A, EBF1 and Foxo1, that orchestrates B cell fate. *Nature immunology* 11, 635-643.
- **Lindenmann, J., Burke, D.C., and Isaacs, A.** (1957). Studies on the production, mode of action and properties of interferon. *British journal of experimental pathology* 38, 551-562.

- **Lio, C.W., McDonald, B., Takahashi, M., Dhanwani, R., Sharma, N., Huang, J., Pham, E., Benedict, C.A., and Sharma, S.** (2016). cGAS-STING Signaling Regulates Initial Innate Control of Cytomegalovirus Infection. *Journal of virology* 90, 7789-7797.
- **Lippmann, J., Rothenburg, S., Deigendesch, N., Eitel, J., Meixenberger, K., van Laak, V., Slevogt, H., N'Guessan P, D., Hippenstiel, S., Chakraborty, T., et al.** (2008). IFNbeta responses induced by intracellular bacteria or cytosolic DNA in different human cells do not require ZBP1 (DLM-1/DAI). *Cellular microbiology* 10, 2579-2588.
- **Lipschutz, J.H., Lingappa, V.R., and Mostov, K.E.** (2003). The exocyst affects protein synthesis by acting on the translocation machinery of the endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry* 278, 20954-20960.
- **Littman, D.R., and Pamer, E.G.** (2011). Role of the commensal microbiota in normal and pathogenic host immune responses. *Cell host & microbe* 10, 311-323.
- **Liu, S., Cai, X., Wu, J., Cong, Q., Chen, X., Li, T., Du, F., Ren, J., Wu, Y.T., Grishin, N.V., and Chen, Z.J.** (2015). Phosphorylation of innate immune adaptor proteins MAVS, STING, and TRIF induces IRF3 activation. *Science* 347, aaa2630.
- **Liu, S., Feng, M., and Guan, W.** (2016). Mitochondrial DNA sensing by STING signaling participates in inflammation, cancer and beyond. *International journal of cancer* 139, 736-741.
- **Liu, Y., Goulet, M.L., Sze, A., Hadj, S.B., Belgnaoui, S.M., Lababidi, R.R., Zheng, C., Fritz, J.H., Olganier, D., and Lin, R.** (2016). RIG-I-Mediated STING Upregulation Restricts Herpes Simplex Virus 1 Infection. *Journal of virology* 90, 9406-9419.
- **Liu, Y., Jesus, A.A., Marrero, B., Yang, D., Ramsey, S.E., Sanchez, G.A.M., Tenbrock, K., Wittkowski, H., Jones, O.Y., Kuehn, H.S., et al.** (2014). Activated STING in a vascular and pulmonary syndrome. *The New England journal of medicine* 371, 507-518.
- **Liu, Y., Olganier, D., and Lin, R.** (2016). Host and Viral Modulation of RIG-I-Mediated Antiviral Immunity. *Frontiers in immunology* 7, 662.
- **Luan, Y., Lengyel, P., and Liu, C.J.** (2008). p204, a p200 family protein, as a multifunctional regulator of cell proliferation and differentiation. *Cytokine & growth factor reviews* 19, 357-369.
- **Luecke, S., Holleufer, A., Christensen, M.H., Jonsson, K.L., Boni, G.A., Sorensen, L.K., Johannsen, M., Jakobsen, M.R., Hartmann, R., and Paludan, S.R.** (2017). cGAS is activated by DNA in a length-dependent manner. *EMBO reports* 18, 1707-1715.
- **Lundstrom, W., Fewkes, N.M., and Mackall, C.L.** (2012). IL-7 in human health and disease. *Seminars in immunology* 24, 218-224.
- **Luo, W.W., Li, S., Li, C., Lian, H., Yang, Q., Zhong, B., and Shu, H.B.** (2016). iRhom2 is essential for innate immunity to DNA viruses by mediating trafficking and stability of the adaptor STING. *Nature immunology* 17, 1057-1066.
- **Ma, F., Li, B., Liu, S.Y., Iyer, S.S., Yu, Y., Wu, A., and Cheng, G.** (2015). Positive feedback regulation of type I IFN production by the IFN-inducible DNA sensor cGAS. *Journal of immunology* 194, 1545-1554.
- **Ma, J., Becker, C., Lowell, C.A., and Underhill, D.M.** (2012). Dectin-1-triggered recruitment of light chain 3 protein to phagosomes facilitates major histocompatibility complex class II presentation of fungal-derived antigens. *The Journal of biological chemistry* 287, 34149-34156.
- **Ma, Z., and Damania, B.** (2016). The cGAS-STING Defense Pathway and Its Counteraction by Viruses. *Cell host & microbe* 19, 150-158.
- **Ma, Z., Jacobs, S.R., West, J.A., Stopford, C., Zhang, Z., Davis, Z., Barber, G.N., Glaunsinger, B.A., Dittmer, D.P., and Damania, B.** (2015). Modulation of the cGAS-STING DNA sensing pathway by gammaherpesviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, E4306-4315.

- **Mackenzie, K.J., Carroll, P., Lettice, L., Tarnauskaite, Z., Reddy, K., Dix, F., Revuelta, A., Abbondati, E., Rigby, R.E., Rabe, B., et al.** (2016). Ribonuclease H2 mutations induce a cGAS/STING-dependent innate immune response. *The EMBO journal* 35, 831-844.
- **Malakhov, M.P., Malakhova, O.A., Kim, K.I., Ritchie, K.J., and Zhang, D.E.** (2002). UBP43 (USP18) specifically removes ISG15 from conjugated proteins. *The Journal of biological chemistry* 277, 9976-9981.
- **Manning, B.D., and Toker, A.** (2017). AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell* 169, 381-405.
- **Mansson, R., Welinder, E., Ahsberg, J., Lin, Y.C., Benner, C., Glass, C.K., Lucas, J.S., Sigvardsson, M., and Murre, C.** (2012). Positive intergenic feedback circuitry, involving EBF1 and FOXO1, orchestrates B-cell fate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 21028-21033.
- **Marinho, F.V., Benmerzoug, S., Oliveira, S.C., Ryffel, B., and Quesniaux, V.F.J.** (2017). The Emerging Roles of STING in Bacterial Infections. *Trends in microbiology* 25, 906-918.
- **Martin, F., and Kearney, J.F.** (2000). Positive selection from newly formed to marginal zone B cells depends on the rate of clonal production, CD19, and btk. *Immunity* 12, 39-49.
- **Massa, S., Balciunaite, G., Ceredig, R., and Rolink, A.G.** (2006). Critical role for c-kit (CD117) in T cell lineage commitment and early thymocyte development in vitro. *European journal of immunology* 36, 526-532.
- **Masumoto, J., Yang, K., Varambally, S., Hasegawa, M., Tomlins, S.A., Qiu, S., Fujimoto, Y., Kawasaki, A., Foster, S.J., Horie, Y., et al.** (2006). Nod1 acts as an intracellular receptor to stimulate chemokine production and neutrophil recruitment in vivo. *The Journal of experimental medicine* 203, 203-213.
- **Matzinger, P.** (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annual review of immunology* 12, 991-1045.
- **Mayer, L.** (2005). Mucosal immunity. *Immunological reviews* 206, 5.
- **McCusker, C., and Warrington, R.** (2011). Primary immunodeficiency. *Allergy, asthma, and clinical immunology : official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology* 7 Suppl 1, S11.
- **McDermott, A., Jacks, J., Kessler, M., Emanuel, P.D., and Gao, L.** (2015). Proteasome-associated autoinflammatory syndromes: advances in pathogenesis, clinical presentations, diagnosis, and management. *International journal of dermatology* 54, 121-129.
- **McIlwain, D.R., Lang, P.A., Maretzky, T., Hamada, K., Ohishi, K., Maney, S.K., Berger, T., Murthy, A., Duncan, G., Xu, H.C., et al.** (2012). iRhom2 regulation of TACE controls TNF-mediated protection against *Listeria* and responses to LPS. *Science* 335, 229-232.
- **Medzhitov, R.** (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454, 428-435.
- **Melki, I., Rose, Y., Ugenti, C., Van Eyck, L., Fremont, M.L., Kitabayashi, N., Rice, G.I., Jenkinson, E.M., Boulai, A., Jeremiah, N., et al.** (2017). Disease-associated mutations identify a novel region in human STING necessary for the control of type I interferon signaling. *The Journal of allergy and clinical immunology* 140, 543-552 e545.
- **Meuwissen, M.E., Schot, R., Buta, S., Oudesluijs, G., Tinschert, S., Speer, S.D., Li, Z., van Unen, L., Heijnsman, D., Goldmann, T., et al.** (2016). Human USP18 deficiency underlies type 1 interferonopathy leading to severe pseudo-TORCH syndrome. *The Journal of experimental medicine* 213, 1163-1174.
- **Mitchell, D.A., Pickering, M.C., Warren, J., Fossati-Jimack, L., Cortes-Hernandez, J., Cook, H.T., Botto, M., and Walport, M.J.** (2002). C1q deficiency and autoimmunity: the effects of genetic background on disease expression. *Journal of immunology* 168, 2538-2543.

- **Mogensen, T.H.** (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical microbiology reviews* 22, 240-273, Table of Contents.
- **Monroe, J.G., and Allman, D.** (2004). Keeping track of pro-B cells: a new model for the effects of IL-7 during B cell development. *European journal of immunology* 34, 2642-2646.
- **Montaldo, E., Juelke, K., and Romagnani, C.** (2015). Group 3 innate lymphoid cells (ILC3s): Origin, differentiation, and plasticity in humans and mice. *European journal of immunology* 45, 2171-2182.
- **Moore, T.A., and Zlotnik, A.** (1995). T-cell lineage commitment and cytokine responses of thymic progenitors. *Blood* 86, 1850-1860.
- **Moretti, J., Roy, S., Bozec, D., Martinez, J., Chapman, J.R., Ueberheide, B., Lamming, D.W., Chen, Z.J., Horng, T., Yeretssian, G., et al.** (2017). STING Senses Microbial Viability to Orchestrate Stress-Mediated Autophagy of the Endoplasmic Reticulum. *Cell* 171, 809-823 e813.
- **Morrison, S.J., and Weissman, I.L.** (1994). The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity* 1, 661-673.
- **Moshous, D., Martin, E., Carpentier, W., Lim, A., Callebaut, I., Canioni, D., Hauck, F., Majewski, J., Schwartzenuber, J., Nitschke, P., et al.** (2013). Whole-exome sequencing identifies Coronin-1A deficiency in 3 siblings with immunodeficiency and EBV-associated B-cell lymphoproliferation. *The Journal of allergy and clinical immunology* 131, 1594-1603.
- **Muegge, K., Vila, M.P., and Durum, S.K.** (1993). Interleukin-7: a cofactor for V(D)J rearrangement of the T cell receptor beta gene. *Science* 261, 93-95.
- **Munoz, J., Rodiere, M., Jeremiah, N., Rieux-Laucat, F., Ojageer, A., Rice, G.I., Rozenberg, F., Crow, Y.J., and Bessis, D.** (2015). Stimulator of Interferon Genes-Associated Vasculopathy With Onset in Infancy: A Mimic of Childhood Granulomatosis With Polyangiitis. *JAMA dermatology* 151, 872-877.
- **Nakorn, T.N., Miyamoto, T., and Weissman, I.L.** (2003). Characterization of mouse clonogenic megakaryocyte progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 205-210.
- **Namen, A.E., Schmierer, A.E., March, C.J., Overell, R.W., Park, L.S., Urdal, D.L., and Mochizuki, D.Y.** (1988). B cell precursor growth-promoting activity. Purification and characterization of a growth factor active on lymphocyte precursors. *The Journal of experimental medicine* 167, 988-1002.
- **Nishikawa, Y., Matsuzaki, Y., Kimura, K., Rokunohe, A., Nakano, H., and Sawamura, D.** (2018). Modulation of Stimulator of Interferon Genes (STING) Expression by Interferon-gamma in Human Keratinocytes. *Biochemical genetics* 56, 93-102.
- **Notarangelo, L.D., Mella, P., Jones, A., de Saint Basile, G., Savoldi, G., Cranston, T., Vihinen, M., and Schumacher, R.F.** (2001). Mutations in severe combined immune deficiency (SCID) due to JAK3 deficiency. *Human mutation* 18, 255-263.
- **Odendall, C., Dixit, E., Stavru, F., Bierne, H., Franz, K.M., Durbin, A.F., Boulant, S., Gehrke, L., Cossart, P., and Kagan, J.C.** (2014). Diverse intracellular pathogens activate type III interferon expression from peroxisomes. *Nature immunology* 15, 717-726.
- **Ohishi, K., Katayama, N., Shiku, H., Varnum-Finney, B., and Bernstein, I.D.** (2003). Notch signalling in hematopoiesis. *Seminars in cell & developmental biology* 14, 143-150.
- **Omoyinmi, E., Melo Gomes, S., Nanthapaisal, S., Woo, P., Standing, A., Eleftheriou, D., Klein, N., and Brogan, P.A.** (2015). Stimulator of interferon genes-associated vasculitis of infancy. *Arthritis & rheumatology* 67, 808.
- **Omura, H., Oikawa, D., Nakane, T., Kato, M., Ishii, R., Ishitani, R., Tokunaga, F., and Nureki, O.** (2016). Structural and Functional Analysis of DDX41: a bispecific immune receptor for DNA and cyclic dinucleotide. *Scientific reports* 6, 34756.
- **O'Neill, L.A., and Bowie, A.G.** (2007). The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nature reviews. Immunology* 7, 353-364.

- **O'Neill, L.A., Golenbock, D., and Bowie, A.G.** (2013). The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nature reviews. Immunology* 13, 453-460.
- **Ouyang, S., Song, X., Wang, Y., Ru, H., Shaw, N., Jiang, Y., Niu, F., Zhu, Y., Qiu, W., Parvatiyar, K., et al.** (2012). Structural analysis of the STING adaptor protein reveals a hydrophobic dimer interface and mode of cyclic di-GMP binding. *Immunity* 36, 1073-1086.
- **Ouyang, W., Kolls, J.K., and Zheng, Y.** (2008). The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* 28, 454-467.
- **Pabst, O., Cerovic, V., and Hornef, M.** (2016). Secretory IgA in the Coordination of Establishment and Maintenance of the Microbiota. *Trends in immunology* 37, 287-296.
- **Paludan, S.R., and Bowie, A.G.** (2013). Immune sensing of DNA. *Immunity* 38, 870-880.
- **Paludan, S.R.** (2016). Innate Antiviral Defenses Independent of Inducible IFN α / β Production. *Trends in immunology* 37, 588-596.
- **Panday, A., Inda, M.E., Bagam, P., Sahoo, M.K., Osorio, D., and Batra, S.** (2016). Transcription Factor NF- κ B: An Update on Intervention Strategies. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* 64, 463-483.
- **Parrish, Y.K., Baez, I., Milford, T.A., Benitez, A., Galloway, N., Rogerio, J.W., Sahakian, E., Kagoda, M., Huang, G., Hao, Q.L., et al.** (2009). IL-7 Dependence in human B lymphopoiesis increases during progression of ontogeny from cord blood to bone marrow. *Journal of immunology* 182, 4255-4266.
- **Parvatiyar, K., Zhang, Z., Teles, R.M., Ouyang, S., Jiang, Y., Iyer, S.S., Zaver, S.A., Schenk, M., Zeng, S., Zhong, W., et al.** (2012). The helicase DDX41 recognizes the bacterial secondary messengers cyclic di-GMP and cyclic di-AMP to activate a type I interferon immune response. *Nature immunology* 13, 1155-1161.
- **Pascual, V., and Banchereau, J.** (2012). Tracking interferon in autoimmunity. *Immunity* 36, 7-9.
- **Patel, S., Blaauboer, S.M., Tucker, H.R., Mansouri, S., Ruiz-Moreno, J.S., Hamann, L., Schumann, R.R., Opitz, B., and Jin, L.** (2017). The Common R71H-G230A-R293Q Human TMEM173 Is a Null Allele. *Journal of immunology* 198, 776-787.
- **Paul, F., Arkin, Y., Giladi, A., Jaitin, D.A., Kenigsberg, E., Keren-Shaul, H., Winter, D., Lara-Astiaso, D., Gury, M., Weiner, A., et al.** (2015). Transcriptional Heterogeneity and Lineage Commitment in Myeloid Progenitors. *Cell* 163, 1663-1677.
- **Pawaria, S., Sharma, S., Baum, R., Nundel, K., Busto, P., Gravallese, E.M., Fitzgerald, K.A., and Marshak-Rothstein, A.** (2017). Taking the STING out of TLR-driven autoimmune diseases: good, bad, or indifferent? *Journal of leukocyte biology* 101, 121-126.
- **Peschon, J.J., Morrissey, P.J., Grabstein, K.H., Ramsdell, F.J., Maraskovsky, E., Gliniak, B.C., Park, L.S., Ziegler, S.F., Williams, D.E., Ware, C.B., et al.** (1994). Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *The Journal of experimental medicine* 180, 1955-1960.
- **Pestka, S., Krause, C.D., and Walter, M.R.** (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunological reviews* 202, 8-32.
- **Petersson, J., Schreiber, O., Hansson, G.C., Gendler, S.J., Velcich, A., Lundberg, J.O., Roos, S., Holm, L., and Phillipson, M.** (2011). Importance and regulation of the colonic mucus barrier in a mouse model of colitis. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 300, G327-333.
- **Picard, C., Bobby Gaspar, H., Al-Herz, W., Bousfiha, A., Casanova, J.L., Chatila, T., Crow, Y.J., Cunningham-Rundles, C., Etzioni, A., Franco, J.L., et al.** (2018). International Union of Immunological Societies: 2017 Primary Immunodeficiency Diseases Committee Report on Inborn Errors of Immunity. *Journal of clinical immunology* 38, 96-128.

- **Picard, C., Thouvenin, G., Kannengiesser, C., Dubus, J.C., Jeremiah, N., Rieux-Laucat, F., Crestani, B., Belot, A., Thivolet-Bejui, F., Secq, V., et al.** (2016). Severe Pulmonary Fibrosis as the First Manifestation of Interferonopathy (TMEM173 Mutation). *Chest* 150, e65-71.
- **Piganis, R.A., De Weerd, N.A., Gould, J.A., Schindler, C.W., Mansell, A., Nicholson, S.E., and Hertzog, P.J.** (2011). Suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1 inhibits type I interferon (IFN) signaling via the interferon alpha receptor (IFNAR1)-associated tyrosine kinase Tyk2. *The Journal of biological chemistry* 286, 33811-33818.
- **Pizzi, S., Sertic, S., Orcesi, S., Cereda, C., Bianchi, M., Jackson, A.P., Lazzaro, F., Plevani, P., and Muzi-Falconi, M.** (2015). Reduction of hRNase H2 activity in Aicardi-Goutieres syndrome cells leads to replication stress and genome instability. *Human molecular genetics* 24, 649-658.
- **Platanias, L.C.** (2005). Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nature reviews. Immunology* 5, 375-386.
- **Porritt, H.E., Rumpf, L.L., Tabrizifard, S., Schmitt, T.M., Zuniga-Pflucker, J.C., and Petrie, H.T.** (2004). Heterogeneity among DN1 prothymocytes reveals multiple progenitors with different capacities to generate T cell and non-T cell lineages. *Immunity* 20, 735-745.
- **Prabakaran, T., Bodda, C., Krapp, C., Zhang, B.C., Christensen, M.H., Sun, C., Reinert, L., Cai, Y., Jensen, S.B., Skouboe, M.K., et al.** (2018). Attenuation of cGAS-STING signaling is mediated by a p62/SQSTM1-dependent autophagy pathway activated by TBK1. *The EMBO journal* 37.
- **Qin, Y., Zhou, M.T., Hu, M.M., Hu, Y.H., Zhang, J., Guo, L., Zhong, B., and Shu, H.B.** (2014). RNF26 temporally regulates virus-triggered type I interferon induction by two distinct mechanisms. *PLoS pathogens* 10, e1004358.
- **Ramirez, J., Lukin, K., and Hagman, J.** (2010). From hematopoietic progenitors to B cells: mechanisms of lineage restriction and commitment. *Current opinion in immunology* 22, 177-184.
- **Rasaiyaah, J., Tan, C.P., Fletcher, A.J., Price, A.J., Blondeau, C., Hilditch, L., Jacques, D.A., Selwood, D.L., James, L.C., Noursadeghi, M., and Towers, G.J.** (2013). HIV-1 evades innate immune recognition through specific cofactor recruitment. *Nature* 503, 402-405.
- **Rathinam, V.A., Jiang, Z., Waggoner, S.N., Sharma, S., Cole, L.E., Waggoner, L., Vanaja, S.K., Monks, B.G., Ganesan, S., Latz, E., et al.** (2010). The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nature immunology* 11, 395-402.
- **Rathinam, V.A., Vanaja, S.K., and Fitzgerald, K.A.** (2012). Regulation of inflammasome signaling. *Nature immunology* 13, 333-342.
- **Ravenscroft, J.C., Suri, M., Rice, G.I., Szykiewicz, M., and Crow, Y.J.** (2011). Autosomal dominant inheritance of a heterozygous mutation in SAMHD1 causing familial chilblain lupus. *American journal of medical genetics. Part A* 155A, 235-237.
- **Raza Ali, S., Karin, M., Nizet, V.** (2015). Signaling cascades in inflammasome activation in microbial infections. *Inflammasome* 2:7-12.
- **Reijns, M.A., Rabe, B., Rigby, R.E., Mill, P., Astell, K.R., Lettice, L.A., Boyle, S., Leitch, A., Keighren, M., Kilanowski, F., et al.** (2012). Enzymatic removal of ribonucleotides from DNA is essential for mammalian genome integrity and development. *Cell* 149, 1008-1022.
- **Reikine, S., Nguyen, J.B., and Modis, Y.** (2014). Pattern Recognition and Signaling Mechanisms of RIG-I and MDA5. *Frontiers in immunology* 5, 342.
- **Reya, T., Duncan, A.W., Ailles, L., Domen, J., Scherer, D.C., Willert, K., Hintz, L., Nusse, R., and Weissman, I.L.** (2003). A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 423, 409-414.
- **Rice, G., Newman, W.G., Dean, J., Patrick, T., Parmar, R., Flintoff, K., Robins, P., Harvey, S., Hollis, T., O'Hara, A., et al.** (2007). Heterozygous mutations in TREX1 cause familial chilblain lupus and dominant Aicardi-Goutieres syndrome. *American journal of human genetics* 80, 811-815.

- **Rice, G.I., Del Toro Duany, Y., Jenkinson, E.M., Forte, G.M., Anderson, B.H., Ariaudo, G., Bader-Meunier, B., Baildam, E.M., Battini, R., Beresford, M.W., et al.** (2014). Gain-of-function mutations in IFIH1 cause a spectrum of human disease phenotypes associated with upregulated type I interferon signaling. *Nature genetics* 46, 503-509.
- **Robinette, M.L., Cella, M., Telliez, J.B., Ulland, T.K., Barrow, A.D., Capuder, K., Gilfillan, S., Lin, L.L., Notarangelo, L.D., and Colonna, M.** (2018). Jak3 deficiency blocks innate lymphoid cell development. *Mucosal immunology* 11, 50-60.
- **Rodero, M.P., and Crow, Y.J.** (2015). cGMP-AMP synthase paves the way to autoimmunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, 12903-12904.
- **Rodero, M.P., Tesser, A., Bartok, E., Rice, G.I., Della Mina, E., Depp, M., Beitz, B., Bondet, V., Cagnard, N., Duffy, D., et al.** (2017). Type I interferon-mediated autoinflammation due to DNase II deficiency. *Nature communications* 8, 2176.
- **Rogowski, K., van Dijk, J., Magiera, M.M., Bosc, C., Deloulme, J.C., Bosson, A., Peris, L., Gold, N.D., Lacroix, B., Bosch Grau, M., et al.** (2010). A family of protein-deglutamyating enzymes associated with neurodegeneration. *Cell* 143, 564-578.
- **Rolink, A.G., Winkler, T., Melchers, F., and Andersson, J.** (2000). Precursor B cell receptor-dependent B cell proliferation and differentiation does not require the bone marrow or fetal liver environment. *The Journal of experimental medicine* 191, 23-32.
- **Romano, R., Palamaro, L., Fusco, A., Iannace, L., Maio, S., Vigliano, I., Giardino, G., and Pignata, C.** (2012). From murine to human nude/SCID: the thymus, T-cell development and the missing link. *Clinical & developmental immunology* 2012, 467101.
- **Rossi, D.J., Bryder, D., Zahn, J.M., Ahlenius, H., Sonu, R., Wagers, A.J., and Weissman, I.L.** (2005). Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 9194-9199.
- **Rothenberg, E.V.** (2011). T cell lineage commitment: identity and renunciation. *Journal of immunology* 186, 6649-6655.
- **Rothenberg, E.V.** (2014). Transcriptional control of early T and B cell developmental choices. *Annual review of immunology* 32, 283-321.
- **Round, J.L., and Mazmanian, S.K.** (2009). The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature reviews. Immunology* 9, 313-323.
- **Rudlaff, R.M., Waters, C.M.** (2014). What is the role of cyclic di-GMP signalling within the human gut microbiome? *Microbiome Science and Medicine* 1:39-44.
- **Rutsch, F., MacDougall, M., Lu, C., Buers, I., Mamaeva, O., Nitschke, Y., Rice, G.I., Erlandsen, H., Kehl, H.G., Thiele, H., et al.** (2015). A specific IFIH1 gain-of-function mutation causes Singleton-Merten syndrome. *American journal of human genetics* 96, 275-282.
- **Saitoh, T., and Akira, S.** (2010). Regulation of innate immune responses by autophagy-related proteins. *The Journal of cell biology* 189, 925-935.
- **Saitoh, T., Fujita, N., Hayashi, T., Takahara, K., Satoh, T., Lee, H., Matsunaga, K., Kageyama, S., Otori, H., Noda, T., et al.** (2009). Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 20842-20846.
- **Saleh, M.** (2011). The machinery of Nod-like receptors: refining the paths to immunity and cell death. *Immunological reviews* 243, 235-246.
- **Saleiro, D., Mehrotra, S., Kroczyńska, B., Beauchamp, E.M., Lisowski, P., Majchrzak-Kita, B., Bhagat, T.D., Stein, B.L., McMahon, B., Altman, J.K., et al.** (2015). Central role of ULK1 in type I interferon signaling. *Cell reports* 11, 605-617.

- **Samuel, C.E.** (2001). Antiviral actions of interferons. *Clinical microbiology reviews* 14, 778-809, table of contents.
- **Santos, M.A., Sarmiento, L.M., Rebelo, M., Doce, A.A., Maillard, I., Dumortier, A., Neves, H., Radtke, F., Pear, W.S., Parreira, L., and Demengeot, J.** (2007). Notch1 engagement by Delta-like-1 promotes differentiation of B lymphocytes to antibody-secreting cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 15454-15459.
- **Sato, T., Onai, N., Yoshihara, H., Arai, F., Suda, T., and Ohteki, T.** (2009). Interferon regulatory factor-2 protects quiescent hematopoietic stem cells from type I interferon-dependent exhaustion. *Nature medicine* 15, 696-700.
- **Sauer, A.V., Brigida, I., Carriglio, N., and Aiuti, A.** (2012). Autoimmune dysregulation and purine metabolism in adenosine deaminase deficiency. *Frontiers in immunology* 3, 265.
- **Sauer, J.D., Sotelo-Troha, K., von Moltke, J., Monroe, K.M., Rae, C.S., Brubaker, S.W., Hyodo, M., Hayakawa, Y., Woodward, J.J., Portnoy, D.A., and Vance, R.E.** (2011). The N-ethyl-N-nitrosourea-induced Goldenticket mouse mutant reveals an essential function of Sting in the in vivo interferon response to *Listeria monocytogenes* and cyclic dinucleotides. *Infection and immunity* 79, 688-694.
- **Schattgen, S.A., and Fitzgerald, K.A.** (2011). The PYHIN protein family as mediators of host defenses. *Immunological reviews* 243, 109-118.
- **Schatz, D.G., and Ji, Y.** (2011). Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nature reviews. Immunology* 11, 251-263.
- **Schirmer, M., Smeekens, S.P., Vlamakis, H., Jaeger, M., Oosting, M., Franzosa, E.A., Horst, R.T., Jansen, T., Jacobs, L., Bonder, M.J., et al.** (2016). Linking the Human Gut Microbiome to Inflammatory Cytokine Production Capacity. *Cell* 167, 1897.
- **Schmitt, T.M., Ciofani, M., Petrie, H.T., and Zuniga-Pflucker, J.C.** (2004). Maintenance of T cell specification and differentiation requires recurrent notch receptor-ligand interactions. *The Journal of experimental medicine* 200, 469-479.
- **Schmitt, T.M., and Zuniga-Pflucker, J.C.** (2002). Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro. *Immunity* 17, 749-756.
- **Schneider, M., Zimmermann, A.G., Roberts, R.A., Zhang, L., Swanson, K.V., Wen, H., Davis, B.K., Allen, I.C., Holl, E.K., Ye, Z., et al.** (2012). The innate immune sensor NLRC3 attenuates Toll-like receptor signaling via modification of the signaling adaptor TRAF6 and transcription factor NF-kappaB. *Nature immunology* 13, 823-831.
- **Schneider, W.M., Chevillotte, M.D., and Rice, C.M.** (2014). Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annual review of immunology* 32, 513-545.
- **Schoggins, J.W., MacDuff, D.A., Imanaka, N., Gainey, M.D., Shrestha, B., Eitson, J.L., Mar, K.B., Richardson, R.B., Ratushny, A.V., Litvak, V., et al.** (2014). Pan-viral specificity of IFN-induced genes reveals new roles for cGAS in innate immunity. *Nature* 505, 691-695.
- **Schoggins, J.W., and Rice, C.M.** (2011). Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Current opinion in virology* 1, 519-525.
- **Seillet, C., Belz, G.T., and Huntington, N.D.** (2016). Development, Homeostasis, and Heterogeneity of NK Cells and ILC1. *Current topics in microbiology and immunology* 395, 37-61.
- **Seita, J., and Weissman, I.L.** (2010). Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine* 2, 640-653.
- **Semerad, C.L., Mercer, E.M., Inlay, M.A., Weissman, I.L., and Murre, C.** (2009). E2A proteins maintain the hematopoietic stem cell pool and promote the maturation of myelolymphoid and myeloerythroid progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 1930-1935.

- **Seo, G.J., Yang, A., Tan, B., Kim, S., Liang, Q., Choi, Y., Yuan, W., Feng, P., Park, H.S., and Jung, J.U.** (2015). Akt Kinase-Mediated Checkpoint of cGAS DNA Sensing Pathway. *Cell reports* 13, 440-449.
- **Seo, W., and Taniuchi, I.** (2016). Transcriptional regulation of early T-cell development in the thymus. *European journal of immunology* 46, 531-538.
- **Serafini, N., Voshenrich, C.A., and Di Santo, J.P.** (2015). Transcriptional regulation of innate lymphoid cell fate. *Nature reviews. Immunology* 15, 415-428.
- **Seth, R.B., Sun, L., Ea, C.K., and Chen, Z.J.** (2005). Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* 122, 669-682.
- **Shah, D.K., and Zuniga-Pflucker, J.C.** (2014). An overview of the intrathymic intricacies of T cell development. *Journal of immunology* 192, 4017-4023.
- **Sharma, S., Campbell, A.M., Chan, J., Schattgen, S.A., Orlowski, G.M., Nayar, R., Huyler, A.H., Nundel, K., Mohan, C., Berg, L.J., et al.** (2015). Suppression of systemic autoimmunity by the innate immune adaptor STING. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, E710-717.
- **Shi, M., Deng, W., Bi, E., Mao, K., Ji, Y., Lin, G., Wu, X., Tao, Z., Li, Z., Cai, X., et al.** (2008). TRIM30 alpha negatively regulates TLR-mediated NF-kappa B activation by targeting TAB2 and TAB3 for degradation. *Nature immunology* 9, 369-377.
- **Sichien, D., Scott, C.L., Martens, L., Vanderkerken, M., Van Gassen, S., Plantinga, M., Joeris, T., De Prijck, S., Vanhoutte, L., Vanheerswynghe, M., et al.** (2016). IRF8 Transcription Factor Controls Survival and Function of Terminally Differentiated Conventional and Plasmacytoid Dendritic Cells, Respectively. *Immunity* 45, 626-640.
- **Simmons, S., Knoll, M., Drewell, C., Wolf, I., Mollenkopf, H.J., Bouquet, C., and Melchers, F.** (2012). Biphentotypic B-lymphoid/myeloid cells expressing low levels of Pax5: potential targets of BAL development. *Blood* 120, 3688-3698.
- **Sitnicka, E., Buza-Vidas, N., Ahlenius, H., Cilio, C.M., Gekas, C., Nygren, J.M., Mansson, R., Cheng, M., Jensen, C.T., Svensson, M., et al.** (2007). Critical role of FLT3 ligand in IL-7 receptor independent T lymphopoiesis and regulation of lymphoid-primed multipotent progenitors. *Blood* 110, 2955-2964.
- **Smith, J.N., Kanwar, V.S., and MacNamara, K.C.** (2016). Hematopoietic Stem Cell Regulation by Type I and II Interferons in the Pathogenesis of Acquired Aplastic Anemia. *Frontiers in immunology* 7, 330.
- **Spaapen, R.M., Leung, M.Y., Fuertes, M.B., Kline, J.P., Zhang, L., Zheng, Y., Fu, Y.X., Luo, X., Cohen, K.S., and Gajewski, T.F.** (2014). Therapeutic activity of high-dose intratumoral IFN-beta requires direct effect on the tumor vasculature. *Journal of immunology* 193, 4254-4260.
- **Speer, S.D., Li, Z., Buta, S., Payelle-Brogard, B., Qian, L., Vigant, F., Rubino, E., Gardner, T.J., Wedeking, T., Hermann, M., et al.** (2016). ISG15 deficiency and increased viral resistance in humans but not mice. *Nature communications* 7, 11496.
- **Spooner, C.J., Cheng, J.X., Pujadas, E., Laslo, P., and Singh, H.** (2009). A recurrent network involving the transcription factors PU.1 and Gfi1 orchestrates innate and adaptive immune cell fates. *Immunity* 31, 576-586.
- **Staal, F.J., and Clevers, H.C.** (2003). Wnt signaling in the thymus. *Current opinion in immunology* 15, 204-208.
- **Starokadomskyy, P., Gemelli, T., Rios, J.J., Xing, C., Wang, R.C., Li, H., Pokatayev, V., Dozmorov, I., Khan, S., Miyata, N., et al.** (2016). DNA polymerase-alpha regulates the activation of type I interferons through cytosolic RNA:DNA synthesis. *Nature immunology* 17, 495-504.
- **Stepensky, P., Keller, B., Abuzaitoun, O., Shaag, A., Yaacov, B., Unger, S., Seidl, M., Rizzi, M., Weintraub, M., Elpeleg, O., and Warnatz, K.** (2015). Extending the clinical and immunological phenotype of human interleukin-21 receptor deficiency. *Haematologica* 100, e72-76.

- **Stetson, D.B., Ko, J.S., Heidmann, T., and Medzhitov, R.** (2008). Trex1 prevents cell-intrinsic initiation of autoimmunity. *Cell* 134, 587-598.
- **Strasser, D., Neumann, K., Bergmann, H., Marakalala, M.J., Guler, R., Rojowska, A., Hopfner, K.P., Brombacher, F., Urlaub, H., Baier, G., et al.** (2012). Syk kinase-coupled C-type lectin receptors engage protein kinase C-sigma to elicit Card9 adaptor-mediated innate immunity. *Immunity* 36, 32-42.
- **Sun, H., Zhang, Q., Jing, Y.Y., Zhang, M., Wang, H.Y., Cai, Z., Liuyu, T., Zhang, Z.D., Xiong, T.C., Wu, Y., et al.** (2017). USP13 negatively regulates antiviral responses by deubiquitinating STING. *Nature communications* 8, 15534.
- **Sun, L., Wu, J., Du, F., Chen, X., and Chen, Z.J.** (2013). Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science* 339, 786-791.
- **Sun, W., Li, Y., Chen, L., Chen, H., You, F., Zhou, X., Zhou, Y., Zhai, Z., Chen, D., and Jiang, Z.** (2009). ERIS, an endoplasmic reticulum IFN stimulator, activates innate immune signaling through dimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 8653-8658.
- **Sun, W., Yu, Y., Dotti, G., Shen, T., Tan, X., Savoldo, B., Pass, A.K., Chu, M., Zhang, D., Lu, X., et al.** (2009). PPM1A and PPM1B act as IKKbeta phosphatases to terminate TNFalpha-induced IKKbeta-NF-kappaB activation. *Cellular signalling* 21, 95-102.
- **Surpris, G., and Poltorak, A.** (2016). The expanding regulatory network of STING-mediated signaling. *Current opinion in microbiology* 32, 144-150.
- **Taghon, T., Yui, M.A., Pant, R., Diamond, R.A., and Rothenberg, E.V.** (2006). Developmental and molecular characterization of emerging beta- and gammadelta-selected pre-T cells in the adult mouse thymus. *Immunity* 24, 53-64.
- **Takaoka, A., Wang, Z., Choi, M.K., Yanai, H., Negishi, H., Ban, T., Lu, Y., Miyagishi, M., Kodama, T., Honda, K., et al.** (2007). DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* 448, 501-505.
- **Takayanagi, H., Kim, S., and Taniguchi, T.** (2002). Signaling crosstalk between RANKL and interferons in osteoclast differentiation. *Arthritis research* 4 Suppl 3, S227-232.
- **Takekawa, M., Maeda, T., and Saito, H.** (1998). Protein phosphatase 2Calpha inhibits the human stress-responsive p38 and JNK MAPK pathways. *The EMBO journal* 17, 4744-4752.
- **Takeuchi, O., and Akira, S.** (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140, 805-820.
- **Tan, J.B., Xu, K., Cretegy, K., Visan, I., Yuan, J.S., Egan, S.E., and Guidos, C.J.** (2009). Lunatic and manic fringe cooperatively enhance marginal zone B cell precursor competition for delta-like 1 in splenic endothelial niches. *Immunity* 30, 254-263.
- **Tanaka, Y., and Chen, Z.J.** (2012). STING specifies IRF3 phosphorylation by TBK1 in the cytosolic DNA signaling pathway. *Science signaling* 5, ra20.
- **Tang, D., Kang, R., Coyne, C.B., Zeh, H.J., and Lotze, M.T.** (2012). PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunological reviews* 249, 158-175.
- **Tang, E.D., and Wang, C.Y.** (2015). Single amino acid change in STING leads to constitutive active signaling. *PLoS one* 10, e0120090.
- **Tao, J., Zhou, X., and Jiang, Z.** (2016). cGAS-cGAMP-STING: The three musketeers of cytosolic DNA sensing and signaling. *IUBMB life* 68, 858-870.
- **Tasher, D., and Dalal, I.** (2012). The genetic basis of severe combined immunodeficiency and its variants. *The application of clinical genetics* 5, 67-80.

- **Taylor, P.R., Tsoni, S.V., Willment, J.A., Dennehy, K.M., Rosas, M., Findon, H., Haynes, K., Steele, C., Botto, M., Gordon, S., and Brown, G.D.** (2007). Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection. *Nature immunology* 8, 31-38.
- **Thomas, M., Calamito, M., Srivastava, B., Maillard, I., Pear, W.S., and Allman, D.** (2007). Notch activity synergizes with B-cell-receptor and CD40 signaling to enhance B-cell activation. *Blood* 109, 3342-3350.
- **Ting, J.P., Lovering, R.C., Alnemri, E.S., Bertin, J., Boss, J.M., Davis, B.K., Flavell, R.A., Girardin, S.E., Godzik, A., Harton, J.A., et al.** (2008). The NLR gene family: a standard nomenclature. *Immunity* 28, 285-287.
- **Tokoyoda, K., Egawa, T., Sugiyama, T., Choi, B.I., and Nagasawa, T.** (2004). Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity* 20, 707-718.
- **Trinchieri, G.** (2010). Type I interferon: friend or foe? *The Journal of experimental medicine* 207, 2053-2063.
- **Tsapogas, P., Zandi, S., Ahsberg, J., Zetterblad, J., Welinder, E., Jonsson, J.I., Mansson, R., Qian, H., and Sigvardsson, M.** (2011). IL-7 mediates Ebf-1-dependent lineage restriction in early lymphoid progenitors. *Blood* 118, 1283-1290.
- **Tschurtschenthaler, M., Wang, J., Fricke, C., Fritz, T.M., Niederreiter, L., Adolph, T.E., Sarcevic, E., Kunzel, S., Offner, F.A., Kalinke, U., et al.** (2014). Type I interferon signalling in the intestinal epithelium affects Paneth cells, microbial ecology and epithelial regeneration. *Gut* 63, 1921-1931.
- **Tsuchida, T., Zou, J., Saitoh, T., Kumar, H., Abe, T., Matsuura, Y., Kawai, T., and Akira, S.** (2010). The ubiquitin ligase TRIM56 regulates innate immune responses to intracellular double-stranded DNA. *Immunity* 33, 765-776.
- **Tsuji, M., Yurasov, S., Velinzon, K., Thomas, S., Nussenzweig, M.C., and Wardemann, H.** (2006). A checkpoint for autoreactivity in human IgM+ memory B cell development. *The Journal of experimental medicine* 203, 393-400.
- **Tussiwand, R., Bosco, N., Ceredig, R., and Rolink, A.G.** (2009). Tolerance checkpoints in B-cell development: Johnny B good. *European journal of immunology* 39, 2317-2324.
- **Ueda, Y., Kondo, M., and Kelsoe, G.** (2005). Inflammation and the reciprocal production of granulocytes and lymphocytes in bone marrow. *The Journal of experimental medicine* 201, 1771-1780.
- **Unterholzner, L., Keating, S.E., Baran, M., Horan, K.A., Jensen, S.B., Sharma, S., Sirois, C.M., Jin, T., Latz, E., Xiao, T.S., et al.** (2010). IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nature immunology* 11, 997-1004.
- **Vacca, P., Montaldo, E., Croxatto, D., Moretta, F., Bertaina, A., Vitale, C., Locatelli, F., Mingari, M.C., and Moretta, L.** (2016). NK Cells and Other Innate Lymphoid Cells in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Frontiers in immunology* 7, 188.
- **Van De Wiele, C.J., Marino, J.H., Murray, B.W., Vo, S.S., Whetsell, M.E., and Teague, T.K.** (2004). Thymocytes between the beta-selection and positive selection checkpoints are nonresponsive to IL-7 as assessed by STAT-5 phosphorylation. *Journal of immunology* 172, 4235-4244.
- **Vantourout, P., and Hayday, A.** (2013). Six-of-the-best: unique contributions of gammadelta T cells to immunology. *Nature reviews. Immunology* 13, 88-100.
- **Vermijlen, D., and Prinz, I.** (2014). Ontogeny of Innate T Lymphocytes - Some Innate Lymphocytes are More Innate than Others. *Frontiers in immunology* 5, 486.
- **Villarroya-Beltri, C., Guerra, S., and Sanchez-Madrid, F.** (2017). ISGylation - a key to lock the cell gates for preventing the spread of threats. *Journal of cell science* 130, 2961-2969.
- **von Boehmer, H.** (1997). Aspects of lymphocyte developmental biology. *Immunology today* 18, 260-262.

- **Walker, J.A., and McKenzie, A.N.** (2013). Development and function of group 2 innate lymphoid cells. *Current opinion in immunology* 25, 148-155.
- **Wang, H., Kadlecsek, T.A., Au-Yeung, B.B., Goodfellow, H.E., Hsu, L.Y., Freedman, T.S., and Weiss, A.** (2010). ZAP-70: an essential kinase in T-cell signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, a002279.
- **Wang, Q., Liu, X., Cui, Y., Tang, Y., Chen, W., Li, S., Yu, H., Pan, Y., and Wang, C.** (2014). The E3 ubiquitin ligase AMFR and INSIG1 bridge the activation of TBK1 kinase by modifying the adaptor STING. *Immunity* 41, 919-933.
- **Wang, X., Majumdar, T., Kessler, P., Ozhegov, E., Zhang, Y., Chattopadhyay, S., Barik, S., and Sen, G.C.** (2016). STING Requires the Adaptor TRIF to Trigger Innate Immune Responses to Microbial Infection. *Cell host & microbe* 20, 329-341.
- **Wang, X., Wu, W., Zhang, W., Leland Booth, J., Duggan, E.S., Tian, L., More, S., Zhao, Y.D., Sawh, R.N., Liu, L., et al.** (2017). RIG-I overexpression decreases mortality of cigarette smoke exposed mice during influenza A virus infection. *Respiratory research* 18, 166.
- **Wang, Y., Lian, Q., Yang, B., Yan, S., Zhou, H., He, L., Lin, G., Lian, Z., Jiang, Z., and Sun, B.** (2015). TRIM30alpha Is a Negative-Feedback Regulator of the Intracellular DNA and DNA Virus-Triggered Response by Targeting STING. *PLoS pathogens* 11, e1005012.
- **Weiss, G., Maaetoft-Udsen, K., Stifter, S.A., Hertzog, P., Goriely, S., Thomsen, A.R., Paludan, S.R., and Frokiaer, H.** (2012). MyD88 drives the IFN-beta response to *Lactobacillus acidophilus* in dendritic cells through a mechanism involving IRF1, IRF3, and IRF7. *Journal of immunology* 189, 2860-2868.
- **Welinder, E., Ahsberg, J., and Sigvardsson, M.** (2011). B-lymphocyte commitment: identifying the point of no return. *Seminars in immunology* 23, 335-340.
- **Whitmore, K.V., and Gaspar, H.B.** (2016). Adenosine Deaminase Deficiency - More Than Just an Immunodeficiency. *Frontiers in immunology* 7, 314.
- **Wilson, A., and Trumpp, A.** (2006). Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nature reviews. Immunology* 6, 93-106.
- **Withers, D.R.** (2016). Innate lymphoid cell regulation of adaptive immunity. *Immunology* 149, 123-130.
- **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 RORalpha is critical for nuocyte development. *Nature immunology* 13, 229-236.
- **Woo, S.R., Fuertes, M.B., Corrales, L., Spranger, S., Furdyna, M.J., Leung, M.Y., Duggan, R., Wang, Y., Barber, G.N., Fitzgerald, K.A., et al.** (2014). STING-dependent cytosolic DNA sensing mediates innate immune recognition of immunogenic tumors. *Immunity* 41, 830-842.
- **Wu, J., and Chen, Z.J.** (2014). Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids. *Annual review of immunology* 32, 461-488.
- **Wu, J., Sun, L., Chen, X., Du, F., Shi, H., Chen, C., and Chen, Z.J.** (2013). Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science* 339, 826-830.
- **Wu, J.J., Li, W., Shao, Y., Avey, D., Fu, B., Gillen, J., Hand, T., Ma, S., Liu, X., Miley, W., et al.** (2015). Inhibition of cGAS DNA Sensing by a Herpesvirus Virion Protein. *Cell host & microbe* 18, 333-344.
- **Wu, X., Yang, J., Na, T., Zhang, K., Davidoff, A.M., Yuan, B.Z., and Wang, Y.** (2017). RIG-I and IL-6 are negative-feedback regulators of STING induced by double-stranded DNA. *PLoS one* 12, e0182961.
- **Xia, P., Ye, B., Wang, S., Zhu, X., Du, Y., Xiong, Z., Tian, Y., and Fan, Z.** (2016). Glutamylation of the DNA sensor cGAS regulates its binding and synthase activity in antiviral immunity. *Nature immunology* 17, 369-378.
- **Xie, Z., and Klionsky, D.J.** (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nature cell biology* 9, 1102-1109.

- **Xing, Y., and Hogquist, K.A.** (2012). T-cell tolerance: central and peripheral. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4.
- **Xu, S., Huo, J., Gunawan, M., Su, I.H., and Lam, K.P.** (2009). Activated dectin-1 localizes to lipid raft microdomains for signaling and activation of phagocytosis and cytokine production in dendritic cells. *The Journal of biological chemistry* 284, 22005-22011.
- **Yashiro-Ohtani, Y., Ohtani, T., and Pear, W.S.** (2010). Notch regulation of early thymocyte development. *Seminars in immunology* 22, 261-269.
- **Yi, G., Brendel, V.P., Shu, C., Li, P., Palanathan, S., and Cheng Kao, C.** (2013). Single nucleotide polymorphisms of human STING can affect innate immune response to cyclic dinucleotides. *PLoS one* 8, e77846.
- **Yin, Q., Fu, T.M., Li, J., and Wu, H.** (2015). Structural biology of innate immunity. *Annual review of immunology* 33, 393-416.
- **Yin, Q., Tian, Y., Kabaleeswaran, V., Jiang, X., Tu, D., Eck, M.J., Chen, Z.J., and Wu, H.** (2012). Cyclic di-GMP sensing via the innate immune signaling protein STING. *Molecular cell* 46, 735-745.
- **Yoh, S.M., Schneider, M., Seifried, J., Soonthornvacharin, S., Akleh, R.E., Olivieri, K.C., De Jesus, P.D., Ruan, C., de Castro, E., Ruiz, P.A., et al.** (2015). PQBP1 Is a Proximal Sensor of the cGAS-Dependent Innate Response to HIV-1. *Cell* 161, 1293-1305.
- **Yoneyama, M., and Fujita, T.** (2008). Structural mechanism of RNA recognition by the RIG-I-like receptors. *Immunity* 29, 178-181.
- **Yoneyama, M., and Fujita, T.** (2009). RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors. *Immunological reviews* 227, 54-65.
- **Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y.M., Gale, M., Jr., Akira, S., et al.** (2005). Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *Journal of immunology* 175, 2851-2858.
- **Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., and Fujita, T.** (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nature immunology* 5, 730-737.
- **Yu, L., Chen, Y., and Tooze, S.A.** (2018). Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms. *Autophagy* 14, 207-215.
- **Yui, M.A., Feng, N., and Rothenberg, E.V.** (2010). Fine-scale staging of T cell lineage commitment in adult mouse thymus. *Journal of immunology* 185, 284-293.
- **Zampeli, E., Vakrakou, A.G., Germenis, A.E., Mavragani, C.P., Moutsopoulos, H.M., Manoussakis, M.N., et al.** (2017). A case of sting-associated vasculopathy with onset in infancy (SAVI) in a young adult male with a novel TMEM173 gene mutation. *Annals of the Rheumatic Diseases* 76:A72.
- **Zarin, P., Chen, E.L., In, T.S., Anderson, M.K., and Zuniga-Pflucker, J.C.** (2015). Gamma delta T-cell differentiation and effector function programming, TCR signal strength, when and how much? *Cellular immunology* 296, 70-75.
- **Zelenay, S., Keller, A.M., Whitney, P.G., Schraml, B.U., Deddouche, S., Rogers, N.C., Schulz, O., Sancho, D., and Reis e Sousa, C.** (2012). The dendritic cell receptor DNGR-1 controls endocytic handling of necrotic cell antigens to favor cross-priming of CTLs in virus-infected mice. *The Journal of clinical investigation* 122, 1615-1627.
- **Zelensky, A.N., and Greedy, J.E.** (2005). The C-type lectin-like domain superfamily. *The FEBS journal* 272, 6179-6217.
- **Zhang, G., Chan, B., Samarina, N., Abere, B., Weidner-Glunde, M., Buch, A., Pich, A., Brinkmann, M.M., and Schulz, T.F.** (2016). Cytoplasmic isoforms of Kaposi sarcoma herpesvirus LANA recruit and antagonize the innate immune DNA sensor cGAS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113, E1034-1043.

- **Zhang, G., Chan, B., Samarina, N., Abere, B., Weidner-Glunde, M., Buch, A., Pich, A., Brinkmann, M.M., and Schulz, T.F.** (2016). Cytoplasmic isoforms of Kaposi sarcoma herpesvirus LANA recruit and antagonize the innate immune DNA sensor cGAS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113, E1034-1043.
- **Zhang, J., Hu, M.M., Wang, Y.Y., and Shu, H.B.** (2012). TRIM32 protein modulates type I interferon induction and cellular antiviral response by targeting MITA/STING protein for K63-linked ubiquitination. *The Journal of biological chemistry* 287, 28646-28655.
- **Zhang, J.M., and An, J.** (2007). Cytokines, inflammation, and pain. *International anesthesiology clinics* 45, 27-37.
- **Zhang, L., Dang, R.J., Yang, Y.M., Cui, D.C., Li, P., Ni, Y.L., Hao, T., Wang, C., Jiang, X.X., and Fang, N.Z.** (2016). Delta-Like-1 Changes the Immunomodulatory Property of OP9 Cells. *Stem cells international* 2016, 1628352.
- **Zhang, L., Mo, J., Swanson, K.V., Wen, H., Petrucelli, A., Gregory, S.M., Zhang, Z., Schneider, M., Jiang, Y., Fitzgerald, K.A., et al.** (2014). NLR3, a member of the NLR family of proteins, is a negative regulator of innate immune signaling induced by the DNA sensor STING. *Immunity* 40, 329-341.
- **Zhang, P., Iwasaki-Arai, J., Iwasaki, H., Fenyus, M.L., Dayaram, T., Owens, B.M., Shigematsu, H., Levantini, E., Huettner, C.S., Lekstrom-Himes, J.A., et al.** (2004). Enhancement of hematopoietic stem cell repopulating capacity and self-renewal in the absence of the transcription factor C/EBP alpha. *Immunity* 21, 853-863.
- **Zhang, Q., Iida, R., Yokota, T., and Kincade, P.W.** (2013). Early events in lymphopoiesis: an update. *Current opinion in hematology* 20, 265-272.
- **Zhang, X., Shi, H., Wu, J., Zhang, X., Sun, L., Chen, C., and Chen, Z.J.** (2013). Cyclic GMP-AMP containing mixed phosphodiester linkages is an endogenous high-affinity ligand for STING. *Molecular cell* 51, 226-235.
- **Zhang, X., Wu, J., Du, F., Xu, H., Sun, L., Chen, Z., Brautigam, C.A., Zhang, X., and Chen, Z.J.** (2014). The cytosolic DNA sensor cGAS forms an oligomeric complex with DNA and undergoes switch-like conformational changes in the activation loop. *Cell reports* 6, 421-430.
- **Zhang, Z., Yuan, B., Bao, M., Lu, N., Kim, T., and Liu, Y.J.** (2011). The helicase DDX41 senses intracellular DNA mediated by the adaptor STING in dendritic cells. *Nature immunology* 12, 959-965.
- **Zhao, Y., Liang, L., Fan, Y., Sun, S., An, L., Shi, Z., Cheng, J., Jia, W., Sun, W., Mori-Akiyama, Y., et al.** (2012). PPM1B negatively regulates antiviral response via dephosphorylating TBK1. *Cellular signalling* 24, 2197-2204.
- **Zhong, B., Yang, Y., Li, S., Wang, Y.Y., Li, Y., Diao, F., Lei, C., He, X., Zhang, L., Tien, P., and Shu, H.B.** (2008). The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation. *Immunity* 29, 538-550.
- **Zhong, B., Zhang, L., Lei, C., Li, Y., Mao, A.P., Yang, Y., Wang, Y.Y., Zhang, X.L., and Shu, H.B.** (2009). The ubiquitin ligase RNF5 regulates antiviral responses by mediating degradation of the adaptor protein MITA. *Immunity* 30, 397-407.
- **Zhou, Q., Lin, H., Wang, S., Wang, S., Ran, Y., Liu, Y., Ye, W., Xiong, X., Zhong, B., Shu, H.B., and Wang, Y.Y.** (2014). The ER-associated protein ZDHHC1 is a positive regulator of DNA virus-triggered, MITA/STING-dependent innate immune signaling. *Cell host & microbe* 16, 450-461.
- **Zoller, E.E., Lykens, J.E., Terrell, C.E., Aliberti, J., Filipovich, A.H., Henson, P.M., and Jordan, M.B.** (2011). Hemophagocytosis causes a consumptive anemia of inflammation. *The Journal of experimental medicine* 208, 1203-1214.
- **Zook, E.C., and Kee, B.L.** (2016). Development of innate lymphoid cells. *Nature immunology* 17, 775-782.

- **Zucchini, N., Crozat, K., Baranek, T., Robbins, S.H., Altfeld, M., and Dalod, M.** (2008). Natural killer cells in immunodefense against infective agents. *Expert review of anti-infective therapy* 6, 867-885.
- **Zuniga-Pflucker, J.C.** (2004). T-cell development made simple. *Nature reviews. Immunology* 4, 67-72.

ANNEXES

En annexe, vous trouverez des travaux auxquels j'ai participé en tant que co-auteurs, mais qui n'ont pas constitués le travail principal de ma thèse.



Trib1 Is Overexpressed in Systemic Lupus Erythematosus, While It Regulates Immunoglobulin Production in Murine B Cells

Léa Simoni¹, Virginia Delgado¹, Julie Ruer-Laventie¹, Delphine Bouis¹, Anne Soley^{1,2}, Vincent Heyer³, Isabelle Robert^{3,4,5,6}, Vincent Gies^{1,2,7}, Thierry Martin^{1,2,7}, Anne-Sophie Korganow^{1,2,7}, Bernardo Reina San Martin^{3,4,5,6} and Pauline Soulas-Sprauel^{1,2,7,8*}

¹CNRS UPR 3572 "Immunopathology and Therapeutic Chemistry"/Laboratory of Excellence Medalis, Institute of Molecular and Cellular Biology (IMC), Strasbourg, France, ²UFR Médecine, Université de Strasbourg, Strasbourg, France, ³Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Illkirch, France, ⁴Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U964, Illkirch, France, ⁵Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR7104, Illkirch, France, ⁶Université de Strasbourg, Illkirch, France, ⁷Department of Clinical Immunology and Internal Medicine, National Reference Center for Autoimmune Diseases, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France, ⁸UFR Sciences pharmaceutiques, Université de Strasbourg, Illkirch-Graffenstaden, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Ignacio Sanz,
Emory University,
United States

Reviewed by:

Lee Ann Garrett-Sinha,
University at Buffalo,
United States

Laura Mandik-Nayak,
Lankenau Institute
for Medical Research,
United States

*Correspondence:

Pauline Soulas-Sprauel
pauline.soulas@
ibmc-cnrs.unistra.fr

Specialty section:

This article was submitted
to B Cell Biology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 16 October 2017

Accepted: 09 February 2018

Published: 15 March 2018

Citation:

Simoni L, Delgado V, Ruer-Laventie J, Bouis D, Soley A, Heyer V, Robert I, Gies V, Martin T, Korganow A-S, San Martin BR and Soulas-Sprauel P (2018) Trib1 Is Overexpressed in Systemic Lupus Erythematosus, While It Regulates Immunoglobulin Production in Murine B Cells. *Front. Immunol.* 9:373. doi: 10.3389/fimmu.2018.00373

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a severe and heterogeneous autoimmune disease with a complex genetic etiology, characterized by the production of various pathogenic autoantibodies, which participate in end-organ damages. The majority of human SLE occurs in adults as a polygenic disease, and clinical flares interspersed with silent phases of various lengths characterize the usual evolution of the disease in time. Trying to understand the mechanism of the different phenotypic traits of the disease, and considering the central role of B cells in SLE, we previously performed a detailed wide analysis of gene expression variation in B cells from quiescent SLE patients. This analysis pointed out an overexpression of *TRIB1*. *TRIB1* is a pseudokinase that has been implicated in the development of leukemia and also metabolic disorders. It is hypothesized that *Trib1* plays an adapter or scaffold function in signaling pathways, notably in MAPK pathways. Therefore, we planned to understand the functional significance of *TRIB1* overexpression in B cells in SLE. We produced a new knock-in model with B-cell-specific overexpression of *Trib1*. We showed that overexpression of *Trib1* specifically in B cells does not impact B cell development nor induce any development of SLE symptoms in the mice. By contrast, *Trib1* has a negative regulatory function on the production of immunoglobulins, notably IgG1, but also on the production of autoantibodies in an induced model. We observed a decrease of Erk activation in BCR-stimulated *Trib1* overexpressing B cells. Finally, we searched for *Trib1* partners in B cells by proteomic analysis in order to explore the regulatory function of *Trib1* in B cells. Interestingly, we find an interaction between *Trib1* and CD72, a negative regulator of B cells whose deficiency in mice leads to the development of autoimmunity. In conclusion, the overexpression of *Trib1* could be one of the molecular pathways implicated in the negative regulation of B cells during SLE.

Keywords: lupus, B cells, Trib1, mouse model, Ig secretion, negative regulator

INTRODUCTION

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a severe and heterogeneous systemic autoimmune disease, mostly affecting women. Patients produce various pathogenic autoantibodies such as antinuclear antibodies (anti double-stranded DNA, anti-chromatin...), which participate in end-organ damages by a variety of mechanisms, notably *via* immune complex-mediated inflammation leading to glomerulonephritis and vasculitis, for example. The majority of human SLE occurs in adult and the usual evolution of the disease in time is characterized by clinical flares interspersed with silent phases of various lengths (1, 2). To date, we have no molecular explanation to the establishment and the maintenance of these clinically silent phases.

Several lines of evidence indicate that B cells are essential to the disease process and could present intrinsic abnormalities (3, 4): (1) B cells produce the autoantibodies; (2) in murine spontaneous models of SLE, B cells are activated before the disease onset, and in humans, autoantibodies are detectable long before the first symptoms (5); (3) murine models of SLE mice devoid of mature B cells no longer develop lupus phenotype (6); (4) it seems that the important role of B cells in lupus could also implicate their function of antigen presentation to CD4 T cells, and/or cytokine secretion (7). Intrinsic B cell abnormalities are illustrated by the fact that (NZBXNZW)F1 B-lineage cells present an enhanced *in vitro* responsiveness to accessory cell-derived signals (8). Most importantly, the disease can be transferred in mice by B cells: immunodeficient SCID mice populated with pre-B cells from (NZBXNZW)F1 mice, but not those populated with pre-B cells from non-autoimmune mice, develop many of the autoimmune symptoms present in (NZBXNZW)F1 mice, suggesting that genetic defects responsible for the development of SLE disease in (NZBXNZW)F1 mice are intrinsic to their B cells (9).

Considering the central role of B cells in SLE, in a previous work, we performed a genome-wide transcriptome analysis of B cells in lupus patients using microarrays, focusing on the remission phase of the disease, in order to avoid gene expression variations linked to B cell activation which accompanies lupus flares (10). We notably identified an underexpression of *CARABIN*, and then defined Carabin as a new regulator of B cell function by functional genomics in new transgenic mouse models (11). In addition, we described an overexpression of *FKBP11*, which leads in mice to B cell tolerance breakdown and initiates plasma cell differentiation, two features of lupus B cells (12).

Our transcriptome analysis also pointed out an overexpression of *TRIB1* in B cells in quiescent SLE patients. Trib1 belongs to the tribbles family of proteins. The *tribbles* gene was first identified in *Drosophila* (13). In mammals, tribbles family of proteins is composed of three members: Trib1, Trib2, and Trib3, all pseudokinases, whose amino acids sequence is very highly conserved between human and mice. Despite high degrees of similarity between human tribbles protein sequences, Trib1, Trib2, and Trib3 show distinct patterns of expression in human tissues and cellular functions, and are linked to different diseases. Trib1 has been notably linked to the development of human myeloid leukemia and to the negative regulation of lipid metabolism and the development of metabolic disorders (14, 15). It is hypothesized that tribbles play

an adapter or scaffold function in signaling pathways, notably in MAPKs pathways (13, 16). Indeed, Trib1 interacts with MEK-1 (upstream activator of ERK) and MKK4 (upstream activator of JNK). Overexpression of Trib1 in HeLa and in murine bone marrow (BM) cells enhances the extent and rate of ERK phosphorylation (17, 18) and inhibits AP1 activity, leading notably to a repression of IL8 promoter (17). But it seems that the expression of tribbles is regulated in a cell-dependent manner, thus contributing to the cell-type specificity of MAPK responses (14). Trib1, as the other tribbles proteins, targets protein substrates to the proteasome and controls their E3 ligase-dependent ubiquitination (16). Trib1 is a serine/threonine pseudokinase containing a N-terminal PEST domain, and a central pseudokinase domain, which could position and regulate potential substrates targeting for ubiquitination. The C-terminal domain of Trib1 contains a MAPKK/MEK regulatory motif, which was shown to bind to MEK1 in some cell types, and an ubiquitin E3 ligase-targeting motif, which binds to COP1 (16). Trib1 is highly expressed in BM, peripheral blood leukocytes (with the highest expression in the myeloid compartment), thyroid gland, and pancreas (16, 17). In immune system, Trib1 is known to be critical for the development of M2 macrophages (19) and to interact with Foxp3 in regulatory T cells (20). However, its role in B cells is totally unknown.

After having confirmed *TRIB1* overexpression in B cells in an additional cohort group of quiescent SLE patients, we planned to understand the functional significance of *TRIB1* overexpression in B cells in human SLE. For this purpose, we generated a new knock-in (KI) model with B-cell-specific overexpression of *Trib1*. We showed that overexpression of *Trib1* specifically in B cells does not impact B cell development nor induce any development of SLE symptoms in the mice. By contrast, Trib1 has a negative regulatory function on production of immunoglobulins, notably IgG1, but also on the production of autoantibodies. Finally, we searched for Trib1 partners in B cells by proteomic analysis in order to decipher the mechanisms of regulatory function of Trib1 in B cells. We notably described for the first time in B cells the interaction between Trib1 and COP1, and with CD72, a negative regulator of B cells whose deficiency in mice leads to the development of autoimmunity. In conclusion, the overexpression of *Trib1* could be one of the molecular pathways implicated in the negative regulation of B cells during SLE.

MATERIALS AND METHODS

Patients

The first cohort comprised 17 patients and 9 age- and sex-matched healthy controls. SLE patients fulfilling at least four diagnostic criteria according to the American College of Rheumatology (21) were prospectively included, provided that they were in a quiescent phase of the disease (with a SLEDAI score less than 4) and were receiving minimal treatment [no immunosuppressive drugs and less than 10 mg of prednisone per day if they needed steroids (4 patients)]. 10 patients were treated with hydroxychloroquine. Purified CD19⁺ B cells from 17 patients blood sample ("cohort 1") and 9 age- and sex-matched controls were subjected to a pangenomic transcriptome analysis (Affymetrix GeneChip human genome U133 plus 2.0) (10). For the second cohort of patients

(“cohort 2”), 4 quiescent patients (3 females and 1 male) aging from 25 to 32 years old with the diagnosis of SLE were selected. Only patients with no treatment, or hydroxychloroquine, or steroids less than 20 mg per day and without immunosuppressive treatments in the previous 6 months, at the time of diagnosis, were included. Patients were compared to healthy age- and sex-matched individuals. Mature naive B cells (CD3⁺CD19⁺CD27⁻IgM⁺CD24^{low}CD38^{low}) were sorted (FACSaria II, BD Biosciences) and cell viability was assessed with DAPI (Sigma-Aldrich), before extraction of RNA for quantitative real-time RT-PCR analysis.

This study was approved by the ethics committee of the “Hôpitaux Universitaires de Strasbourg” and patients gave their written informed consent.

Mice

Total RNA was extracted from C57BL/6 total splenocytes using RNeasy Kit (Qiagen). cDNA synthesis was done using High Capacity Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). The coding sequence of mTrib1 (1118 pb, NM144549.4) was amplified from cDNA using the following primers: Forward 5'-ATGCGGGTTCGGTCCCGTGCG-3' and Reverse 5'-CTAGCAGAAGAAGGAACCTTATGTCCTAG-3'. The PCR conditions were as follows: 94°C for 5 min; 35 cycles at 94°C for 30 s, 58°C for 30 s, and 72°C for 1 min. The PCR product was firstly cloned in the pCR2.1 TA cloning vector (Invitrogen) then two AscI restriction sites were added by PCR using the following primers: Forward 5'-AAGGCGCGCCGCGCAGATCCAGGGATTACAAAGCCGGGGCCGCTCCGGCCAGGGCCGCGATGCGGGTTCGGTCCC-3' and Reverse 5'-AAAGGCGCGCCCTAGCAGAAGAAGGA-3'. The PCR conditions were as follows: 94°C for 5 min; 30 cycles at 94°C for 30 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 45 s. After a digestion step with AscI (Biolabs), the PCR product was cloned into the CTV Vector (Addgene) (22, 23). The Trib1-ROSA KI mutant mouse line was established at the MCI/ICS (Mouse Clinical Institute—Institut Clinique de la Souris, Illkirch, France¹). The linearized construct was electroporated in C57BL/6N mouse embryonic stem (ES) cells (ICS proprietary line). After G418 selection, targeted clones were identified by long-range PCR and further confirmed by Southern blot with an internal (Neo) probe and a 5' external probe. Two positive ES clones were validated by karyotype spreading and microinjected into BALB/C blastocysts. Resulting male chimeras were bred with wild-type C57BL/6N females. Germline transmission was achieved in the first litter. The presence of the transgene in the mice was assessed by a PCR performed on tail DNA, using the following primers: Forward 5'-ACGACCAAGTGACAGCAATG-3' and Reverse 5'-CTCGACCAGTTTAGTTACCC-3'. Trib1-ROSA Mb1Cre mice were obtained by crossing Trib1-ROSA KI mice with Mb1Cre Mice (24) that will allow *Trib1* over-expression specifically in B cells from the pro-B cell stage. The presence of the Mb1Cre transgene was assessed by a PCR performed on tail DNA, using the following primers: Forward 5'-ACCTCTGATGAAGTCAGGAAGAAC-3' and Reverse 5'-GCAGATGTCCTCACTCTGATTCT-3'. All animal

experiments were performed with the approval of the “Direction départementale des services vétérinaires” (Strasbourg, France) and protocols were approved by the ethics committee (“Comité d'éthique en matière d'Experimentation Animale de Strasbourg,” CREMEAS, approval number AL/02/15/09/11 and AL/31/38/02/13).

Quantitative Real-time RT-PCR Analysis

RNA was prepared with RNeasy Kit (Qiagen) and cDNA was obtained with High Capacity Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). For RNA isolated from patients' cells, a preamplification of 10 ng of cDNA was performed, with TaqMan[®] PreAmp Master Mix Kit (Applied Biosystems) on a T100[™] Thermal cycler (Biorad). Quantitative real-time PCR was performed on 10 ng cDNA using Taqman Universal Mastermix (Applied Biosystems) and Assays-on-Demand probes (Applied Biosystems) (Hprt1: Mm01318743_m1, Trib1: Mm00457875_m1, Pax5: Mm00435501_m1, Blimp1: Mm01187285_m1, total Xbp1: Mm00457357_m1, Bach2: Mm00464379_m1, Bcl-6: Mm00477633_m1, Irf4: Mm00516431_m1, Aicda: Mm00507771_m1, HPRT1: Hs01003267_m1, ACTB: Hs99999903_m1, GAPDH: Hs99999905_m1, TRIB1: Hs00179769_m1). Each sample was amplified in triplicate in a StepOnePlus real-time PCR machine (Applied Biosystems). Relative expression levels were calculated with the StepOne v2.1 software (Applied Biosystems), using the comparative cycle threshold method, and normalized to the endogenous control *Hprt1*, *Gapdh* and/or *Beta-actin*.

Flow Cytometry Analysis

Analyses of GFP expression, of cell phenotype, and class-switch recombination were performed on splenic, lymph nodes (LNs), thymic, and BM lymphoid populations by four-color fluorescence analysis according to standard protocols. The following antibodies were used: PE, PerCP, Cy5 or APC anti-mouse B220, CD3, CD4, CD8, CD19, CD21, CD23, CD5, CD86, I-A/I-E, CD44, IgM, IgG1, IgG3, and CD138 (all from BD Biosciences). Propidium iodide was used for discrimination of live and dead cells. For proliferation analysis, cells were permeabilized after extracellular staining and fixed with the cytofix/cytoperm permeabilization kit (BD Biosciences), then stained with the PerCP Cy5.5 anti-Ki67 antibody (BD Biosciences). For intracellular IgG1 staining, membrane B220 staining was performed along with a saturation step using goat anti-mouse IgG (5 µg/mL, Jackson ImmunoResearch) for 30 min at 4°C. After a washing step, cells were fixed with 100 µL of fixation buffer from Fixation/Permeabilization kit (eBioscience) during 20 min at room temperature, in the dark. Cells were then permeabilized with the permeabilization buffer from Fixation/Permeabilization kit (eBioscience) and incubated for 30 min at room temperature in the dark with anti-mouse IgG1 (PE, Southern Biotech) and washed before acquisition by a cytometer. For all stainings, cells were analyzed using the FACS Calibur (BD Biosciences). The data were analyzed with FlowJo software (Treestar).

Mice Immunization

3-month-old mice were injected intraperitoneally at days 0, 7, and 14 with, respectively, 50, 25, and 25 µg of LPS from *S. typhimurium* (Sigma) diluted in PBS; at days 0, 10, and 20 with 100 µg of

¹<http://www.ics-mci.fr/en/>.

Ovalbumin (OVA) (Sigma) associated with 250 µg of alum hydroxide; or at days 0 and 23 with, respectively, 100 and 10 µg of NP-KLH (Biosearch technology) associated with 250 µg of alum hydroxide.

Antibody Detection by ELISA

Total IgG, IgG1, IgG2b, IgG3, or IgM levels were measured in serum from 3- or 6-month-old mice, and in supernatant after 3 days of stimulation, as previously described (12). Anti-dsDNA autoantibodies were measured as previously described (12). Anti-OVA and anti-NP-specific antibodies were measured as previously described (11).

Cell Preparation and Culture

To evaluate *Trib1* overexpression within the different cell compartments, splenic mature CD43⁻ B cells, CD43⁺ splenocytes and splenic T cells were purified, using B-cell isolation kit (anti-CD43 (Ly-48) microbeads, Miltenyi Biotech) and Dynabeads Untouched Mouse T cells kit (Invitrogen) according to the supplier's protocols. To study the activation of splenic mature B cells *in vitro*, total splenocytes were plated at 1.10⁶ cells/ml in a culture medium composed of RPMI-1640 (Lonza) containing 10% (v/v) FCS (PAN), 50 mM β-Mercaptoethanol (Gibco), 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco), 10 mM HEPES (Lonza), and 1 mM Sodium Pyruvate (Lonza). Cells were stimulated with a combination of LPS (10 µg/mL, Sigma) and IL-4 (10 ng/mL, Sigma), or a combination of IL-4 (5 ng/mL, Sigma), IL-21 (10 ng/mL, Sigma), and anti-CD40 (10 µg/mL, BD Biosciences), or with agonists of TLR1/2 (250 ng/mL, PAM3CSK4, Invivogen), or TLR7 (1 µg/mL, Imiquimod, Invivogen) or TLR9 (5 µM, ODN2395, Invivogen). In some experiments, purified splenic mature B cells (CD43⁻) were plated at 1.10⁶ cells/ml and were stimulated for 3 or 4 days with a combination of LPS (10 µg/mL, Sigma) and IL-4 (10 ng/mL, Sigma) or with LPS only (10 µg/mL, Sigma) using the same culture medium described above for total splenic cells. For the analysis of IgG secretion after blockade of protein transport, GolgiStop™ (BD Biosciences), containing monensin, was added in the appropriate wells directly into the medium (final dilution of GolgiStop™: 1:1,000), 8 h before the acquisition with the cytometer.

To evaluate the activation of signaling pathways by immunoblot analysis, splenic sorted mature B cells were stimulated with F(ab')₂ goat anti-mouse IgM antibody at 10 µg/mL (Jackson ImmunoResearch).

Trib1-Flag Expression

Flag-tagged Trib1 and Flag-tagged GFP (negative control) were cloned using standard molecular biology into the pMX-P1E and the pQCXIP retroviral vectors respectively, then were used to establish stably expressing CH12F3 (CH12) cell lines (25) as described previously (26, 27).

Immunoblot Analysis

Immunoprecipitation (IP) products or protein extracts were loaded on a bisacrylamide gel. Primary antibodies and dilutions were as follows: rabbit anti-phospho Erk (Cell signaling, 1:1,000), rabbit anti-Total Erk (Cell signaling, 1:1,000), anti-phospho Syk (Cell signaling, 1:500), anti-Total Syk (Cell signaling, 1:1,000), mouse anti-phospho IκB (Cell signaling, 1:1,000), rabbit anti-Total IκB (Cell signaling, 1:1,000), mouse anti-Flag-M2 (Sigma,

1:1,000 or 1:20,000), anti-COP1 (Bethyl, 1:1,000), anti-CD72 (Santa Cruz Biotechnology, 1:1,000). The secondary antibodies and dilution were as follows: donkey anti-rabbit IgG (GE Healthcare, 1:10,000), mouse anti-rabbit light chain (Abcam, 1:20,000). The ratio phospho-p42/Total-p42 for one sample corresponds with the ratio between the values of phospho-Erk and total-Erk band density for that sample. The density of each band was measured with ImageJ software.

Anti-Flag IP and Mass Spectrometry Analysis

Cytoplasmic extracts from CH12-Trib1 and control cell lines were prepared using standard techniques. 20 mg of clarified extracts was taken into IP buffer [IP-300: 20 mM Tris, pH 7.9, 20% glycerol, 300 mM KCl, 0.125 mM EGTA, 0.25 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSE, 1× protease inhibitor cocktail (Roche), 100 U/ml Benzonase (EMD), 0.025% NP-40], and precleared with protein G-agarose beads and mouse IgG (GE Healthcare) for 1 h at 4°C. 40 µL of Flag M2 agarose beads were added (50% slurry; Sigma-Aldrich) and incubated overnight at 4°C. Proteins were eluted three times with 40 µL of Flag peptide (0.2 mg/mL; 30 min at 4°C). Eluted proteins were submitted to identification by mass spectrometry as previously described (27). Proteomics data are available in Table S2 in Supplementary Material.

Statistical Analysis

Statistical significance was calculated with a two-tailed Mann and Whitney test using Prism software (GraphPad). All data were presented as mean ± SD.

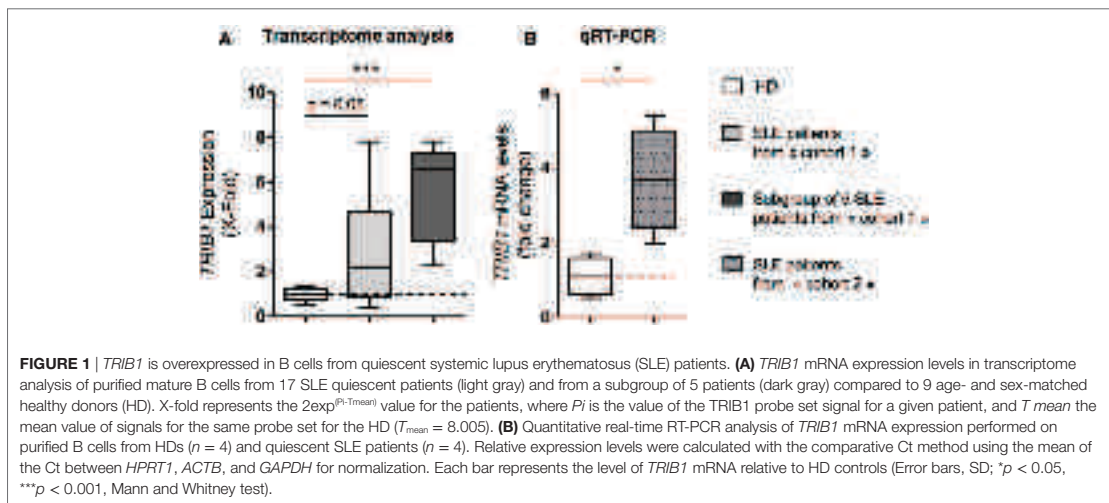
RESULTS

Overexpression of TRIB1 in B Cells in SLE Patients

We previously analyzed a pangenomic transcriptome of purified CD19⁺ peripheral B cells in patients with inactive SLE in comparison to B cells from age- and sex-matched controls (10). We pointed out a 2.8-times overexpression of *TRIB1* in all patients ($p = 0.049$) (Figure 1A). The overexpression of *TRIB1* was much higher (mean of 5.6-fold over healthy controls) in a subgroup of five patients (Figure 1A) displaying a similar and distinct gene expression pattern with many genes implicated in the unfolded protein response. This subgroup of five patients was not different from the other patients of the same cohort (cohort 1), considering their clinical or phenotypical characteristics (10). *TRIB1* overexpression was validated by quantitative real-time RT-PCR in a second cohort of SLE patients versus controls (Figure 1B).

Generation of B Cell-Specific Trib1 KI Conditional Mice

As the role of Trib1 in B cells and in autoimmunity has never been described, we decided to investigate in detail the possible role of *TRIB1* overexpression in B cell function and in the promotion of SLE. Therefore, we developed a functional genomic study in mice, by the generation of B cell-specific Trib1 KI conditional mice. We inserted the coding sequence for murine



trib1, preceded by the synthetic CAG promoter and a loxP-flanked Neo-STOP cassette, into the ubiquitously expressed ROSA26 locus in the genome of C57BL/6 mice. We used the CTV vector designed by Xiao et al. in Rajewsky's lab (22). A frt-flanked IRES-EGFP cassette, which is placed between the cloning site for *trib1* insertion and the polyadenylation signal (pA), allows the detection of cells in which excision of Neo-STOP cassette has been efficient and, therefore, constitutes a good reporter for *Trib1* overexpression (Figure 2A). The mice obtained by this strategy were named Trib1-ROSA mice. These Trib1-ROSA mice were used as controls in all experiments. Then, we developed a B cell-specific Trib1 KI model, by crossing Trib1-ROSA mice with Mb1 Cre animals. The *mb-1* gene encodes the BCR Ig- α subunit (CD79a), and is expressed from the very early pro-B cell stage in BM (24). The mice, overexpressing *Trib1* specifically in B cell lineage, will be thereafter named Trib1-ROSA Mb1Cre.

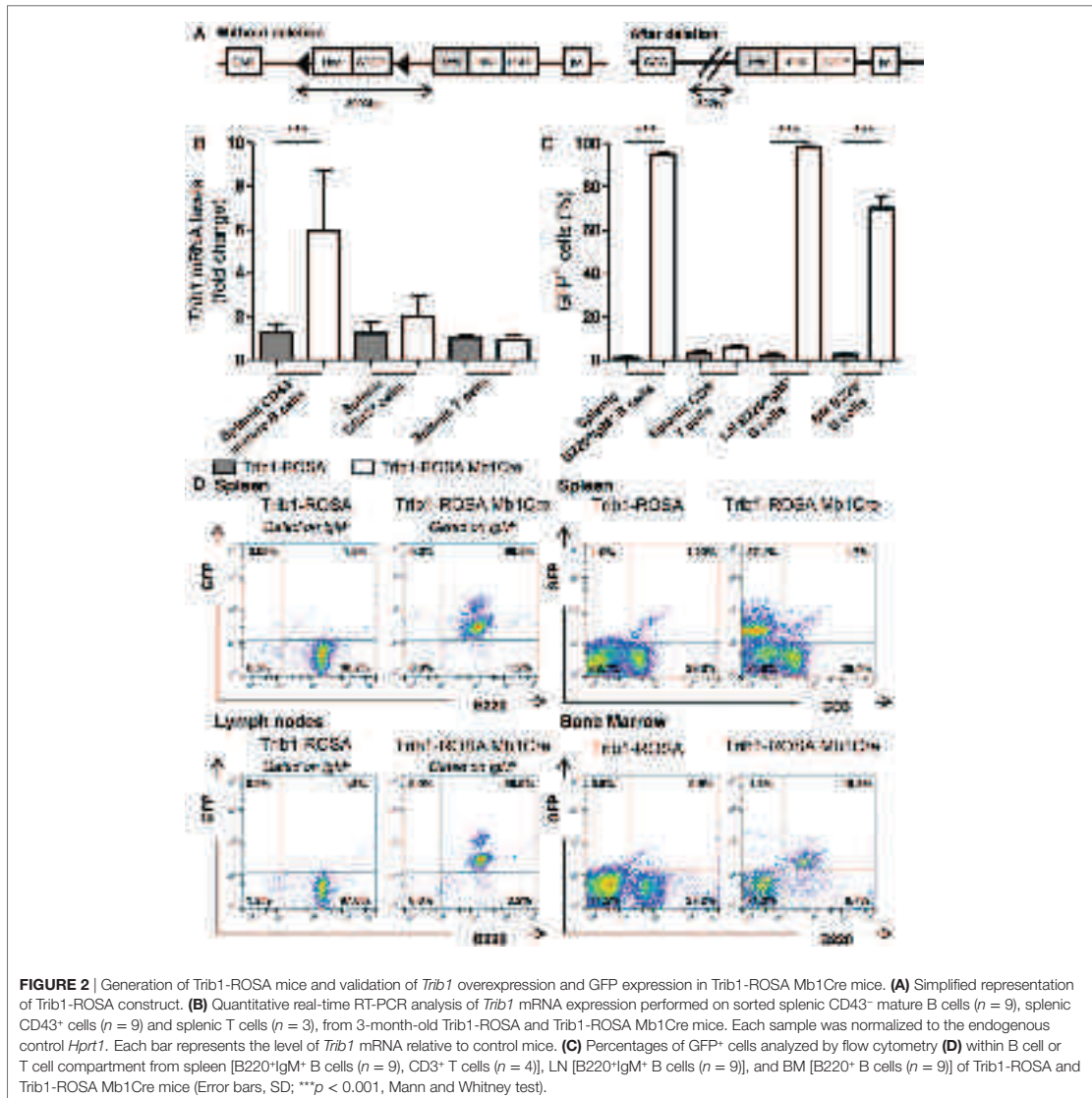
We first evaluated the specificity of *trib1* overexpression in B cells in Trib1-ROSA Mb1Cre mice. We detected a six-times overexpression of *Trib1* mRNA in sorted splenic mature B cells in Trib1-ROSA Mb1Cre mice, compared to control mice, by quantitative real-time RT-PCR. The overexpression was not seen in the rest of splenic cells, neither in sorted splenic T cells (Figure 2B). We also analyzed the expression of GFP, reporter for Trib1 overexpression, in different lymphoid organs by flow cytometry. The average percentage of GFP⁺ cells was very high in B220⁺IgM⁺ B cells in spleen and LNs of Trib1-ROSA Mb1Cre mice (98.0 and 95.0%, respectively), compared to control mice (1.4 and 2.3%, respectively), with almost no GFP expression in splenic CD3⁺ T cells (5.8 and 3.5% in Trib1-ROSA Mb1Cre and control mice, respectively) (Figures 2C,D). These results show that the deletion of the STOP cassette was very efficient and specific of the B cell lineage in Trib1-ROSA Mb1Cre mice. Finally, about 70% of BM B220⁺ cells express GFP, compared to about 1% in control mice (Figures 2C,D). This could be explained in part by the fact that, during B cell development in BM, B220 is expressed earlier

(at Hardy's fraction A, i.e., pre-proB stage) than Ig- α (Hardy's fraction B, i.e., proB cell stage) (28). In conclusion, as expected with the Mb1Cre model, *Trib1* is specifically overexpressed in B cell lineage in Trib1-ROSA Mb1Cre mice.

B Cell Phenotype in Mice Overexpressing *Trib1* in B Cells

We next assessed the development of B cells in primary and secondary lymphoid organs in Trib1-ROSA Mb1Cre mice, by flow cytometry analysis. The proportions of the different subsets of B cells in BM, spleen, and LNs were not different between Trib1-ROSA Mb1Cre and Trib1-ROSA control mice, showing that *Trib1* overexpression in B cells does not have any impact on their development (Table 1). We detected in the spleen and LNs two distinct populations of GFP positive B cells in Trib1-ROSA Mb1Cre mice (Figure 2D). However, the proportions of MZ, T1, T2, and follicular B cells were not different between splenic GFP⁺ and GFP^{high} populations. Of note, as expected, *Trib1* overexpression in B cells did not impact neither T cell development (Table S1 in Supplementary Material), nor the expression of activation markers CD44 and CD69 after stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies for 72 h *in vitro* (data not shown). Because SLE is often associated with B cell hyperactivity (2), we analyzed the expression of activation markers (CD86, MHC II, CD44) on B cells in spleen and LNs. The results showed that *Trib1* overexpression in B cells does not increase basal activation of B cells in secondary lymphoid organs (Figure S1 in Supplementary Material). In addition, the expression of CD86 expression on splenic B cells was not different between Trib1-ROSA Mb1Cre and Trib1-ROSA mice, after *in vitro* stimulation with various TLR agonists (Figure S2 in Supplementary Material).

A majority of SLE patients and lupus murine models develop a hypergammaglobulinemia (2, 29). The level of serum IgM was comparable between the two groups of mice, and the levels of IgG was even decreased in Trib1-ROSA Mb1Cre mice compared



to Trib1-ROSA mice, although the difference was not statistically significant (Figure 3A). When IgG subclasses were quantified in serum, we noticed that the most decreased IgG subclass was IgG1 (186 µg/mL in Trib1-ROSA Mb1Cre versus 263.5 µg/mL in control mice) (Figure 3A). The production of antigen-specific antibodies was decreased after immunization with a T-dependent antigen (OVA) in Trib1-ROSA Mb1Cre mice compared to control mice, at day 20 for IgM and at day 30 for IgM and IgG, and the decrease was statistically significant for IgM (Figure 3B).

In conclusion, *Trib1* overexpression in B cells does not have any impact on the development of B cells, nor on their activation

status, but seems to have a slight negative impact on immunoglobulin production.

B-Cell-Specific Trib1 Overexpressing Mice Do Not Develop Any Sign of Lupus

Trib1-ROSA Mb1Cre mice were analyzed to evaluate the development of lupus symptoms. They do not develop any proteinuria, even at old age (18 months) (data not shown). We quantified the basal level of serum anti-dsDNA IgM autoantibodies, one of the hallmarks of SLE disease, by ELISA. At a young age (3-month-old), Trib1-ROSA Mb1Cre and Trib1-ROSA produce

TABLE 1 | Flow cytometry analysis of B cell subsets from bone marrow (BM), spleen, and lymph nodes (LN) does not show any defect in B-cell development and differentiation in Trib1-ROSA Mb1Cre mice.

	Trib1-ROSA (n = 9)	Trib1-ROSA Mb1Cre (n = 9)
BM		
Pro-pre B	8.3 ± 2.2%	8.0 ± 2.9%
Immature	1.9 ± 1.0%	1.7 ± 0.7%
Transitional	1.4 ± 0.7%	0.8 ± 0.4%
Mature	1.8 ± 1.0%	1.5 ± 0.6%
Spleen		
Total cellularity	66.6 10 ⁶ ± 2.0 10 ⁷	60.7 10 ⁶ ± 1.9 10 ⁷
Total splenic B cells	39.2 ± 12.7%	46.0 ± 10.3%
	25.4 10 ⁶ ± 10.1 10 ⁶	28.2 10 ⁶ ± 12.0 10 ⁶
Fo	29.9 ± 11.2%	34.1 ± 5.1%
	17.1 10 ⁶ ± 6.0 10 ⁶	20.6 10 ⁶ ± 6.8 10 ⁶
MZ	1.3 ± 0.5%	2.5 ± 2.5%
	0.9 10 ⁶ ± 0.6 10 ⁶	1.8 10 ⁶ ± 2.4 10 ⁶
T1	10.8 ± 4.1%	10.3 ± 1.8%
	6.4 10 ⁶ ± 2.1 10 ⁶	6.4 10 ⁶ ± 2.8 10 ⁶
T2	7.3 ± 2.9%	6.4 ± 1.8%
	4.2 10 ⁶ ± 1.9 10 ⁶	3.9 10 ⁶ ± 1.8 10 ⁶
PB	1.1 ± 1.0%	1.1 ± 1.0%
	0.74 10 ⁶ ± 0.68 10 ⁶	0.67 10 ⁶ ± 0.68 10 ⁶
B1 cells	0.8 ± 0.7%	0.7 ± 0.4%
	0.43 10 ⁶ ± 0.37 10 ⁶	0.9 10 ⁶ ± 0.8 10 ⁶
LN		
Total cellularity	6.3 10 ⁶ ± 4.2 10 ⁶	5.1 10 ⁶ ± 3.0 10 ⁶
Total LN B cells	28.1 ± 11.4%	28.0 ± 4.0%
	2.2 10 ⁶ ± 1.8 10 ⁶	1.5 10 ⁶ ± 1.1 10 ⁶
PB	1.7 ± 0.7%	1.9 ± 0.3%
	0.09 10 ⁶ ± 0.06 10 ⁶	0.11 10 ⁶ ± 0.05 10 ⁶

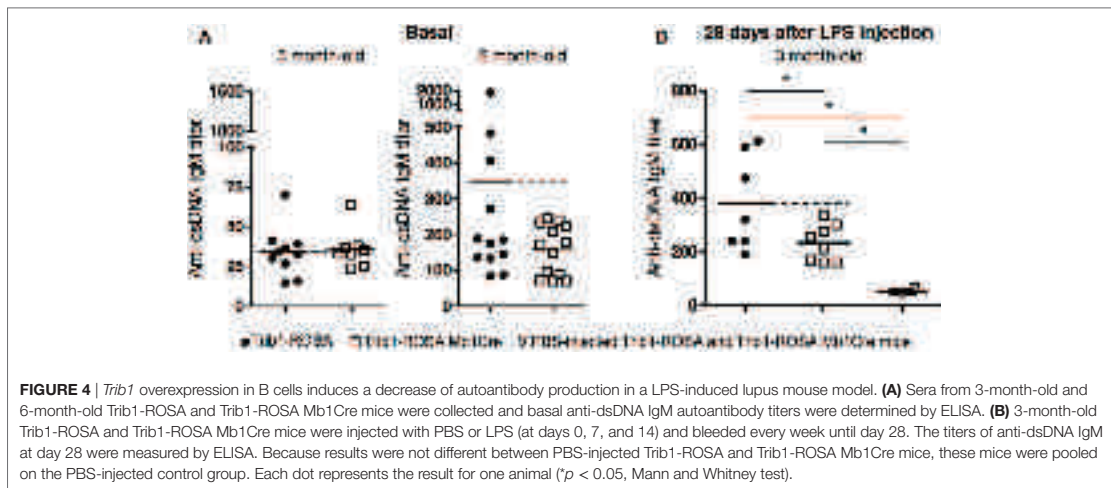
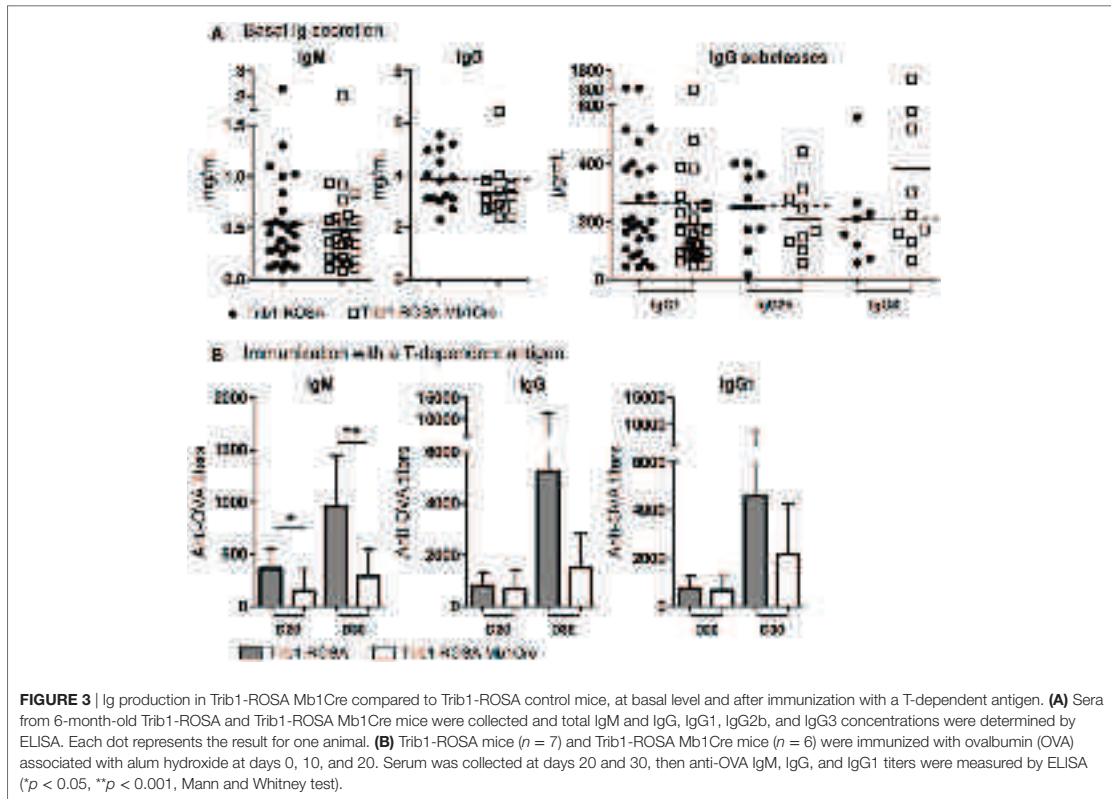
BM: Pro-Pre B (B220⁺IgM⁻); Immature (B220⁺IgM⁺); Transitional (B220⁺IgM^{int}); Mature (B220⁺IgM⁺). Spleen/LN: Fo: Follicular (B220⁺IgM⁺CD23⁺CD21^{int}); MZ: Marginal Zone (B220⁺IgM⁺CD23⁺CD21^{int}); T1: Transitional 1 (B220⁺IgM⁺CD23⁺CD21⁺); T2: Transitional 2 (B220⁺IgM⁺CD23⁺CD21^{int}); PB: Plasmablast (B220⁺CD138^{int}); B1 cells (CD19⁺B220⁺CD5⁺). *italic*: absolute numbers.

the same amount of anti-dsDNA IgM, whereas at 6 months, Trib1-ROSA Mb1Cre mice produce even less autoantibodies than control mice (Figure 4A). At 3 months, as mice from C57BL/6 genetic background do not produce high titers of autoantibodies, we boosted the production of anti-dsDNA autoantibodies by an injection of LPS. The injection of LPS mimics a bacterial infection and induces a polyclonal activation of B cells, including autoreactive B cells producing natural autoantibodies. LPS from *Salmonella typhimurium* was chosen because it was shown to induce a high production of anti-DNA antibodies in young C57BL/6 and in (NZB × NZW)F1 mice (30). Mice were injected at days 0, 14, and 28, and the production of anti-dsDNA IgM was quantified at day 28 by ELISA. The injection of LPS induced an increase of anti-dsDNA IgM production both in Trib1-ROSA Mb1Cre and in Trib1-ROSA control mice compared to PBS-injected mice (Figure 4B). However, B-cell-specific Trib1 overexpressing mice produce less anti-dsDNA IgM than control mice, and the difference was statistically significant. In conclusion, the overexpression of Trib1 in B cells does not induce the development of SLE. On the contrary, it could have a regulatory function on anti-dsDNA antibody production, considering the results obtained *in vivo* in an induced model of autoantibody production.

Trib1 Overexpression in B Cells Negatively Regulates Ig Production

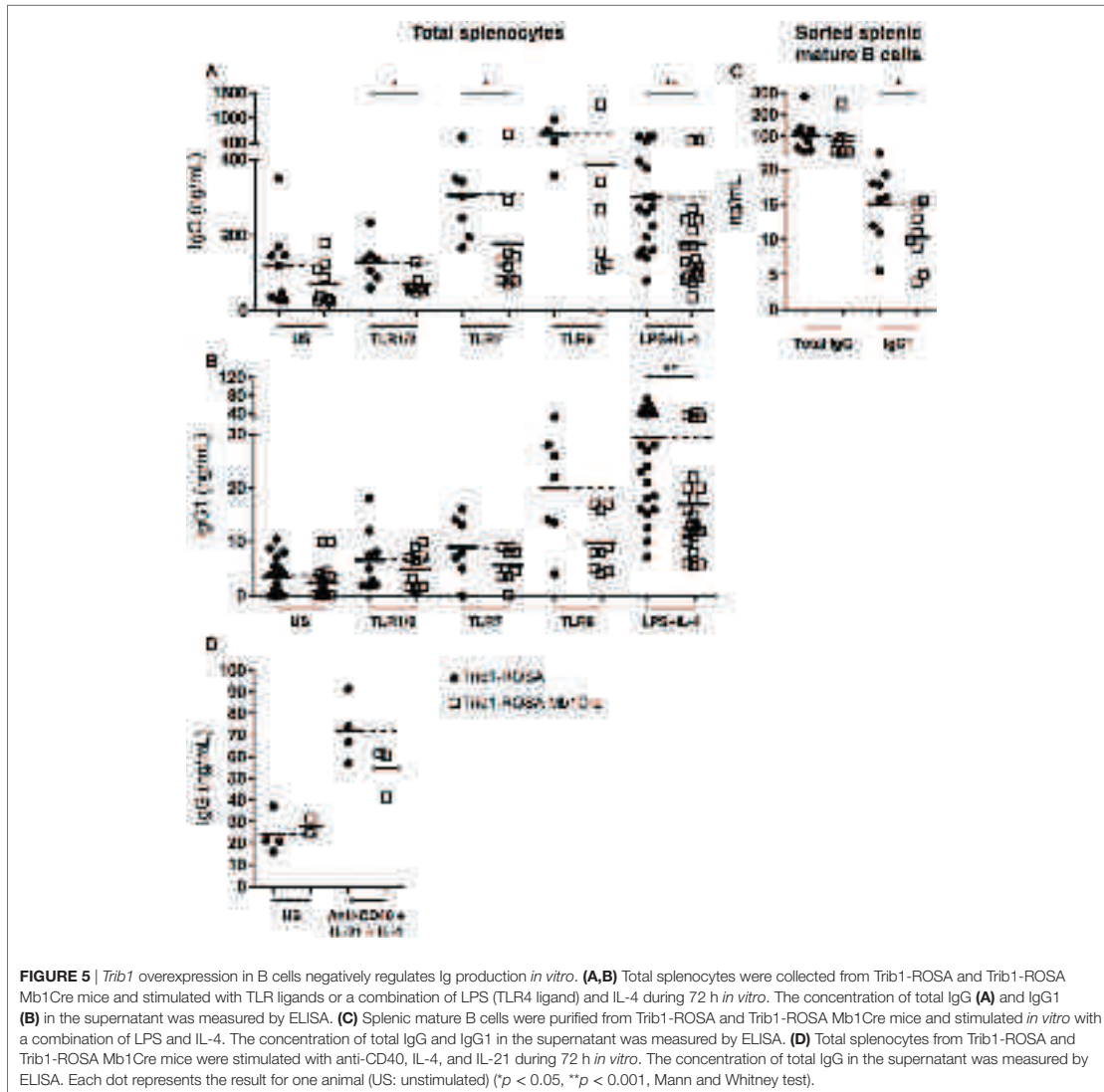
In order to better understand the impact of Trib1 overexpression on Ig (and notably IgG1) production, we stimulated total splenocytes and splenic sorted B cells with various stimuli, including a combination of LPS and IL-4, known to induce the class-switching of B cells into IgG1-producing cells, and with several TLR agonists (TLR7, TLR9, and TLR1/2) known to play a role in lupus pathophysiology in both lupus mouse models and patients (31). We stimulated total splenocytes from Trib1-ROSA Mb1Cre and Trib1-ROSA control mice during 72 h with TLR agonists or with a combination of LPS and IL-4 and quantified the production of total IgG and IgG1 in supernatants by ELISA. All tested stimuli induced a decrease of IgG and IgG1 secretion in culture supernatants from Trib1-ROSA Mb1Cre splenocytes, compared to Trib1-ROSA splenocytes. The decrease in IgG production was notably statistically significant after TLR1/2 and TLR7 agonists stimulation (Figures 5A,B). The stimulation of total splenocytes with LPS (TLR4 agonist) alone led to a non-statistically significant decrease of IgG secretion in Trib1-ROSA Mb1Cre mice, compared to Trib1-ROSA mice (data not shown), however, LPS in combination with IL-4 induced a statistically significant decrease of both IgG and IgG1 secretion (Figures 5A,B). In both cases, IgM secretion was not affected (data not shown). Importantly, this defect of IgG/IgG1 secretion was intrinsic to B cells, because the stimulation of sorted splenic mature B cells only, with LPS and IL-4, led also to a decrease of IgG1 production (Figure 5C). We also tested a stimulation protocol that better mimics T cell help: the stimulation of total splenocytes with anti-CD40, IL-4, and IL-21 induced a non-statistically significant decrease of IgG secretion in Trib1-ROSA Mb1Cre mice, compared to Trib1-ROSA mice (Figure 5D), and IgM secretion was marginally affected (data not shown).

Then we analyzed the potential mechanisms leading to Ig production defect in Trib1 overexpressing B cells. As mentioned earlier, this deficiency could not be attributed to a defect in B cell activation process, considering the equal/similar expression of activation markers after stimulation *in vitro* (Figure S2 in Supplementary Material). An increase of B cell mortality or a decrease of B cell proliferation could be responsible for the phenotype. However, there was no difference between the two groups of mice in the percentages of dead cells (Figures S3A,B in Supplementary Material) nor in the percentage of proliferating (B220⁺Ki67⁺) B cells after stimulation *in vitro* (Figures S3C,D in Supplementary Material). We also analyzed the plasma cell (PC) differentiation process. We tested two known models of *in vitro* plasmablast differentiation, i.e., stimulation of B cells with LPS and with LPS/IL-4, then we quantified the percentage of B220^{low}CD138⁺ plasmablasts by flow cytometry. Our results showed no difference between the two groups of mice (Figures S4A,B in Supplementary Material). In addition, we analyzed the expression of plasma cell differentiation program genes (repressed genes, such as *Pax5*, *Bach2*, *Bcl-6*, *Aicda*; induced genes, such as *Blimp1*, *Xbp1*, and *Irf4*) by quantitative real-time RT-PCR analysis. Considering the results, Trib1 overexpression does not interfere with PC differentiation genetic program (Figures S4C,D in Supplementary Material). Finally, a defect of class-switching



could lead to a decrease of Ig secretion by *Trib1* overexpressing B cells. We stimulated total splenocytes with LPS and IL-4 (for IgG1 class-switching) and with LPS (for IgG3) and quantified the

MFI for surface Ig expression and the percentages of IgG1⁺ or IgG3⁺B220⁺ cells by flow cytometry. We did not detect any difference between *Trib1* overexpressing and control B cells (Figures

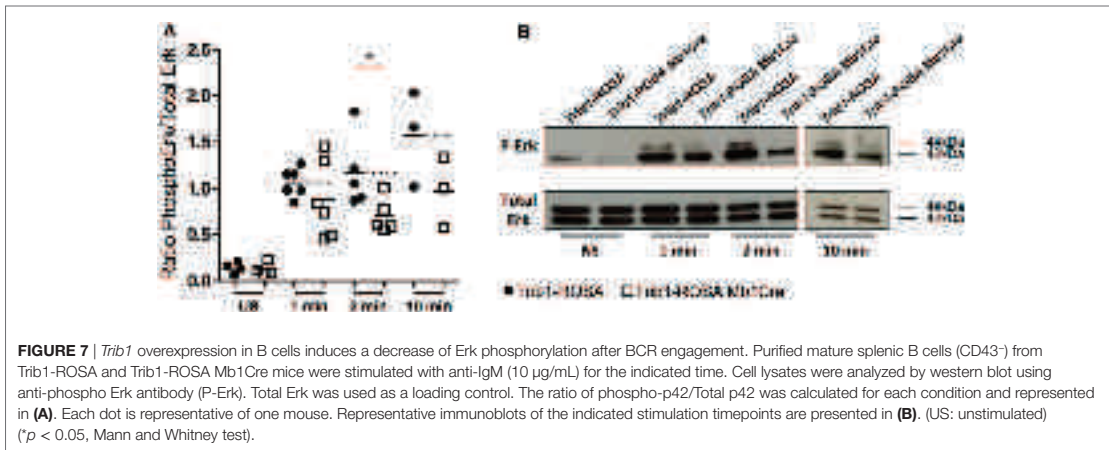
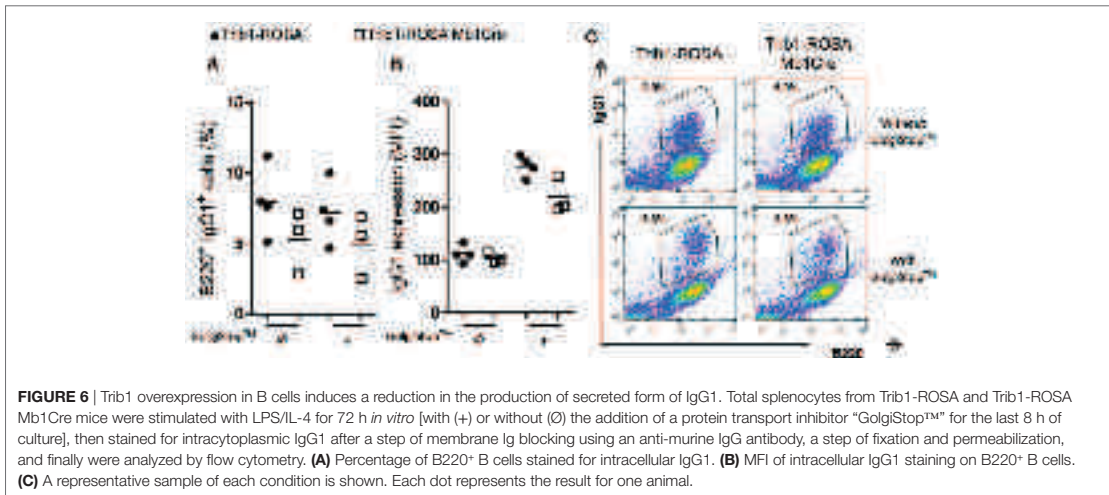


S5A–C in Supplementary Material). The blockade of protein transport with GolgiStop™, containing monensin, in the culture of splenocytes with LPS and IL-4, showed a decrease of intracellular IgG1 positive B cells and of intracellular IgG1 MFI in B cells, in *Trib1*-ROSA Mb1Cre compared to control mice (Figure 6). In conclusion, *Trib1* overexpression in B cells negatively regulates the Ig secretory capacity.

Trib1 Interacts with CD72 and Its Overexpression Affects Erk Signaling

In order to find hypotheses on the mechanisms of B cell phenotype due to *Trib1* overexpression, and considering the role of Trib1 in

MAPK signaling (13, 16), we analyzed Erk signaling in splenic sorted mature B cells from *Trib1*-ROSA-Mb1 and control mice, after stimulation with anti-IgM antibody, by Western Blot. Indeed, Erk-dependent pathway is one of the major MAPK pathways activated in B cells after BCR engagement. The phosphorylation of Erk was decreased in B cells from *Trib1*-ROSA-Mb1 mice, compared to control mice, and the difference was statistically significant at 2 min of stimulation (Figure 7). Proximal BCR signaling Syk pathway was not affected (data not shown). The defect in Erk pathway in *Trib1* overexpressing B cells probably does not explain the phenotype of these cells on its own. Therefore, we determined the partners of Trib1 in B cells in order to have



a better insight of Trib1 function in these cells. We transduced a murine B cell line (CH12) with a retrovirus encoding a Flag-mTrib1 and IRES-GFP reporter (CH12-Trib1) or only a Flag-GFP as a control (CH12-GFP). To identify cytoplasmic partners of Trib1, we performed Flag IP followed by SDS-PAGE and mass spectrometry identification.

Mass spectrometry analysis of 5 independent experiments revealed a list of 236 proteins specifically enriched in CH12-TRIB1 cells. Proteins were ranked according to the number of experiments in which they were identified, and their confidence score. We kept those proteins identified in at least three out of the five experiments (Table 2). These proteins were classified into the following groups: proteins implicated in ubiquitination process, regulators of signal transduction, regulators of protein production, and secretion and chaperone proteins (Table 2). Among the previously identified and best characterized partner of Trib1, COP1 (13, 32), we found additional proteins, including notably

CD72 (Table 2). CD72 is a very interesting candidate because it is a well-known negative B cell regulator. The association between Trib1, COP1, and CD72 was verified by co-IP and Western Blot (Figure 8). Several partners of Trib1 are linked to the regulation of signal transduction (for example Spre1, Stk40, and Ppm1b) (Table 2; Figure S6 in Supplementary Material). Interestingly, Spre1 has been described as a negative regulator of Erk pathway (33, 34). Further experiments will be needed to understand the potential implication of these partners in the negative regulatory function of Trib1 in B cells.

DISCUSSION

We identified an overexpression of *TRIB1* in human SLE B cells during clinically inactive disease by transcriptome analysis (10). This overexpression was confirmed in a second cohort of SLE quiescent patients, by real-time qRT-PCR. This led us to study the

TABLE 2 | Proteins implicated in protein ubiquitination, signal transduction, protein production secretion are found as Trib1 partners in CH12 B cell line.

Accession number	Full name	Function	n	Score
Protein ubiquitination				
COP1	E3 Ubiquitin-protein ligase COP1	Ubiquitin ligase	5	112
MALT1	Isoform 2 of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1	Ubiquitin ligase—involved in BCL-10-induced NF- κ B pathway activation	3	16
Signalization and signal transduction				
Stk40	Serine/threonine-protein kinase 40	Serine/threonine kinase, negative regulator of NF- κ B pathway, and p53-induced gene transcription	5	45
St38L	Serine/threonine-protein kinase 38-like	Kinase—involved in signal transduction regulation	4	45
MARCS	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	Protein kinase C substrate	4	19
LAP2	Isoform 2 of Protein LAP2	HER2 adaptor—Inhibitor of NOD2-dependant NF- κ B pathway and pro-inflammatory cytokine secretion	3	71
PPM1B	Isoform Beta-2 of protein phosphatase 1B	Associated to IKKB dephosphorylation and inactivation (NF- κ B pathway)	3	23
CALM	Calmoduline	Implicated in calcium flux	3	21
FLII	Protein flightless-1 homolog	Involved in estrogen-induced signaling	3	18
CD72	B-cell differentiation antigen CD72	Negative regulator of B cells	3	16
SPRE1	Sprouty-related, EVH1 domain-containing protein 1	MAPK pathway regulator	3	15
JAK3	Tyrosine-protein kinase JAK3	Kinase involved in cytokine production pathway, cell development, differentiation, and proliferation	3	10
TR19L	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 19 L	Involved in NF- κ B pathway activation	3	8
Protein production and secretion				
Eif4b	Eukaryotic translation initiation factor 4B	Required for mRNA binding to ribosome	3	39
EPN4	Clathrin interactor 1	Associated to clathrin vesicles transport from Trans-Golgi to endosomes	3	30
RS6	40S ribosomal protein S6	Ribosomal protein	3	15
RS18	40S ribosomal protein S18	Ribosomal protein	3	13
STX7	Syntaxin-7	Implicated in protein traffic from early endosomes to plasma membrane	3	13
RS19	40S ribosomal protein S19	Ribosomal protein	3	7
Chaperone protein				
HS90B	Heat shock protein HSP 90-beta	Chaperone protein	4	37
HS90A	Heat shock protein HSP 90-alpha	Chaperone protein	4	29
CDC37	Hsp90 co-chaperone Cdc37	Chaperone protein	3	14
Others				
RNF219	RING Finger protein 219	Zinc finger protein	5	122

Mass spectrometry analysis was performed on immunoprecipitation product ($n_{total} = 5$). In each subgroup defining their main function, the proteins are ranked according to the number of experiments in which they were found as Trib1 partners (column « n ») and their confidence score. (Accession numbers are coming from Swissprot Database).

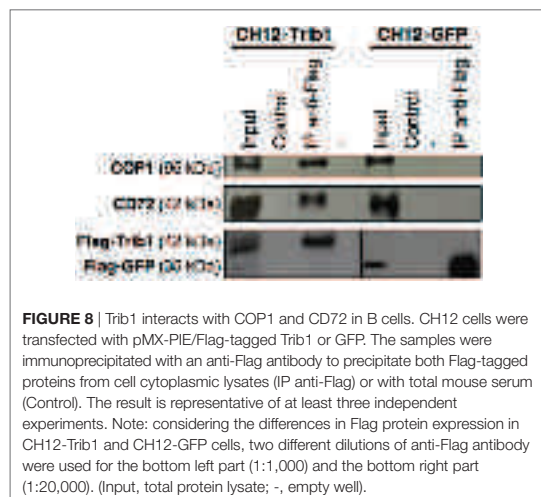


FIGURE 8 | Trib1 interacts with COP1 and CD72 in B cells. CH12 cells were transfected with pMX-PIE/Flag-tagged Trib1 or GFP. The samples were immunoprecipitated with an anti-Flag antibody to precipitate both Flag-tagged proteins from cell cytoplasmic lysates (IP anti-Flag) or with total mouse serum (Control). The result is representative of at least three independent experiments. Note: considering the differences in Flag protein expression in CH12-Trib1 and CH12-GFP cells, two different dilutions of anti-Flag antibody were used for the bottom left part (1:1,000) and the bottom right part (1:20,000). (Input, total protein lysate; -, empty well).

consequences of *Trib1* overexpression on B cell phenotype and on the development of SLE in a new murine transgenic model. For this purpose, we developed a B-cell-specific Trib1 KI conditional model, by an insertion of murine *Trib1* coding sequence, preceded by a floxed STOP cassette, into ROSA locus. We detected a six-times overexpression of *Trib1* in splenic mature B cells in this model, thanks to an efficient deletion of the STOP cassette by the Cre recombinase under the control of Mb1 promoter. Therefore, the level of *Trib1* overexpression in this model was close to the one detected in B cells from quiescent SLE patients in our transcriptome analysis or in the second cohort of patients. Because the overexpression of *Trib1* begins at very early stage in B cell lineage in BM, we checked if *Trib1* overexpression in our model could have an impact on B cell development. Our results showed that this was not the case. Altogether, these characteristics made this new mouse model suitable for this study.

Trib1-ROSA-Mb1 mice did not display any symptom of lupus disease: activation status of B cells is normal, and we did not detect any feature of renal disease. On the contrary, we showed that *Trib1* overexpression specifically in B cells had a negative

impact on autoantibody production, notably after induction of anti-dsDNA antibody production with injection of LPS, mimicking an infectious event. Moreover, *Trib1* overexpression in B cells negatively regulated Ig production, *in vivo* at basal level or after immunization notably with a T-dependent antigen, and also after *in vitro* stimulation. The most impacted Ig subtype was IgG1. However, the effect does not seem to be specific of IgG1. Because class switching into IgG subclasses is notably guided by specific stimuli (as LPS and IL-4 in murine B cells, for IgG1) (35), one could hypothesize that the degree of engagement of Trib1 in this negative regulation depends on the signaling pathways activated in B cells and, therefore, on the receptor engaged at the surface of the cells. Our results showed that the defect in Ig production was neither the consequence of an activation defect of B cells, nor an increase of mortality or a decrease of viability, nor a defect in class switching and plasma cell differentiation program. However, we detected a decrease of the percentage of intracellular IgG1 positive B cells and of intracellular IgG1 MFI in B cells in Trib1-ROSA Mb1Cre compared to control mice after stimulation with LPS and IL-4. In conclusion, it seems that the decrease in Ig levels was mostly the consequence of a defect in Ig secretory capacity. Interestingly, the analysis of *Trib1* expression in the different B cell subpopulations has been done in C57BL/6 mice (corresponding to background of our Trib1 transgenic model),² and in humans notably for B cells and plasma cells³ and shows that *Trib1* is highly expressed in plasmablasts and in plasma cells, thereby arguing for an important function of Trib1 in Ig production.

We searched for Trib1 partners in murine B cells, in order to understand the immunosuppressive role of Trib1. After IP of Trib1 in CH12 B cell line and mass spectrometry identification, we selected a short list of Trib1 partners that could potentially be implicated in signal transduction and protein production and secretion. Among these partners, COP1 E3 ubiquitin ligase was already identified as a partner of Trib1 in different cell types (13, 19, 32), but never in B cells. It was notably shown in myeloid cells that COP1, via Trib1, targets C/EBP α for degradation by the proteasome (32). In mammals, C/EBP α is an important transcription factor controlling myeloid differentiation (13). According to this function, it is almost exclusively expressed in myeloid cells⁴; therefore, this could explain why we did not identify it as a partner of Trib1 in B cells. We confirmed the association of COP1 with Trib1 in CH12 cells by IP and Western-Blot analysis. It is known that COP1 binding to Trib1 is essential to target protein substrates for degradation (13). Further experiments should explore in details the role of COP1 in the degradation of proteins implicated in Ig synthesis and secretion in B cells. Moreover, we pointed out JAK3 as a Trib1 partner in B cells. JAK3 is a kinase associated with different cytokine receptors, notably IL-4 receptor, therefore giving one explanation for the phenotype of Trib1 overexpressing B cells after stimulation with LPS and IL-4.

The regulation of several signaling pathways was a frequent characteristic of the partners we identified for Trib1 in B cells

(Table 2). Trib1 has been mostly described in the literature as a regulator of MAPK signaling, in different cell types. In HeLa cells, BM and myeloid leukemia cells, Trib1 was shown to interact, *via* its C-terminus domain, with MEK-1, and to be responsible for a hyperphosphorylation of Erk (13, 17). In other cell types, as muscular cells, Trib1 overexpression does not have any impact on Erk phosphorylation (36). Generally speaking, Tribbles proteins seem to act either as activators or inhibitors of MAPK pathways (17). We showed here that, in murine B cells, Trib1 overexpression seems to decrease Erk phosphorylation. This could be linked to the defect in Ig production and secretion observed in Trib1-ROSA-Mb1 mice. Among the partners, we identified for Trib1 in B cells, Spred1 is a suppressor of Ras signaling, notably in innate lymphoid cells (34). Therefore, Trib1, *via* the recruitment of Spred1, could negatively regulate Erk signaling in B cells. The immunosuppressive role of Trib1 in B cells probably also implicate other partners. We identified CD72 as another cofactor of Trib1 in B cells. CD72 is a negative regulator of B cells (37). It is a very interesting candidate because the production of immunoglobulin is increased in CD72-deficient mice (38), and a decreased expression of CD72 was associated with an increased surface IgG on B cells and to a severe disease in patients with lupus nephritis (39), arguing for a negative role of CD72 on immunoglobulin production. Moreover, the expression of the “b” isoform of CD72 which is the one expressed in C57BL/6 mice (and, therefore, in the mice analyzed in our study) and in CH12 cells (40), in MRL.CD72^{b/lpr} congenic mice, is protective against the development of the lupus disease (41, 42). In addition, CD72 downregulates BCR signaling, and notably NF- κ B and Erk (43–45). Our preliminary experiments showed that NF- κ B signaling was not affected in *Trib1* overexpressing B cells after stimulation of the BCR pathway (with anti-IgM antibody). However, it could be interesting to see if it is also the case when CD72 and BCR pathways are synergistically activated.

In conclusion, we described a new role of Trib1 as a negative regulator of B cells. Despite the polygenic nature of lupus disease in humans, one feature of B cells from quiescent SLE patients, *i.e.*, Trib1 overexpression, in mice, is sufficient on its own to have an immunosuppressive effect on B cells. It would be interesting to see the effect of B cell-specific *Trib1* overexpression on the development of the disease in an SLE murine model. Moreover, there is no molecular explanation for the phenotype of SLE patients during silent phases of the disease, or for the maintenance of the clinically silent phases (46). As such, the overexpression of TRIB1 in B cells could constitute one of these protective molecular pathways. It would be interesting in the future to analyze the overexpression of *TRIB1* in B cells in a prospective way, in order to study the correlation between *TRIB1* expression and the quiescent or active nature of the disease in the same patient.

ETHICS STATEMENT

This study was carried out in accordance with the recommendations of the ethics committee of the “Hôpitaux Universitaires de Strasbourg” with written informed consent from all subjects. All subjects gave written informed consent in accordance with the Declaration of

²<https://www.immgen.org>.

³<http://amazonia.transcriptome.eu>.

⁴<http://immgen.org>.

Helsinki. The protocol was approved by the ethics committee of the “Hôpitaux de Strasbourg” (Strasbourg, France). This study was carried out in accordance with the recommendations of “Direction départementale des services vétérinaires” (Strasbourg, France). Protocols were approved by the ethics committee (“Comité d'éthique en matière d'Experimentation Animale de Strasbourg,” CREMEAS, approval number AL/02/15/09/11 and AL/31/38/02/13).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

LS, VD, JR-L, TM, A-SK, BRSM, and PS-S designed the research. LS, VD, JR-L, AS, VH, IR, VG, and DB performed the research. LS, VD, JR-L, VH, VG, TM, A-SK, BRSM, and PS-S analyzed the data. LS, VD, IR, A-SK, BRSM, and PS-S wrote the paper.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Pr M. Reth for providing us the Mb1-Cre transgenic mice. We thank M. Duval, D. Lamon, D. Bock, I. Ghazouani, and K. Sablon for excellent animal care. We thank F. Gros for scientific discussions.

REFERENCES

- Tsokos GC. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* (2011) 365(22):2110–21. doi:10.1056/NEJMra1100359
- Moulton VR, Suarez-Fueyo A, Meidan E, Li H, Mizui M, Tsokos GC. Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: a cellular perspective. *Trends Mol Med* (2017) 23(7):615–35. doi:10.1016/j.molmed.2017.05.006
- Mandik-Nayak L, Ridge N, Fields M, Park AY, Erikson J. Role of B cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Curr Opin Immunol* (2008) 20(6):639–45. doi:10.1016/j.coi.2008.08.003
- Nashi E, Wang Y, Diamond B. The role of B cells in lupus pathogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* (2010) 42(4):543–50. doi:10.1016/j.biocel.2009.10.011
- Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, Scofield RH, Dennis GJ, James JA, et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* (2003) 349(16):1526–33. doi:10.1056/NEJMoa021933
- Steinberg EB, Santoro TJ, Chused TM, Smathers PA, Steinberg AD. Studies of congenic MRL-lpr.xid mice. *J Immunol* (1983) 131(6):2789–95.
- Chan OT, Hannum LG, Haberman AM, Madaio MP, Shlomchik MJ. A novel mouse with B cells but lacking serum antibody reveals an antibody-independent role for B cells in murine lupus. *J Exp Med* (1999) 189(10):1639–48. doi:10.1084/jem.189.10.1639
- Prud'homme GJ, Balderas RS, Dixon FJ, Theofilopoulos AN. B cell dependence on and response to accessory signals in murine lupus strains. *J Exp Med* (1983) 157(6):1815–27. doi:10.1084/jem.157.6.1815
- Reininger L, Winkler TH, Kalberer CP, Jourdan M, Melchers F, Rolink AG. Intrinsic B cell defects in NZB and NZW mice contribute to systemic lupus erythematosus in (NZB x NZW)F1 mice. *J Exp Med* (1996) 184(3):853–61. doi:10.1084/jem.184.3.853
- Garaud JC, Schickel JN, Blaison G, Knapp AM, Dembele D, Ruer-Laventie J, et al. B cell signature during inactive systemic lupus is heterogeneous: toward a biological dissection of lupus. *PLoS One* (2011) 6(8):e23900. doi:10.1371/journal.pone.0023900
- Schickel JN, Pasquali JL, Soley A, Knapp AM, Decossas M, Kern A, et al. Carabin deficiency in B cells increases BCR-TLR9 costimulation-induced autoimmunity. *EMBO Mol Med* (2012) 4(12):1261–75. doi:10.1002/emmm.201201595
- Ruer-Laventie J, Simoni L, Schickel JN, Soley A, Duval M, Knapp AM, et al. Overexpression of Fkbp11, a feature of lupus B cells, leads to B cell tolerance breakdown and initiates plasma cell differentiation. *Immun Inflamm Dis* (2015) 3(3):265–79. doi:10.1002/iid3.65

FUNDING

This work was supported by grants from Strasbourg University (UdS), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Arthritis Courtin foundation, by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-13-JSV3-0007-01, LEDsGO; and ANR-11-EQPX-022), and by EU-funded (ERDF) project INTERREG V “RARENET” LS, JR-L, and DB were supported by the Ministère de la Recherche et de la Technologie. JR-L was supported by Arthritis Courtin foundation. VD was supported by Initiative of Excellence (IdEx), Strasbourg University, France.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at <http://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.00373/full#supplementary-material>.

TABLE S1 | T cell subpopulations from Trib1-ROSA and Trib1-ROSA Mb1Cre were analyzed by flow cytometry.

TABLE S2 | Proteomics raw data.

- Yokoyama T, Nakamura T. Tribbles in disease: signaling pathways important for cellular function and neoplastic transformation. *Cancer Sci* (2011) 102(6):1115–22. doi:10.1111/j.1349-7006.2011.01914.x
- Sung HY, Francis SE, Crossman DC, Kiss-Toth E. Regulation of expression and signalling modulator function of mammalian tribbles is cell-type specific. *Immunol Lett* (2006) 104(1–2):171–7. doi:10.1016/j.imlet.2005.11.010
- Dedhia PH, Keeshan K, Uljon S, Xu L, Vega ME, Shestova O, et al. Differential ability of Tribbles family members to promote degradation of C/EBPalpha and induce acute myelogenous leukemia. *Blood* (2010) 116(8):1321–8. doi:10.1182/blood-2009-07-229450
- Eyers PA, Keeshan K, Kannan N. Tribbles in the 21st century: the evolving roles of tribbles pseudokinases in biology and disease. *Trends Cell Biol* (2017) 27(4):284–98. doi:10.1016/j.tcb.2016.11.002
- Kiss-Toth E, Bagstaff SM, Sung HY, Jozsa V, Dempsey C, Caunt JC, et al. Human tribbles, a protein family controlling mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem* (2004) 279(41):42703–8. doi:10.1074/jbc.M407732200
- Yokoyama T, Kanno Y, Yamazaki Y, Takahara T, Miyata S, Nakamura T. Trib1 links the MEK1/ERK pathway in myeloid leukemogenesis. *Blood* (2010) 116(15):2768–75. doi:10.1182/blood-2009-10-246264
- Satoh T, Kidoya H, Naito H, Yamamoto M, Takemura N, Nakagawa K, et al. Critical role of Trib1 in differentiation of tissue-resident M2-like macrophages. *Nature* (2013) 495(7442):524–8. doi:10.1038/nature11930
- Dugast E, Kiss-Toth E, Docherty L, Danger R, Chesneau M, Pichard V, et al. Identification of tribbles-1 as a novel binding partner of Foxp3 in regulatory T cells. *J Biol Chem* (2013) 288(14):10051–60. doi:10.1074/jbc.M112.448654
- Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* (1997) 40(9):1725. doi:10.1002/art.1780400928
- Xiao C, Calado DP, Galler G, Thai TH, Patterson HC, Wang J, et al. MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb. *Cell* (2007) 131(1):146–59. doi:10.1016/j.cell.2007.07.021
- Xiao C, Srinivasan L, Calado DP, Patterson HC, Zhang B, Wang J, et al. Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat Immunol* (2008) 9(4):405–14. doi:10.1038/ni1575
- Hobeika E, Thiemann S, Storch B, Jumaa H, Nielsen PJ, Pelanda R, et al. Testing gene function early in the B cell lineage in mb1-cre mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2006) 103(37):13789–94. doi:10.1073/pnas.0605944103
- Nakamura M, Kondo S, Sugai M, Nazarea M, Imamura S, Honjo T. High frequency class switching of an IgM+ B lymphoma clone CH12F3 to IgA+ cells. *Int Immunol* (1996) 8(2):193–201. doi:10.1093/intimm/8.2.193

26. Barreto V, Reina-San-Martin B, Ramiro AR, McBride KM, Nussenzweig MC. C-terminal deletion of AID uncouples class switch recombination from somatic hypermutation and gene conversion. *Mol Cell* (2003) 12(2):501–8. doi:10.1016/S1097-2765(03)00309-5
27. Jeevan-Raj BP, Robert I, Heyer V, Page A, Wang JH, Cammas F, et al. Epigenetic tethering of AID to the donor switch region during immunoglobulin class switch recombination. *J Exp Med* (2011) 208(8):1649–60. doi:10.1084/jem.20110118
28. Hardy RR, Hayakawa K. B cell development pathways. *Annu Rev Immunol* (2001) 19:595–621. doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.595
29. Perry D, Sang A, Yin Y, Zheng YY, Morel L. Murine models of systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol* (2011) 2011:271694. doi:10.1155/2011/271694
30. Fournie GJ, Lambert PH, Meischer PA. Release of DNA in circulating blood and induction of anti-DNA antibodies after injection of bacterial lipopolysaccharides. *J Exp Med* (1974) 140(5):1189–206. doi:10.1084/jem.140.5.1189
31. Ma K, Li J, Fang Y, Lu L. Roles of B cell-intrinsic TLR signals in systemic lupus erythematosus. *Int J Mol Sci* (2015) 16(6):13084–105. doi:10.3390/ijms160613084
32. Yoshida A, Kato JY, Nakamae I, Yoneda-Kato N. COP1 targets C/EBPalpha for degradation and induces acute myeloid leukemia via Trib1. *Blood* (2013) 122(10):1750–60. doi:10.1182/blood-2012-12-476101
33. Wakioka T, Sasaki A, Kato R, Shouda T, Matsumoto A, Miyoshi K, et al. Sprad1 is a sprouty-related suppressor of Ras signalling. *Nature* (2001) 412(6847):647–51. doi:10.1038/35088082
34. Suzuki M, Morita R, Hirata Y, Shichita T, Yoshimura A. Spred1, a suppressor of the Ras-ERK pathway, negatively regulates expansion and function of group 2 innate lymphoid cells. *J Immunol* (2015) 195(3):1273–81. doi:10.4049/jimmunol.1500531
35. Pan-Hammarstrom Q, Zhao Y, Hammarstrom L. Class switch recombination: a comparison between mouse and human. *Adv Immunol* (2007) 93:1–61. doi:10.1016/S0065-2776(06)93001-6
36. Sung HY, Guan H, Czibula A, King AR, Eder K, Heath E, et al. Human tribbles-1 controls proliferation and chemotaxis of smooth muscle cells via MAPK signaling pathways. *J Biol Chem* (2007) 282(25):18379–87. doi:10.1074/jbc.M610792200
37. Parnes JR, Pan C. CD72, a negative regulator of B-cell responsiveness. *Immunol Rev* (2000) 176:75–85. doi:10.1034/j.1600-065X.2000.00608.x
38. Pan C, Baumgarth N, Parnes JR. CD72-deficient mice reveal nonredundant roles of CD72 in B cell development and activation. *Immunity* (1999) 11(4):495–506. doi:10.1016/S1074-7613(00)80124-7
39. Nakano S, Morimoto S, Suzuki J, Mitsuo A, Nakiri Y, Katagiri A, et al. Down-regulation of CD72 and increased surface IgG on B cells in patients with lupus nephritis. *Autoimmunity* (2007) 40(1):9–15. doi:10.1080/08916930601118890
40. Robinson WH, Ying H, Miceli MC, Parnes JR. Extensive polymorphism in the extracellular domain of the mouse B cell differentiation antigen Lyb-2/CD72. *J Immunol* (1992) 149(3):880–6.
41. Xu M, Hou R, Sato-Hayashizaki A, Man R, Zhu C, Wakabayashi C, et al. Cd72(c) is a modifier gene that regulates Fas(lpr)-induced autoimmune disease. *J Immunol* (2013) 190(11):5436–45. doi:10.4049/jimmunol.1203576
42. Oishi H, Tsubaki T, Miyazaki T, Ono M, Nose M, Takahashi S. A bacterial artificial chromosome transgene with polymorphic Cd72 inhibits the development of glomerulonephritis and vasculitis in MRL-Faspr lupus mice. *J Immunol* (2013) 190(5):2129–37. doi:10.4049/jimmunol.1202196
43. Li DH, Tung JW, Tarner IH, Snow AL, Yukinari T, Ngermaneeopothong R, et al. CD72 down-modulates BCR-induced signal transduction and diminishes survival in primary mature B lymphocytes. *J Immunol* (2006) 176(9):5321–8. doi:10.4049/jimmunol.176.9.5321
44. Li DH, Winslow MM, Cao TM, Chen AH, Davis CR, Mellins ED, et al. Modulation of peripheral B cell tolerance by CD72 in a murine model. *Arthritis Rheum* (2008) 58(10):3192–204. doi:10.1002/art.23812
45. Adachi T, Wakabayashi C, Nakayama T, Yakura H, Tsubata T. CD72 negatively regulates signaling through the antigen receptor of B cells. *J Immunol* (2000) 164(3):1223–9. doi:10.4049/jimmunol.164.3.1223
46. Liu CC, Kao AH, Manzi S, Ahearn JM. Biomarkers in systemic lupus erythematosus: challenges and prospects for the future. *Ther Adv Musculoskelet Dis* (2013) 5(4):210–33. doi:10.1177/1759720X13485503

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Simoni, Delgado, Ruer-Laventie, Bouis, Soley, Heyer, Robert, Gies, Martin, Korganow, San Martin and Soulas-Sprauel. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

CD4 T cell autophagy is integral to memory maintenance

Diane Murera¹, Florent Arbogast^{1,2}, Johan Arnold¹, Delphine Bouis¹, Sylviane Muller^{1,3,4} & Frédéric Gros^{1,2}

Studies of mice deficient for autophagy in T cells since thymic development, concluded that autophagy is integral to mature T cell homeostasis. Basal survival and functional impairments *in vivo*, limited the use of these models to delineate the role of autophagy during the immune response. We generated *Atg5^{fl}* distal Lck (dLck)-cre mice, with deletion of autophagy only at a mature stage. In this model, autophagy deficiency impacts CD8⁺ T cell survival but has no influence on CD4⁺ T cell number and short-term activation. Moreover, autophagy in T cells is dispensable during early humoral response but critical for long-term antibody production. Autophagy in CD4⁺ T cells is required to transfer humoral memory as shown by injection of antigen-experienced cells in naive mice. We also observed a selection of autophagy-competent cells in the CD4⁺ T cell memory compartment. We performed *in vitro* differentiation of memory CD4⁺ T cells, to better characterize autophagy-deficient memory cells. We identified mitochondrial and lipid load defects in differentiated memory CD4⁺ T cells, together with a compromised survival, without any collapse of energy production. We then propose that memory CD4⁺ T cells rely on autophagy for their survival to regulate toxic effects of mitochondrial activity and lipid overload.

Autophagy is a catabolic process, required to produce energy notably under nutrient deprivation. Moreover, basal autophagy is important to remove protein aggregates, damaged organelles such as defective mitochondria or excess of endoplasmic reticulum (ER), in processes called mitophagy and reticulophagy, respectively. Autophagy is also involved in the regulation of lipid stores through the digestion of lipid droplets via the so-called “lipophagy”¹. Basal autophagy has been shown to be crucial in long-lived cells, such as neurons, or metabolically active cells, such as hepatocytes. Immune cells like T lymphocytes exhibit differential energy demands according to their developmental stage or their activation status. Thus, naive T cells require glycolysis early after activation, to quickly sustain the energetic demand while, in contrast, memory T cell clones, use differential energy production systems to survive for months or years after priming². Memory T cells are particularly dependent on fatty acid oxidation (FAO) that takes place in mitochondria, to generate adenosine tri-phosphate (ATP). Moreover, removal of damaged cellular components may also require autophagy at long-term.

Autophagy has been initially shown to play a role in peripheral T cell homeostasis in mouse chimera models³. By the use of several conditional deletion models, it was thus concluded that autophagy is essential for both CD4⁺ and CD8⁺ T cell survival and proper function^{4–10}. However, these models relied on promoters driving autophagy-related genes (*Atg*) deletion early during T cell differentiation. These models alone were thus not sufficient to distinguish if functional or survival defects were due to early developmental issues, or consequent to peripheral homeostatic disturbance. One study addressed this issue by deleting, with Estrogen Receptor-cre promoter, the essential autophagy gene *Atg3*, therefore only in mature T cells⁷. This study led to new findings about the requirement of autophagy for ER homeostasis, several days after initial activation. However, these experiments were conducted *in vitro* and therefore integrated immune responses could not be studied. More recently, three other studies addressed this question *in vivo* for CD8⁺ T cells, by transfer experiments and using conditional deletion models only active at the CD8 T cell effector stage. They concluded that CD8⁺ T cells require autophagy for their survival as memory cells^{11–13}. These observations constitute an interesting parallel to other long-lived cell types, like neurons, in which autophagy is particularly required. Although investigated in CD8⁺ T cells, the role for autophagy in the memory of the CD4⁺ T cell compartment is not known yet.

¹CNRS, Immunopathology and therapeutic chemistry/Laboratory of excellence MEDALIS, Institute of molecular and cellular biology (IBMC), Strasbourg, France. ²University of Strasbourg, Strasbourg, France. ³CNRS-University of Strasbourg, Biotechnology and cell signaling, Illkirch, France/Laboratory of excellence MEDALIS, Institut de science et d'ingénierie supramoléculaire, 67000, Strasbourg, France. ⁴University of Strasbourg Institute for Advanced Study (USIAS), Strasbourg, France. Diane Murera and Florent Arbogast contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to F.G. (email: f.gros@ibmc-cnrs.unistra.fr)

Received: 29 June 2017

Accepted: 21 March 2018

Published online: 13 April 2018

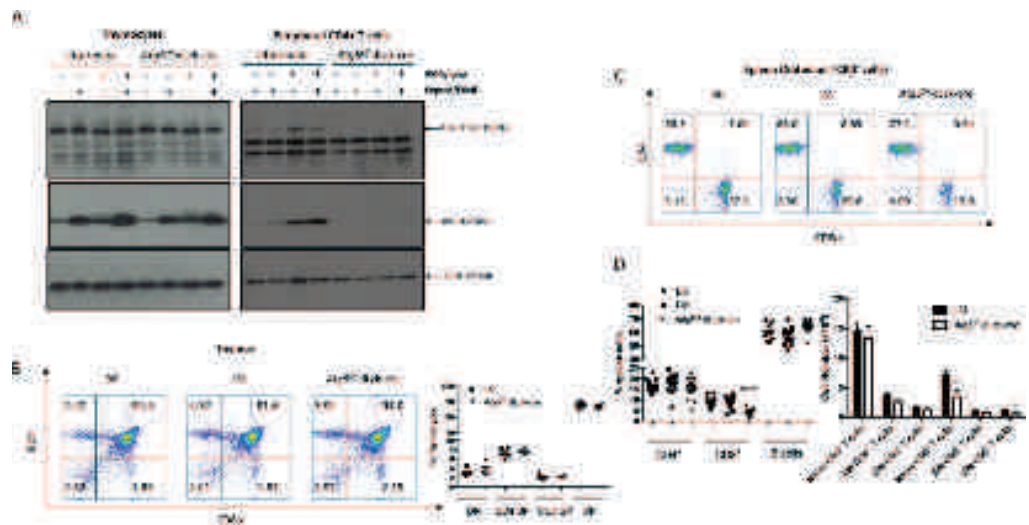


Figure 1. (A) Thymocytes or peripheral CD4⁺ T cells were isolated from spleens of littermate or *Atg5^{fl}* dLck-cre mice. Cells were stimulated when indicated by 50 ng/mL PMA and 1 μg/mL Ionomycin for 18 hours. During the last 4 hours of stimulation, cells were treated when indicated with pepstatin A and E64d. Cell lysates were then processed by SDS-PAGE and blotted against ATG5 and LC3. Representative experiment of at least three replicates. Complete images of different blotting of the same membrane, including data with wild type C57BL/6 (B6) mice, are shown in Figure S1. (B) Left: Representative dot plots of thymocytes stained by anti-CD4 and anti-CD8 Abs (left) from B6, littermate (LM), *Atg5^{fl}* dLck-cre mice. Right: proportions among thymocytes of double negative (DN), CD4 single positive (CD4 SP), CD8 single positive (CD8 SP) or double positive (DP) cells (n = 5 LM and n = 4 *Atg5^{fl}* dLck-cre mice) (C). Representative dot plots of spleen cell staining by anti-CD4 and anti-CD8 Abs, after gating on TCRβ⁺B220⁻ cells from B6, littermate LM, *Atg5^{fl}* dLck-cre mice. (D) Percentages of CD4⁺, CD8⁺ T cells, and B cells among spleen cells (n = 13 B6, n = 17 LM and n = 17 *Atg5^{fl}* dLck-cre mice). (E) Absolute numbers of naive, effector memory (EM, CD44^{hi} CD62L^{lo}) and central memory (CM, CD44^{hi} CD62L^{hi}) CD4⁺ and CD8⁺ T cells in spleens (n = 12 for each genotype) among TCR-β⁺-gated cells. Each point represents the value obtained with one mouse. LM and *Atg5^{fl}* dLck-cre mice are compared by Mann Whitney U Test. *p < 0.05, ***p < 0.001.

In this work, we generated mice with a deletion of *Atg5*, only in mature T cells, using the distal *Lck* (dLck) promoter conditional knock-out strategy¹⁴. With this new model, we wanted to precisely define the role of autophagy in peripheral T cell homeostasis and function, in the absence of any developmental issue. We particularly focused our attention on the essential role of autophagy in memory CD4⁺ T cell survival. In addition to the proven role of autophagy in CD8 memory maintenance, we describe here a role for this essential survival process in humoral immunity, through the promotion of long-term memory CD4⁺ T cell survival. We show that in memory T cells *ex vivo*, as well as in cells obtained by *in vitro* differentiation systems, autophagy insures the control of lipid load and of a functional mitochondrial pool. These observations endow autophagy with a central role in the survival of memory CD4⁺ T cells.

Results

Autophagy is not required for peripheral CD4⁺ T cell homeostasis. To resolve the question whether autophagy is required for mature T cell homeostasis, we crossed *Atg5^{fl}* animals with mice harbouring a transgene allowing CRE expression, under the control of the distal part of the *Lck* promoter (dLck-cre), only active in mature T cells. We first assessed the efficiency of the deletion. As shown in Figs 1A and S1, no ATG5-ATG12 conjugate was detected by immunoblot in peripheral CD4⁺ T cells isolated from *Atg5^{fl}* dLck-cre mice, contrary to littermates. No conversion from LC3-I to LC3-II (Light Chain 3 abbreviated from microtubule-associated protein light chain 3) was detectable, even after phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)/Ionomycin activation and/or under protease inhibitor treatment, confirming the efficiency of autophagy inactivation in T cells. In thymocytes, no difference was seen between *Atg5^{fl}* dLck-cre mice, and littermate mice, in ATG5-ATG12 or in LC3-II levels. This confirms the expected specific ATG5 deletion only at the mature stage of T cells. We then investigated the impact of this deletion during T cell development. In accordance with the normal expression of ATG5 in the thymus, we did not observe any difference in thymic cellularity (not shown), or in the proportions of each major developmental subpopulation (Fig. 1B). This suggests a normal development of T cells in our model. We then assessed the proportions of lymphocyte populations in secondary lymphoid organs. We observed a decrease in the proportion and number of spleen CD8⁺ T cells (Fig. 1C,D) from *Atg5^{fl}* dLck-cre mice compared to controls. However, in sharp contrast to all conditional deletions reported so far (with cre expressed under the control of *cd4* or *pLck* promoters), we found no difference in CD4⁺ T cell number and proportion among other populations. This finding was extended to another lymphoid organ, namely lymph node (Figure S2). Interestingly, both CD8⁺

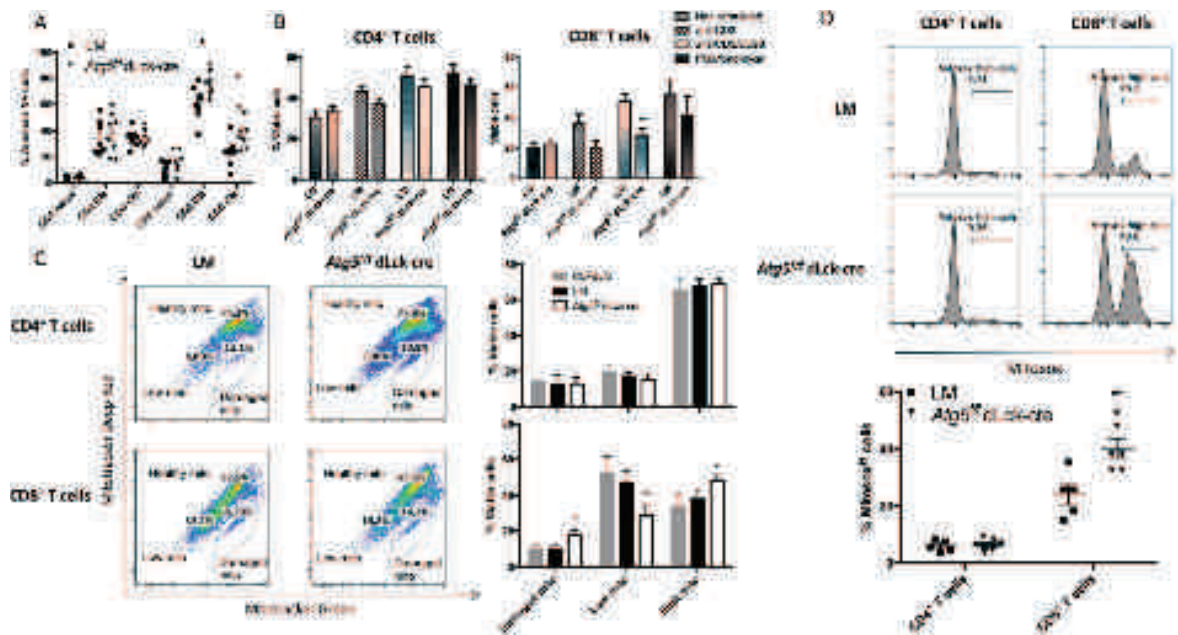


Figure 2. (A) Percentages of dead cells measured by Annexin V staining *ex vivo* from the spleen for the following populations: effector memory (EM, CD44^{hi} CD62^{lo}) and central memory (CM, CD44^{hi}CD62^{hi}) after gating on TCR3⁺CD4⁺ cells or TCR3⁺CD8⁺ cells, from littermate (LM) and *Atg5*^{fl/fl} dLck-cre mice (n = 8 for each genotype). (B) Percentages of viable cells defined as Annexin V⁻/propidium iodide (PI)⁻, defined after stimulation of purified CD4⁺ (left) or CD8⁺ T cells (right) under the indicated conditions (non-stimulated, stimulated by anti-CD3, by anti-CD3 and anti-CD28, or by 50 ng/mL PMA and 1 μM ionomycin, n = 4 for each genotype). (C) Staining of CD4⁺ or CD8⁺ T cells purified from LM or *Atg5*^{fl/fl} dLck-cre mice by mitotracker deep red and mitotracker green. Gates could be defined for cells with either high load of mitochondria (mitotracker deep red^{hi}, mitotracker green^{hi}), low mitochondrial content (mitotracker deep red^{low}, mitotracker green^{low}), or with damaged mitochondria (mitotracker green^{hi}, mitotracker deep red^{low}). On the right, histograms show the results of independent experiments (n = 4 for each genotype). (D) *Ex vivo* staining of spleen cells from LM or *Atg5*^{fl/fl} dLck-cre mice, by Mitosox, after gating on TCR3⁺CD4⁺ cells or TCR3⁺CD8⁺. (Top) representative histograms are shown and (bottom) a summary of different experiments is shown. LM and *Atg5*^{fl/fl} dLck-cre mice are represented and compared by Mann Whitney U Test. **p < 0.01, *p < 0.05.

naive and memory-like (CD44^{hi}) T cell numbers were decreased in *Atg5*^{fl/fl} dLck-cre mice (Fig. 1E). This phenotype suggests a global role for autophagy in the homeostasis of CD8⁺ T cell populations that is not observed in CD4⁺ T cells.

Autophagy is dispensable for early CD4⁺ T cell activation. We then studied the possible causes of CD8⁺ T cell number decrease in *Atg5*^{fl/fl} dLck-cre mice. Compared to littermate control mice, a higher number of memory-like CD8⁺ T cells (effector memory (EM) and central memory (CM)) displayed an apoptotic phenotype in *Atg5*^{fl/fl} dLck-cre mice (Fig. 2A). Less naive CD8⁺ T cells were found in the absence of autophagy, suggesting that cells first acquired an activated phenotype before entering apoptosis, progressively leading to the depletion of the naive cell pool. These data are reminiscent of the ones obtained by Puleston *et al.*¹¹ concluding that CD8⁺ T cell deficiency in the absence of ATG5 is linked to an activated phenotype. In contrast, no impact of autophagy deletion was seen on CD4⁺ T cell apoptosis, leading to the conclusion that ATG5 could be essential for homeostatic survival of CD8⁺ T cells, but not for CD4⁺ T cells. In addition, the survival difference observed between CD4⁺ and CD8⁺ T cells is not due to an escape to cre-mediated deletion in purified CD4 T cells *in vivo*, as *Atg5* transcript levels are equally low in both T cell populations at steady state (Figure S3). We then isolated CD4⁺ and CD8⁺ T cells from *Atg5*^{fl/fl} dLck-cre and control littermate mice and activated them with TCR-related stimulation conditions. We did not detect any survival defect in CD4⁺ T cells (Fig. 2B). However, CD8⁺ T cells exhibited a statistically significant decrease of viability after TCR stimulation in combination with co-stimulation. Thus, autophagy deficiency affects mainly CD8⁺ T cells, at homeostatic conditions, and under stimulation. As survival defects could be linked to mitochondria function, we then assessed the basal mitochondrial load in isolated T cells. We used a double staining with mitotracker (MT) deep red, sensitive to mitochondrial membrane potential, together with MT green, staining mitochondria irrespectively of the membrane potential and allowing to normalize the measurement of membrane potential to the mitochondrial load. First, we found that CD4⁺ T cells exhibit a higher mitochondrial mass in control T cells, in comparison to CD8⁺ T cells (“High mito” population, Fig. 2C). Interestingly, we detected more T cells with a high mitochondrial load, or T cells containing mitochondria with decreased membrane potential (damaged mito), in CD8⁺ T cells isolated from *Atg5*^{fl/fl} dLck-cre mice compared to

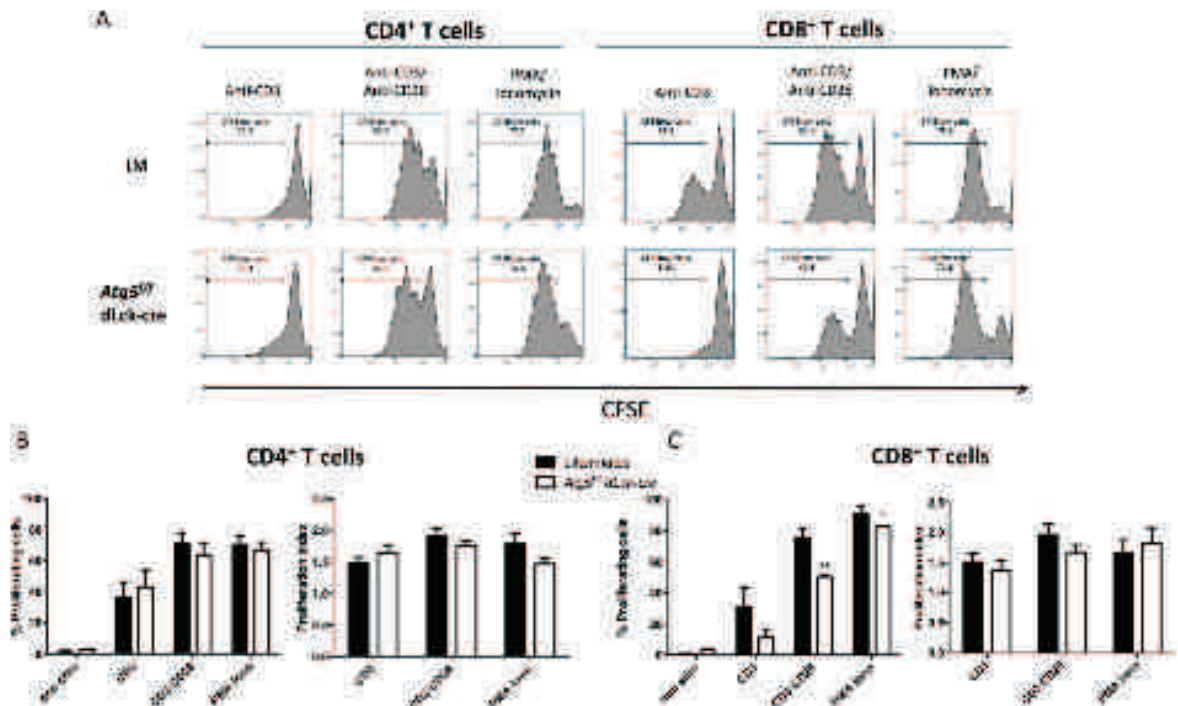


Figure 3. (A) T cell proliferation monitored by carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) staining after stimulation by anti-CD3 antibody, a combination of anti-CD3 and anti-CD28 antibodies or 50 ng/mL PMA and 1 μ g/mL ionomycin, for 72 hours. Percentages shown indicate CFSE^{low} cells, i.e. cells that have proliferated. (B,C) Results obtained on several experiments are synthesized in histograms ($n = 5$ for each genotype). Littermate (LM) and *Atg5^{fl/fl}* dLck-cre mice are represented and compared by Mann Whitney U Test. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$. Percentages of proliferating cells are shown (B) as well as proliferation indexes (C), representing the total number of cell divisions, divided by the number of cells that have proliferated.

control mice. This indicates that ATG5 is required after thymus egress, in CD8⁺ T cells and not in CD4⁺ T cells, to reduce mitochondrial mass. We also found increased mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production by Mitosox staining in spleen CD8⁺ T cells in the absence of ATG5, while no difference was observed in CD4⁺ T cells (Fig. 2D). Altogether, these findings could be related to the homeostatic defects observed in CD8⁺ T cells deficient for ATG5 at the mature stage. In addition to survival defects, we noticed a specific proliferation impairment *in vitro* after three days of TCR-related stimulations in CD8⁺ T cells, but not in CD4⁺ T cells (Fig. 3A,B), in terms of number of cells that enter into a at least one cycle of division. However, as no difference is seen on proliferation index in either CD4⁺ or CD8⁺ T cells, we can speculate that the proliferation defect is linked to the global survival decrease of some CD8⁺ T cells, and not to an abnormal intrinsic proliferative capacity. Moreover, the normal proliferative ability of autophagy-deficient CD4⁺ T cells is not due to an enrichment of ATG5 expressing cells, as deletion is equivalent before and after stimulation (Figure S4). Taken together, these results endow autophagy with a role for CD8⁺ T cell homeostasis. Autophagy is in contrast dispensable for short-term survival and activation of CD4⁺ T cells.

CD4⁺ T cell autophagy increases the efficiency of long-term humoral responses. In our model, neither basal survival of CD4⁺ T cells nor their short-term *in vitro* activation are compromised by the absence of autophagy. This allowed us to define *in vivo* the role of autophagy in T cell help during humoral responses. We immunized mice with the T-dependent antigen ovalbumin (OVA) and performed a boost at day 10 as indicated in Fig. 4A. We monitored the immune response by sampling blood at several time points after OVA administration, and 12 weeks after the start of the experiment. We did not observe any difference at days 5 and 15 in anti-OVA IgM production after immunization, suggesting that there is no major defect in Ig production (Fig. 4B). Absence of any major immunodeficiency or defects in class switching is supported further by the comparable titers of anti-OVA IgG between control mice and mice deficient for autophagy in T cells measured at early time points (Fig. 4C). However, from 8 to 12 weeks, we noticed a significantly reduced anti-OVA IgG titer in mice with *Atg5* deficiency in T cells (Fig. 4D). We then performed a second boost to elicit immune memory and we observed that the response was weaker in *Atg5^{fl/fl}* dLck-cre mice. These results are in accordance with the tendency of a decrease in proportions of germinal center (GC) B cells and the significant lower splenic plasma cell percentage at week 8, when anti-OVA IgG levels start to decline (Figure S5). However, no decrease of Tfh cell counts was found in mice with T cells deficient for autophagy, ruling out a global defect on this cell subtype. This decrease of long-term humoral response in the absence of autophagy in CD4⁺ T cells might then be related to a decline in antigen-experienced memory Tfh cells (and not the whole population), or other helper cell subsets. We then

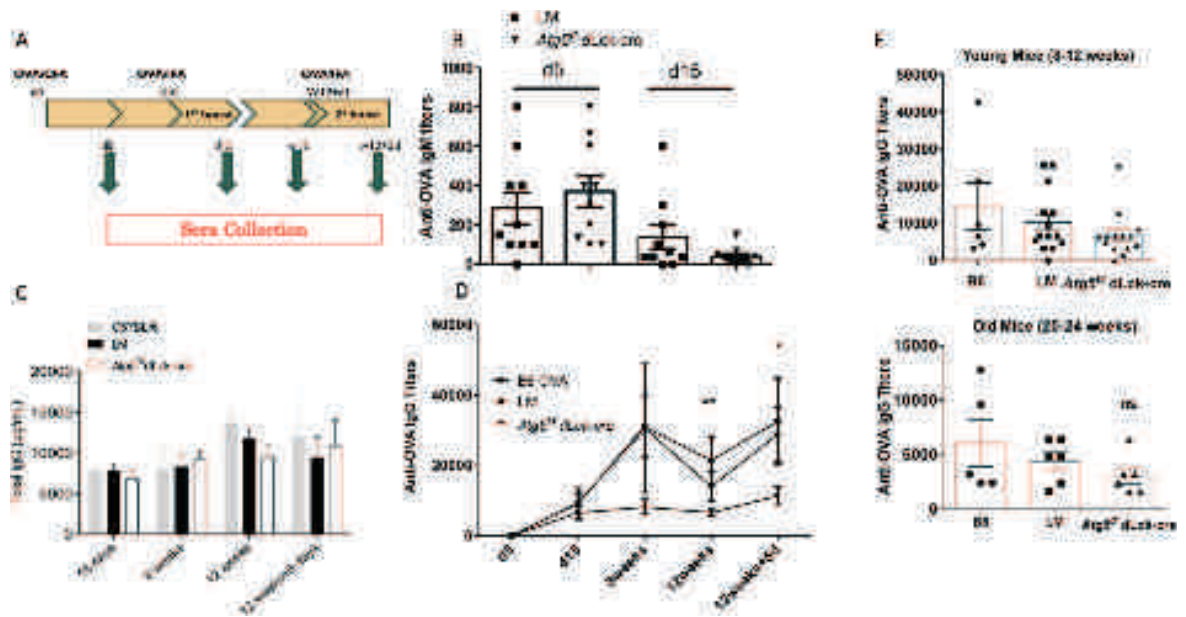


Figure 4. (A) Immunization protocol used for the results presented in B and C, to show the impact of T cell autophagy on long term humoral response. Mice received OVA in complete Freund's adjuvant (CFA) i.p. at day 0, and at day 10 OVA in incomplete Freund's adjuvant (IFA). Mice were then injected i.p. at week 12 + 1 day with OVA in IFA. Sera were collected at days 5 and 15 and then at week 12 and week 12 + 5 days. (B) Anti-OVA IgM titers as measured by ELISA at days 5 and 15 ($n = 10$ littermates (LM) and $Atg5^{fl/dLck-cre}$ mice). (C) Total IgG levels measured by ELISA at different time points after the injection ($n = 2$ B6, $n = 6$ LM and $n = 6$ $Atg5^{fl/dLck-cre}$ mice). (D) Longitudinal monitoring of anti-OVA IgG titers as measured by ELISA ($n = 6$ B6, $n = 12$ LM and $n = 14$ $Atg5^{fl/dLck-cre}$ mice). LM and $Atg5^{fl/dLck-cre}$ mice are compared by Mann Whitney U Test. $**p < 0.01$, $*p < 0.05$. (E) Histograms showing results of anti-OVA IgG, as measured by ELISA obtained after one injection at day 0 and one boost at day 10. Each point corresponds to a measurement for one mouse. Ab titers were measured at day 15. (Top) young mice (8–12-week-old, $n = 6$ B6, $n = 12$ LM and $n = 14$ $Atg5^{fl/dLck-cre}$ mice) and (bottom) old mice (20 to 24-week-old, $n = 5$ B6, $n = 6$ LM and $n = 6$ $Atg5^{fl/dLck-cre}$ mice) from different genotypes were compared. ns: non-significant.

wondered if the long-term effect of autophagy deletion on specific antibodies could result from a global defect in humoral response in these mice, or to an early T cell senescence in the absence of autophagy in mature T cells. As mentioned before, we did not detect any significant decrease of total IgG levels in $Atg5^{fl/dLck-cre}$ mice compared to controls, arguing against a general defect in Ig secretion (Fig. 4C). We then compared immunizations of young and older mice (20–24 weeks old) to assess if old mice exhibited a decreased response to first challenges (with only 1 boost at day 10). We did not observe any significant differences between young control mice and mice with autophagy-deficient T cells (Fig. 4E), in accordance with our initial results at day 15 (Fig. 4D). At short-term, we did not see either any differences in old mice when we compared their production of anti-OVA IgG, with or without ATG5 expression by T cells. These results show that $Atg5$ deficiency in $CD4^+$ T cells does not induce their early senescence. They rather suggest a specific effect on the onset of a memory immune response. We then tested the possibility that an intrinsic defect in $CD4^+$ T cell memory is the cause of the long-term humoral response decrease. To do so, we transferred both antigen-experienced $CD4^+$ T cells (from B6 or littermate controls, or $Atg5^{fl/dLck-cre}$ mice), and B cells in naive mice (Fig. 5A). We then immunized the transferred mice with OVA. We observed a detectable anti-OVA IgG response in mice transferred with littermate antigen-experienced $CD4^+$ T cells (Fig. 5B), while no signal was detected with mice that received naive B6 T cells (not shown). This result reflects the effective transfer of memory, as IgG are reminiscent of a secondary immune response. Interestingly, the anti-OVA IgG response was weaker when mice were transferred with autophagy-deficient $CD4^+$ T cells before immunization. In contrast, we observed a normal anti-OVA IgM response (Fig. 5B). These differences in IgG production were not due to initial deficiency of the $CD4^+$ T cell compartment or in T cell activation. Indeed, naive and memory T cell subsets in immunized donor mice, that reflects the activation status of transferred cells (Fig. 5C), were comparable between control and autophagy-deficient animals. In contrast, at the end of the experiment, the proportion of $CD4^+$ T cells from the donor was reproducibly lower among $CD4^+$ T cells when autophagy-deficient T cells were transferred (Fig. 5D). This suggests that autophagy is needed for the maintenance of injected cells in host animals, and thus for the transfer of memory. Taken together, these results show that an intrinsic defect in autophagy-deficient $CD4^+$ T cell compartment impairs the generation of a memory humoral response.

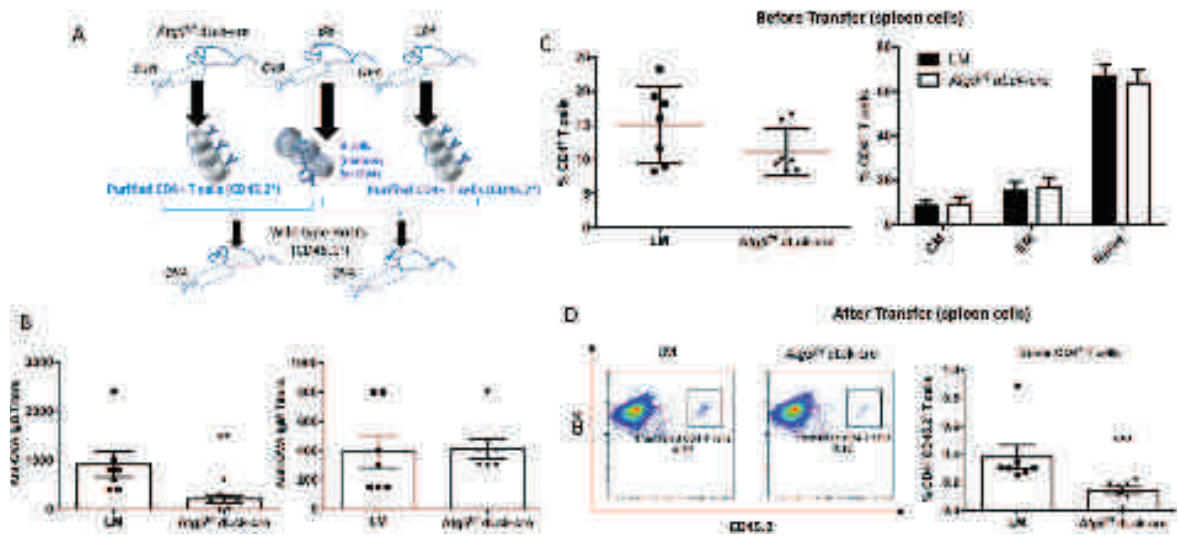


Figure 5. (A) Transfer experiment protocol used to determine the intrinsic defect in CD4⁺ T cell memory in the absence of autophagy. C57BL/6 (B6), littermate (LM) or *Atg5^{fl}* dLck-cre mice received OVA in CFA. B cells were isolated from wild B6 mice and CD4⁺ T cells isolated from LM or *Atg5^{fl}* dLck-cre mice. B cells and CD4⁺ T cells were transferred into naive wild type hosts, that were then immunized by OVA in IFA. (B) Measurement by ELISA of anti-OVA IgG and IgM in serum, 5 days after immunization of transferred naive hosts with OVA. Each point represents an individual measurement, histograms stand for means and bars represent standard deviation (n = 6 transfers with LM T cells and n = 7 with *Atg5^{fl}* dLck-cre T cells). (C) Left: analysis of the proportions of TCRβ⁺CD4⁺ cells in the spleen of donor animals before transfer. Each point represents a single measurement. On the right, activation status of purified CD4⁺ T cells before the injection to host animals. Proportion of naive cells (CD44^{lo}CD62L^{hi}) central memory cells (CM, CD44^{hi}CD62L^{hi}) and effector memory cells (EM, CD44^{hi}CD62L^{lo}) are indicated. (D) Left: Dot plots representing the proportion of donor CD4 T cells (CD45.2⁺ cells among CD4⁺ cells) at the end of the experiment. Right: summary of the obtained results for the mouse studied. LM and *Atg5^{fl}* dLck-cre mice are compared by Mann Whitney U Test. **p < 0.01, ***p < 0.001.

Autophagy is essential for CD4⁺ T cell central memory survival. We then aimed at delineating the underlying defects related to autophagy deficiency in CD4⁺ T cell memory. We sorted naive (CD44^{lo}CD62L^{hi}), effector memory (EM, CD44^{hi}CD62L^{lo}) and central memory (CM, CD44^{hi}CD62L^{hi}) T cells from littermate controls or *Atg5^{fl}* dLck-cre mice, by flow cytometry. As shown before (Fig. 1E), no major difference in CM, EM and naive CD4⁺ T cell repartition was observed before sorting, in *Atg5^{fl}* dLck-cre mice, in comparison to control mice (Fig. 6A). However, when we performed *Atg5* transcript quantification, we observed that in contrast to naive T cells, EM and CM CD4⁺ T cells from *Atg5^{fl}* dLck-cre mice expressed *Atg5* transcript levels closer to control mice (Fig. 6B). This could reflect a selection *in vivo* of cells expressing normal levels of ATG5, *i.e.* incompletely deleted by the cre activity. This observation supports the notion that autophagy is integral to the maintenance of memory. Interestingly we observed in naive T cells, a higher level of neutral lipids, in the absence of autophagy (Fig. 6C,D). This feature is less pronounced in memory cells, that partially escaped *Atg5* deletion according to our previous observation. This suggests that the regulation of lipid stores might be important for memory T cell survival. Interestingly, the overall levels of lipids in memory cells is higher than in naive cells. It is known that memory cells display a different metabolism than naive cells, favouring FAO. We thus quantified the levels of hexokinase A and palmitoyl-carnitine transferase enzyme transcripts (Fig. 6E). We were not able to detect any difference in the levels of these enzymes, either in naive or in memory cells. This could however be due to escape from the deletion in memory cells between littermate and *Atg5^{fl}* dLck-cre mice or indicate that the disequilibrium in neutral lipid stores in the absence of autophagy has no major consequence on the balance between glycolysis and FAO. In accordance with this latter hypothesis, we showed that 7-day activation of T cells deficient for autophagy does not lead to more lactate production than control T cells (Figure S6). To overcome the selection of autophagy-competent cells *in vivo*, we generated memory cells *in vitro*, to assess the role of autophagy in CD4⁺ T cells. We magnetically-sorted CD4⁺ T cells from LM controls or *Atg5^{fl}* dLck-cre mice. We first stimulated them with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies (Abs). In accordance with our previous findings, if no other survival signal was added, we did not detect any difference in terms of survival either in the absence or in the presence of autophagy in CD4⁺ T cells, in the days that followed this initial activation (Figure S7). As previously mentioned, cells initially purified showed no escape from *Atg5* deletion by the cre recombinase (Figure S3). We then aimed at polarizing cells with cytokines, and culturing them during a long period of time, in the presence of IL-7. The latter cytokine is known to drive and to maintain a memory phenotype. Interestingly, during the first days following activation, the survival rate was irrespective of CD4⁺ T cell genotype (Fig. 7A). However, from 21 days on after the start of the culture until the end of the experiment at day 42, in all the tested polarization conditions, a significant decreased survival of CD4⁺ T cells was seen with *Atg5^{fl}* dLck-cre mice (Fig. 7A,B). Interestingly, the carnitine-palmitoyl transferase inhibitor etomoxir, also led in our system to an overall decrease of cell viability of

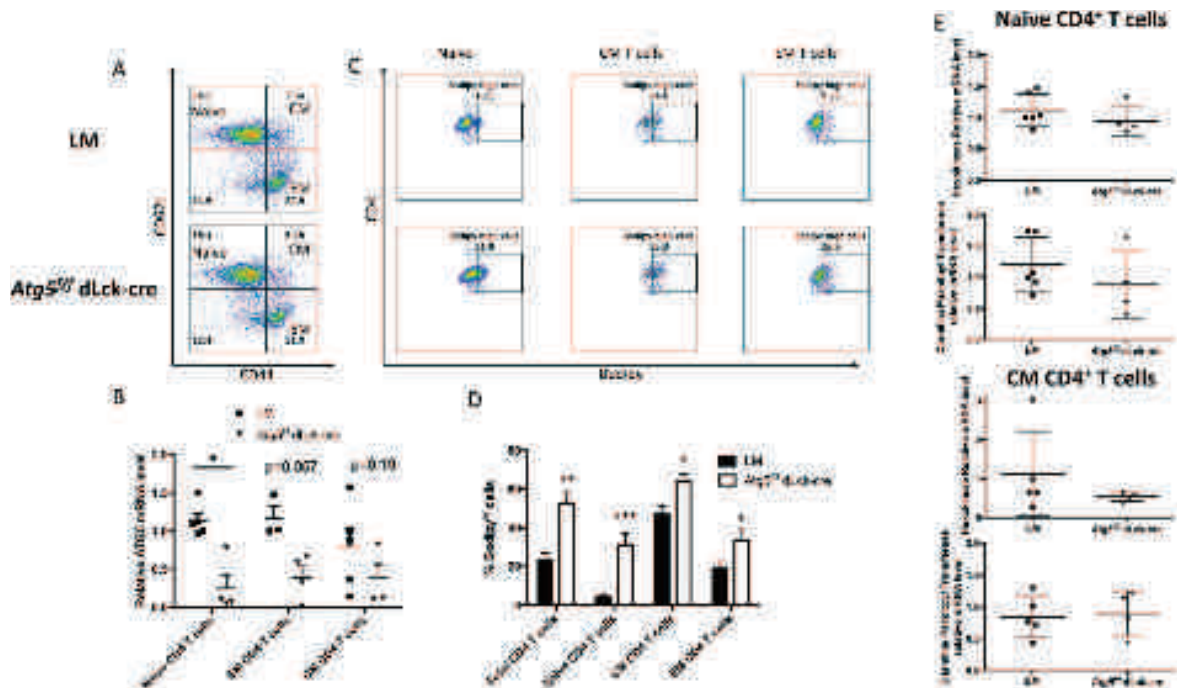


Figure 6. (A) Spleen cells from Littermate (LM) and *Atg5^{fl}/dLck-cre* mice were stained by anti-TCR β , anti-CD4, anti-CD62L and anti-CD44 antibodies. Naive (CD44^{lo}CD72L^{hi}), effector memory (EM, CD44^{hi}CD62L^{hi}), central memory (CM, CD44^{hi}, CD62L^{hi}) CD4⁺ T cells, were quantified, and FACS-sorted. (B) *Atg5* transcripts were quantified by real-time PCR, after cDNA generation, on the indicated FACS-sorted cell populations. (C,D) Spleen cells were stained *ex vivo* by anti-TCR β , anti-CD4, anti-CD62L and anti-CD44 antibodies and Bodipy. Gating strategy to define percentages of cells with a high staining of bodipy is depicted in C, while a summary of the 4 mice tested for each genotype is indicated in D. (E) *Hexokinase* and *Carnitine palmitoyltransferase* transcripts, were quantified by real-time PCR, after cDNA generation, on the indicated cell populations sorted by FACS. LM and *Atg5^{fl}/dLck-cre* mice are compared by Mann Whitney U Test. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001.

wild-type CD4⁺ T cells, in IL-7 supplemented cultures (Fig. 7C). Moreover, this long-term etomoxir treatment leads to an accumulation of neutral lipids, reminiscent of what is observed in *Atg5^{fl}/dLck-cre* CD4⁺ T cells. This suggests that autophagy could play a role in the mobilization of lipids in long-term T cell cultures or in limiting the toxicity of lipid storage. During the *in vitro* differentiation of memory cell, we also monitored the acquisition of the memory phenotype by CD44 and CD62L staining. We showed again that initial activation of CD4⁺ T cells is poorly impacted by the absence of autophagy. Indeed, the proportion between central memory (CM) and effector memory (EM) cells was comparable between cells purified from wild type, LM control, and *Atg5^{fl}/dLck-cre* mice (Fig. 8A,B). However, after day 21, *Atg5*-deficient CD4 T cells failed to efficiently maintain a CM phenotype, compared to controls, as shown by the stagnation of the CM/EM ratio (Fig. 8A–C). The results shown here for Th0 cells, were observed in the other polarization conditions except for Th1 cells, where statistical significance was not reached (Figure S8). These results support the hypothesis that autophagy allows the survival of CM T cells. Contrary to the *in vivo* findings, CM T cells *in vitro* do not escape *Atg5* deletion, as shown by the absence of *Atg5* transcript enrichment after quantification (Fig. 8D). We could then assess bioenergetic levels and strategy for energy production, in memory cells deficient for autophagy, in a more reliable way than in *ex vivo* cells. No difference in overall ATP cellular level was identified in ATG5-deficient memory T cells at day 28 (Fig. 8E, same results at day 21, results not shown). Same as in *ex vivo* situation, we found again no obvious difference in glycolysis enzyme transcript level in Th0 cells (Fig. 8F). A decrease, not reaching significance with the relatively low number of samples, is observed for *cp1t1*. In line with this observation, we found a strong difference in lipid load during the differentiation of memory cells *in vitro*, more striking than the results *in vivo*, where some cells still express *Atg5* (Fig. 9A). All these results underline that, although autophagy controls lipid stores in memory T cells, cell death observed in ATG5-deficient cells is not primarily due to a major energy breakdown but could be linked to a defective FAO. We moreover observed that from day 0 to day 42, CD4⁺ T cells maintain a high load of mitochondria (Fig. 9B–D). We also observed a significantly increased population of T cells with damaged mitochondria, meaning cells with depolarized mitochondria, together with a failure to maintain high loads of healthy mitochondria. Collectively, these results suggest that autophagy is an important factor in the survival of memory CD4⁺ T cells, mainly through the regulation of mitochondrial homeostasis. Autophagy activity could be important to limit the production of toxic compounds released by mitochondria, or accumulated as neutral lipids.

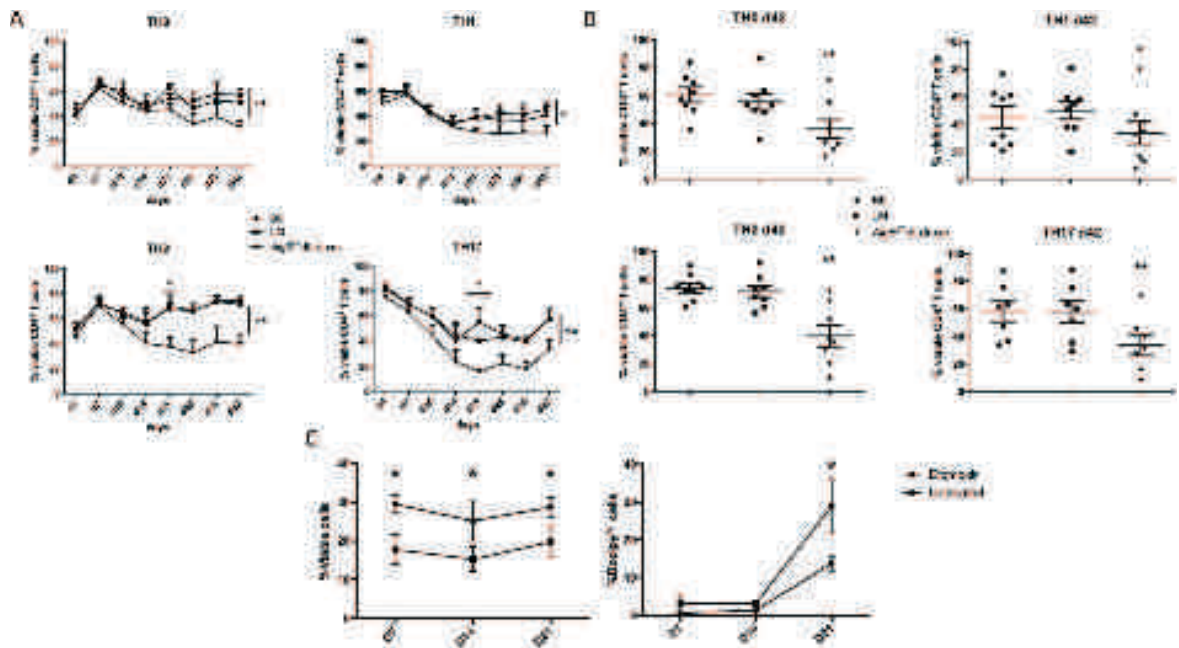


Figure 7. CD4⁺ T cells from C57BL/6 (B6) littermate (LM) and *Atg5^{fl/fl}* dLck-cre mice, were isolated and stimulated by anti-CD3 and anti-CD28 antibodies for 7 days in the presence of polarizing cytokines to differentiate cells into Th0, Th1, Th2 or Th17 cells. Cells were then maintained in IL-7 supplemented medium for additional 35 days. **(A)** Longitudinal study of cell viability by flow cytometry measurement of Annexin V/propidium iodide (PI) negative cells at indicated days for Th0, Th1, Th2, and Th17 cells. **(B)** Results obtained on individual experiments for cell survival at the end of the protocol, at day 42. Each point represents an individual measure; histograms stand for means and bars represent standard deviation. **(C)** B6 CD4 T cells were stimulated according to the same protocol for 21 days, and treated or not by 200 μ M Etomoxir. Cell viability was assessed by measuring Annexin V-/PI- cells. Neutral lipid content was also measured and evaluated by the number of cells with high bodipy mean fluorescence (Bodipy^{hi} cells). *Atg5^{fl/fl}* dLck-cre mice are compared with LM by Mann Whitney U Test to LM mice (n = 8 per genotype). ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05.

Discussion

In this work, we generated a model with autophagy deletion in T cells, only from the mature stage on. We were thus able to bring new information about the precise role for autophagy in T cell homeostasis. As a matter of fact, models described previously^{5–9,15} could not exclude a negative impact of autophagy deletion during T cell development, leading to the acute impaired survival and function that have been reported. The work by Jia *et al.*, also investigated the impact of autophagy deficiency triggered only at the mature stage¹⁵ but with a different model. They used an inducible *Atg3* deletion model, with estrogen receptor promoter-mediated deletion. They described defects during long-term cultures after tamoxifen treatment *in vitro*, thus in mature T cells. However, this model did not allow to study the *in vivo* behaviour of autophagy-deleted T cells. Our aim was to fill this gap of knowledge and analyse *in vivo* the consequences of autophagy inhibition in T cells in the periphery, excluding misinterpretations due to developmental issues. We report here that CD4⁺ T cells are poorly sensitive to autophagy impairment in the mature stage, contrary to CD8⁺ T cells. It has been reported previously that mitophagy was a major actor for T cell survival. Indeed, thymocytes exhibit a high mitochondrial load^{4,7}. During thymus egress of differentiated cells, mature T cells lose a considerable part of their mitochondrial load. Interestingly, we report here that this decrease in mitochondrial load is more pronounced in CD8⁺ T cells than in CD4⁺ T cells. Moreover CD8⁺ T cells produced more mitochondrial ROS in the absence of autophagy, which could explain their survival defect in this context. In relation to these findings, we found *in vitro* that CD4⁺ T cell activation, survival and proliferative capacity were not affected by the impairment of autophagy. These results may seem surprising considering the results published by Jia and colleagues showing that degradation of p27, favouring proliferation under TCR stimulation, is mediated by autophagy¹⁶. In their work, however, most *in vivo* experiments focused on CD8⁺ T cells, in which autophagy seems to be more required for homeostasis. Moreover, experiments monitoring CD4⁺ T cells were performed with deletion early during development (by the use of the proximal Lck promoter). Collectively these results led to the conclusion that autophagy is not required for naive CD4⁺ T cell homeostatic survival and short-term activation, in contrast to CD8⁺ T cells.

In vivo experiments with *Atg5^{fl/fl}* dLck-cre mouse model showed that autophagy was not required for short-term antibody response against a T-dependent antigen. Moreover, total IgG and IgM levels were found to be normal in *Atg5^{fl/fl}* dLck-cre mice, confirming that no major humoral immunosuppression occurs. Interestingly, however, we observed that long-term immune response was compromised in the absence of autophagy in CD4⁺ T cells. As we ruled out increased senescence of the CD4⁺ T cell compartment with *Atg5* deficiency, we hypothesized

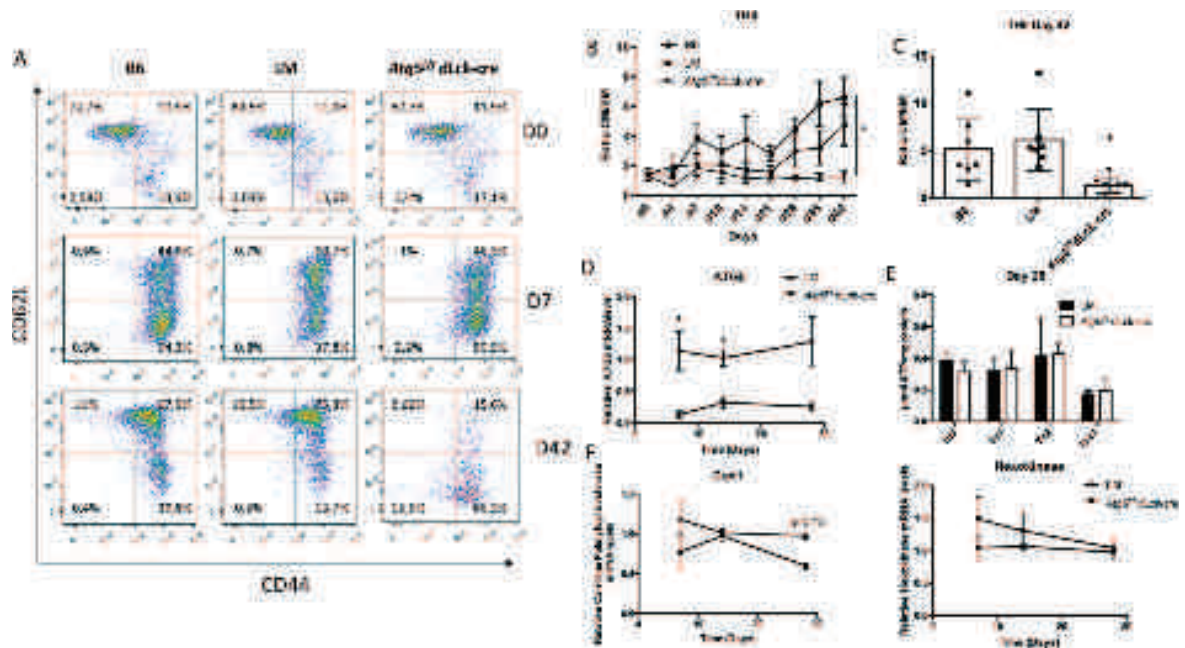


Figure 8. CD4⁺ T cells were isolated from C57BL/6 (B6) littermate (LM) and *Atg5^{fl/fl}* dLck-cre mice and stimulated by anti-CD3 and anti-CD28 Abs for 7 days in the presence of polarizing cytokines to differentiate cells into Th0, Th1, Th2 or Th17 cells. Cells were then maintained in IL-7 supplemented medium for additional 35 days. (A) At indicated days (0, 7 and 42) cells were stained to detect CD44 and CD62L expression and analyzed by flow cytometry. A representative experiment is shown for each genotype (B6, LM and *Atg5^{fl/fl}* dLck-cre). Central memory T cells (CM) were defined as CD44^{hi}CD62L^{hi}, effector memory T cells (EM) were defined as CD44^{hi}CD62L^{lo} and naive cells were defined as CD44^{lo}CD62L^{hi}. *Atg5^{fl/fl}* dLck-cre mice are compared with LM by Mann Whitney U Test to LM mice (n = 8 per genotype). *p < 0.05 (B) Longitudinal study of the ratio between percentages of CM T cells and EM T cells among viable cells, measured by flow cytometry, at indicated days for Th0 cells. (C) Results obtained on individual experiments for ratio between percentages of CM T cells and EM T cells among viable cells at the end of the protocol, at day 42. Each point represents an individual measurement; histograms stand for means and bars represent standard deviation. (D) Quantification of *Atg5* transcripts in the cultured Th0 cells at days 7, 14 and 28 by real-time PCR. One littermate sample is arbitrarily set to 1. n = 4 each genotype except for D28 with n = 2 littermates and n = 4 *Atg5* deficient T cell samples. (E) ATP concentration measured on cell lysates for cell cultures at 28 days, with the conditions indicated in D. (F) *Hexokinase* and *Carnitine palmitoyltransferase* transcripts, were quantified by real-time PCR, after cDNA generation, on the cultured Th0 cells at days 7, 14 and 28. One littermate sample is arbitrarily set to 1. n = 4 each genotype except for D28 with n = 2 littermates and n = 4 *Atg5* deficient T cell samples.

that memory CD4⁺ T cells were selectively impacted by the absence of autophagy. Indeed, we observed that antigen-experienced CD4⁺ T cells transferred to a naive host were unable to recapitulate the memory effect. We also evidenced a selection of autophagy-competent T cells in the central memory T cell compartment, showing the preferential importance for autophagy in this cell population in comparison to naive T cells. Moreover, memory CD4⁺ T cells differentiated *in vitro* exhibited decreased survival. These findings are reminiscent of previous studies indicating that autophagy is integral to memory CD8⁺ T cell survival. Using transfer experiments with autophagy deficient CD8⁺ T cells¹¹, or mouse strains with autophagy deletion occurring only at the cytotoxic stage¹², it has been previously shown that autophagy allowed the maintenance of the memory CD8 T cell compartment, and was mandatory for influenza memory cytotoxic response. Puleston and colleagues further showed that memory CD8⁺ T cells required autophagy for limitation of mitochondrial load and generation of ROS leading to increased apoptosis. We also found a deregulated mitochondrial pool in autophagy-deficient memory CD4⁺ T cells showing that they require mitophagy for proper removal of damaged mitochondria. We further discovered that this process seems more important for CM T cell survival than for EM T cells. Memory T cells have been shown to particularly rely on energy produced by mitochondria, such as FAO, for their long term survival². We cannot rule out either an importance of proper ER content control by autophagy as suggested by Jia *et al.*¹⁵.

We also identified for the first time a deregulated lipid storage in the absence of ATG5. Interestingly, lipid stores are more important in memory T cells, which can be put in line with the higher FAO activity of these cells compared to naive cells. Such a deregulation was also observed *ex vivo*, but only in naive cells, that did not escape ATG5 deletion. The *in vitro* experiments show that although memory cells exhibit aberrant mitochondrial populations and lipid stores, their metabolism seems unchanged. Indeed, no major energy breakdown was noticed in the absence of ATG5, nor unbalanced glycolysis/FAO usage in comparison to control cells. We however observed that treatment by the FAO inhibitor etomoxir, in long-term IL-7 supplemented cultures, leads to an increased

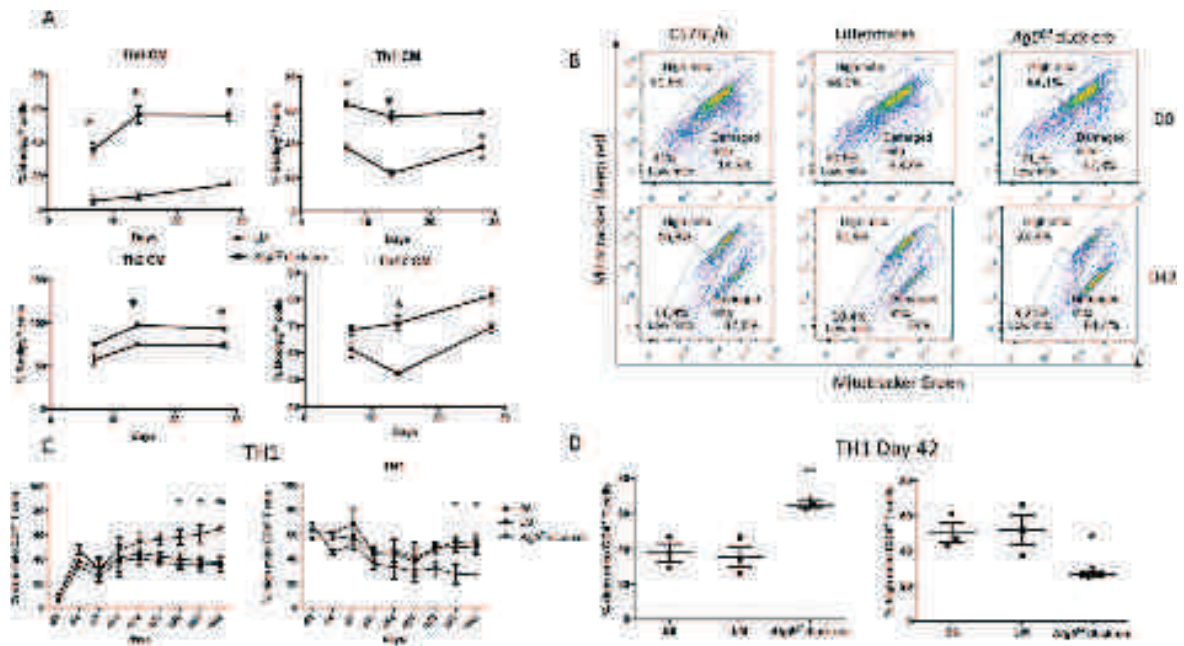


Figure 9. CD4⁺ T cells were isolated from C57BL/6 (B6) littermate (LM) and *Atg5^{fl/fl}* dLck-cre mice and stimulated by anti-CD3 and anti-CD28 Abs for 7 days in the presence of polarizing cytokines to differentiate cells into Th0, Th1, Th2 or Th17 cells. Cells were then maintained in IL-7 supplemented medium for additional 35 days. **(A)** Longitudinal study of bodypy staining intensity. Cells were stained for CD62L and CD44. Cells exhibiting a CM phenotype (CD44^{hi}CD62L^{lo}), with a high level of bodypy staining, were quantified at days 7, 14 and 28. **(B)** At indicated days (0 and 42), cells were stained by mitotracker deep red and mitotracker green. Gates could be defined for cells with high load of mitochondria (mitotracker deep red^{hi}, mitotracker green^{hi}), cells with low mitochondrial content (mitotracker deep red^{low}, mitotracker green^{low}) and cells with damaged mitochondria (mitotracker green^{hi}, mitotracker deep red^{low}). A representative experiment is shown. **(C)** Longitudinal study of percentages of CD4⁺ T cells with high mitochondria content (right) or damaged mitochondria (left). **(D)** Results obtained on several individual experiments for percentages of CD4⁺ T cells with high mitochondria content (right) or damaged mitochondria (left) at day 42. Each point represents an individual measurement; histograms stand for means and bars represent standard deviation. *Atg5^{fl/fl}* dLck-cre mice are represented and compared with LM by two-way ANOVA (n = 3 for each genotype). *p < 0.05 **p < 0.01.

CD4⁺ T cell death and an accumulation of lipid stores, resembling the phenotype of *Atg5^{fl/fl}* dLck-cre mice. This suggests that autophagy could facilitate memory CD4⁺ T cell survival by regulating lipid turnover, but not for the generation of energy. We thus propose that the control of mitochondria and lipid stores by autophagy is particularly important to remove toxic compounds as ROS or excess lipids. Interestingly, high lipid loads are linked to cell death, especially via ER stress. This phenomenon may be more pronounced when there is an aberrant lipid oxidation due to mitochondria-derived ROS, that might take place in ATG5 deficient-memory CD4⁺ T cells. Indeed, lipophagy has been shown to protect several cell types from cell death¹⁷. This aspect deserved further studies.

In conclusion, we report here the crucial importance of autophagy in CD4⁺ T cell-related immune responses. Added to the previously described role of autophagy in CD8⁺ T cell memory response and thus in cytotoxic effector responses, our results lead us to conclude that optimal antibody responses require autophagy in T cells. These results can also be put in line with the described roles for autophagy in memory B cells and plasma cell long-term maintenance^{18–22}. Thus, in support of recent data^{11,12}, our findings reinforce the idea that increasing autophagy could optimize the efficiency of humoral responses at several levels. Moreover, inhibiting autophagy could limit the chronicity of systemic autoimmune responses, and this not only at the level of the B cell lineage as recently described²¹, but also by limiting the persistence of pathogenic autoreactive CD4⁺ T cells.

Material and Methods

Mice. *Atg5^{fl/fl}* mice were kindly provided by Prof. N. Mizushima²³. They were crossed with *distal Lck* (*dLck*)-cre mice for mature T-cell specific deletion¹⁴. *Atg5^{fl/fl}* dLck-cre mice were compared with either C57BL/6 mice, or littermates (B6 *Atg5^{fl/fl}* dLck-cre mice or *Atg5^{fl/fl}* mice). Genotype of mice was determined for *Atg5* alleles by PCR as described in²¹. Presence of the cre transgene was assessed with the following primers pairs: cre-1 5'-ATGGTGCCCAAGAAGAAGAG-3'; cre-2 5'-CAGGTGCTGTTGGATGGTCT-3'. Animal experimentation was performed according to guidelines of the local Institutional Animal Care and Use Committee (CREMEAS). Authorization for the presented experimentations was given by CREMEAS (reference AL/07/07/01/13).

Real-time PCR. Total RNA was purified from 5×10^6 T cells with RNeasy Mini Kit or from 10^5 cells with the RNeasy Micro Kit (Qiagen, Courtabeuf, France, 74103 or 74004) according to the manufacturer's instructions. Samples were treated by DNase (Qiagen, 79254) and RT was performed with the Maxima first strand synthesis (ThermoFisher, Illkirch, France). cDNA (10 ng) were used for real-time PCR (RT-PCR) on StepOne apparatus (Thermo-Fisher). *Atg5*, *Hexokinase (Hk2)*, *Carnitine Parmlitoyl Transférase (cpt1a)* and *Gapdh* expression was assessed using Taqman Gene Expression Assays (ThermoFisher: Mm00504340_m1, Mm99999915_g1, Mm00443385_m1, MMm01231183_m). *Atg5* mRNA levels were quantified by defining Δ CT (CT *Gapdh* – CT “tested gene” where CT is ‘Cycle Threshold’) and $\Delta\Delta$ CT (Δ CT sample – Δ CT of one C57BL/6 mouse sample used for each plate). Values indicated correspond to $2^{-\Delta\Delta$ CT. The value obtained for 1 control sample in each plate is set to 1.

Flow cytometry and cell sorting. The following antibodies were used for flow cytometry analysis. For surface stainings: allophycocyanin (APC)-cyanine 7-labelled anti-mouse TCR- β (clone H57-597, BD Biosciences 553139), phycoerythrin (PE)-labelled anti-mouse CD62L (clone MEL-14, BD Biosciences 553151), fluorescein isothiocyanate (FITC), APC or peridinin chlorophyll (PerCP) cyanine 5.5-labelled anti-mouse B220 (clone RA3-6B2, BD Biosciences, 553087, 553092, and 552771), FITC-labelled anti-mouse CD3 ϵ (clone 145-2C11, BD Biosciences 553061), APC cyanine 7, PE or PerCP cyanine 5.5, APC-labelled anti-mouse CD4 (clone GK1.5.552051, eBioscience 12-0041 or clone RM4-5, BD Biosciences, 550954, 553051), PerCP cyanine 5.5-labelled anti-mouse CD8 (clone 53-6.7, BD Biosciences, 551162), APC cyanine 7 or FITC-labelled anti-mouse CD44 (clone IM7, BD Biosciences 559250, 103027, 553133), PE-labelled CD127 (IL-7R, clone A7R43 eBioscience 12-1271-82). For intracellular stainings: PE-labelled anti-mouse IL-4 (clone BVD4-1D11, BD Biosciences, 554389), PE-labelled anti-mouse IL-17A (clone eBio17B7, 12-7177-81), FITC-labelled anti-mouse IFN- γ (clone XMG1, BD Biosciences, 554411), Alexa-647-labelled anti-mouse/human TBET (clone O4-46, BD Biosciences, 561267), PE cyanine 7-labelled anti-mouse GATA3 (clone L50-823, BD Biosciences, 562683), PerCP cyanine 5.5-labelled anti-mouse ROR γ T (cloneQ. 31-378, BD Biosciences, 560405), GL7-FITC (clone GL7, Biosciences 553666), anti-CD95 AF647 (clone JO2, BD Biosciences 563647), anti-PD1 (clone J43, BD Biosciences 551892), anti-CXCR5 APC (Clone 2G8, BD Biosciences 560615) anti-CD138 APC clone 281-2, BD Biosciences 558626). Splenocytes, thymocytes or lymph node cells were stained with indicated Abs and Fc blocking Ab CD16/CD32 Ab (clone 2.4G2, BD Biosciences, 553142) as described in²¹. After surface staining, in some cases, fixation and permeabilization set (eBioscience; 88-8824-00) was used to detect intracellular molecules. Cells were incubated 30 min in the fixation buffer, followed by a 10 min-incubation with anti-CD16/32 antibody in the buffer furnished by supplier and were finally stained for 45 min with Abs indicated above. Between each step, cells were washed with supplier's buffer. Mitochondrial load and membrane potential were assessed by staining cells with respectively mitotracker green and deep red dyes (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA; M-7514 and M22426) as described in²¹. Mitochondrial ROS production was assessed by Mitosox staining according to manufacturer's instruction (Fischer Scientific, M36008). Lipid storage was monitored with Bodipy staining (Fisher Scientific, Illkirch, France) in PBS for 20 minutes at 37°C. Cell survival was assessed using FITC or APC-labelled Annexin V (BD Bioscience, 556419, 550475) in combination with propidium iodide (PI) at 1 μ g/mL (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin, France; P4170) or 7-aminoactinomycin D (7-AAD, BD Pharmingen, 559925) following the indications from the suppliers. Samples were processed on a Gallios flow cytometer (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) and data were analysed with FlowJo software v10 (FlowJo LLC, Ashland, OR, USA). Proliferation indexes were determined according to the “proliferation modelling” tool provided by FlowJo Software. Naive, effector memory, central memory CD4⁺ T cells were sorted from mouse spleens at the cytometry facilities of IGBMC (Institute for genetics, molecular and cellular biology, Illkirch, France) after TCR β , CD4, CD62L and CD44 staining. Purity of each fraction was >98%.

ATP and lactate quantification. Briefly, 1.10^5 cells were lysed in the following buffer: 25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5, 0.1% (v/v) Triton X-100 in the presence of protease inhibitors. ATP cellular levels were quantified with the ATP determination kit (Fisher Scientific, France). The results were normalized relative to the total protein content measured by BCA kit (Pierce). Lactate was quantified on supernatant from 7-day cultures of purified CD4⁺ T cells in the aforementioned conditions. The Lactate-Glo kit from Promega (Charbonnières-les-bains, France) was used according to manufacturer's instructions.

Western Blot. The following antibodies were used for immunoblots: ACTB (Santa Cruz Biotechnology, clone C4, sc-47778), MAP1LC3 (LC3, MBL, clone 51-11, ref M115-3) and ATG5 (Rabbit Polyclonal, Novus, NB110-53818). In indicated conditions, cells were previously treated by lysosomal protease inhibitors E64d and pepstatin A (5 μ g/mL each, Sigma-Aldrich, P5318 and E8640 respectively). When indicated, cells were stimulated with hamster anti-mouse CD3 ϵ (5 μ g/mL, clone 145-2C11, 55305, BD Pharmingen), hamster anti-mouse CD28 (5 μ g/mL, and clone 37.51, 553294, BD Pharmingen), phorbol-12-myristate 13-acetate (PMA, 50 ng/mL, Sigma) or ionomycin (1 μ M, Sigma). Immunoblots were processed as described in²¹.

Immunizations. Intra-peritoneal (i.p.) injections were performed on day 1 and 10, with mice aged 8-20 weeks. A third immunization was performed 12 weeks after the first one. Mice were bled on days 5 and 15, on weeks 8 and 12 + 5 days. Mice were immunized by OVA (100 μ g, Sigma), at first injection in CFA (complete Freund's adjuvant, Sigma) and at second and third injections in IFA (incomplete Freund's adjuvant, Sigma). Detection of anti-OVA IgM and IgG Abs was assessed by ELISA.

Antibody detection by ELISA. General procedure for ELISA was previously described²¹. Serum levels of total IgG and IgM were determined in immunized mice using the IgM/IgG quantification kit from Bethyl laboratories following manufacturer's indications (Bethyl, Montgomery, TX, USA, E90-101/E90-131). Concentrations were determined with standard curves. Anti-OVA specific Abs were titrated by serial dilutions of serum. Titers

correspond to the inverse of last dilution with optical density ≤ 0.2 . IgG and IgM absolute quantifications were performed after comparison to a standard.

Cell isolation and culture. Splens were collected from B6, dLck-cre *Atg5^{fl/fl}* mice or from littermates. Splenic CD4⁺ or CD8⁺ T were isolated with the Dynabeads untouched mouse CD4 or CD8 cells isolation kit (ThermoFisher Scientific, Illkirch, France, respectively 11415D and 11417D). Cells were >90% pure according to TCR β^+ /CD4⁺/B220⁻ or TCR β^+ /CD8 α^+ /B220⁻ population quantifications by cytometry. When indicated, cells were stimulated with hamster anti-mouse CD3 ϵ (5 μ g/ml, clone 145-2C11, 553057, BD Pharmingen), hamster anti-mouse CD28 (5 μ g/ml, and clone 37.51, 553294, BD Pharmingen), PMA (50 ng/ml, Sigma) or ionomycin (1 μ M, Sigma). Cell proliferation was assessed by staining cells with carboxyfluorescein succinimidyl ester diacetate (0.5 μ M, CFSE, Sigma) before stimulation. When indicated, proliferation indexes were calculated with the tool provided by FlowJo and corresponds to the total number of divisions divided by the number of cells that went into division.

CD4 T cell polarization and long-term culture. After isolation, splenic CD4 T cells were cultured at 37 °C, 5% CO₂ in complete medium (RPMI 1640 medium, 10% FCS, 10 mg/ml gentamycin, 10 mM HEPES and 0.05 mM β -mercaptoethanol, all purchased from Lonza BioWhittaker) supplemented with the according cytokine/antibody cocktail for each T helper cell subset. For the non-polarized condition (Th0), cells were only stimulated with anti-mouse CD3 ϵ and CD28 Abs (clone 145.2C11, 553057, and clone 37.51, 553294, see cell isolation and cell culture for the concentrations). In addition to the anti-CD3/CD28 Ab stimulation, anti-mouse IL-4 Ab (10 μ g/ml, clone 11B11, 554432) and recombinant mouse IL-12 (2 ng/ml, p70, 554592) were added, for Th1 polarization, anti-mouse IFN- γ Ab (10 μ g/ml, clone XMG1.2, 554408) and recombinant mouse IL-4 Ab (15 ng/ml, 550067) for Th2 polarization and finally anti-mouse IL-4 Ab, anti-mouse IFN- γ Ab, recombinant mouse IL-6 (10 ng/ml, 554582) and recombinant mouse TGF- β 1 (1 ng/ml, R&D Systems, 7666-MB-005), for Th17 polarization. The cells were cultured at a density of 10⁵ cells/well in a 96-well plate for four days. Then, cell polarization was assessed by flow cytometry, cell medium was changed and recombinant IL-7 (5 ng/ml, 407-ML-005, R&D Systems) was added every 3–4 days and the medium changed every 7 days. At these time points, cells were counted, and cell number was adjusted to 10⁵ cells/well. The CD4 T cells were maintained in culture for 42 days. Cytokines and Abs used were purchased from BD Biosciences, except if otherwise specified. In some experiments, cells were treated by 200 μ M Etomoxir (Sigma-Aldrich, E1905) for 21 days.

Adoptive transfer. The donor mice (B6, dLck-cre *Atg5^{fl/fl}* mice or littermates) were immunized with 100 μ g OVA/CFA injected i.p. Four weeks later, the mice were sacrificed and CD4⁺ T cells were isolated from the spleen of each mouse. Memory B cells were also isolated from the spleen of one B6 immunized mouse. Positive memory CD4 T cell isolation was accomplished using the CD4 (L3T4) MicroBeads cell isolation kit (130-049-201; Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany). Preparations contained more than 85% CD4⁺/CD8 α^- /B220⁻ cells as checked by flow cytometry (~20% were however neither CD8⁺ nor B220⁺). Negative isolation of memory B Cells was performed with the CD43 (Ly-48) MicroBeads cell isolation kit (130-049-801, Miltenyi) following manufacturer's recommendations. Resulting CD4⁻/CD8 α^- /B220⁺ B cells were >90% pure. CD4⁺ T cells and B cells were co-injected in recipient B6 mice in the proportion of 2 \times 10⁶/2 \times 10⁶ cells respectively. Seven days after adoptive transfer the recipient mice were immunized with 100 μ g OVA/CFA and 7 days later they were bled. Detection of anti-OVA IgM and IgG response was assessed by ELISA.

Statistical analysis. Data were analyzed with Prism v6 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA USA). Groups were compared by unpaired tests and considered significantly different when $p < 0.05$. When sample size was sufficient to assume comparable normal distribution (Kolmogorov-Smirnov Test), unpaired t was performed. Otherwise the unpaired non-parametric Mann-Whitney U Test was used. Alternatively, when $n < 3$, we performed two-way ANOVA with Tukey Post-Hoc test.

References

- Cingolani, F. & Czaja, M. J. Regulation and Functions of Autophagic Lipolysis. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **27**, 696–705, <https://doi.org/10.1016/j.tem.2016.06.003> (2016).
- Buck, M. D., O'Sullivan, D. & Pearce, E. L. T cell metabolism drives immunity. *The Journal of experimental medicine* **212**, 1345–1360, <https://doi.org/10.1084/jem.20151159> (2015).
- Pua, H. H., Dzhagalov, I., Chuck, M., Mizushima, N. & He, Y. W. A critical role for the autophagy gene *Atg5* in T cell survival and proliferation. *The Journal of experimental medicine* **204**, 25–31, <https://doi.org/10.1084/jem.20061303> (2007).
- Pua, H. H., Guo, J., Komatsu, M. & He, Y. W. Autophagy is essential for mitochondrial clearance in mature T lymphocytes. *Journal of immunology* **182**, 4046–4055, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0801143> (2009).
- Stephenson, L. M. *et al.* Identification of *Atg5*-dependent transcriptional changes and increases in mitochondrial mass in *Atg5*-deficient T lymphocytes. *Autophagy* **5**, 625–635 (2009).
- Hubbard, V. M. *et al.* Macroautophagy regulates energy metabolism during effector T cell activation. *Journal of immunology* **185**, 7349–7357, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000576> (2010).
- Jia, W., Pua, H. H., Li, Q. J. & He, Y. W. Autophagy regulates endoplasmic reticulum homeostasis and calcium mobilization in T lymphocytes. *Journal of immunology* **186**, 1564–1574, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001822> (2011).
- Kovacs, J. R. *et al.* Autophagy promotes T-cell survival through degradation of proteins of the cell death machinery. *Cell death and differentiation* **19**, 144–152, <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.78> (2012).
- Parekh, V. V. *et al.* Impaired autophagy, defective T cell homeostasis, and a wasting syndrome in mice with a T cell-specific deletion of *Vps34*. *Journal of immunology* **190**, 5086–5101, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202071> (2013).
- Salio, M. *et al.* Essential role for autophagy during invariant NKT cell development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, E5678–E5687, <https://doi.org/10.1073/pnas.1413935112> (2014).
- Puleston, D. J. *et al.* Autophagy is a critical regulator of memory CD8(+) T cell formation. *Elife* **3**, <https://doi.org/10.7554/eLife.03706> (2014).

12. Xu, X. *et al.* Autophagy is essential for effector CD8(+) T cell survival and memory formation. *Nature immunology* **15**, 1152–1161, <https://doi.org/10.1038/ni.3025> (2014).
13. Schlie, K. *et al.* Survival of effector CD8+ T cells during influenza infection is dependent on autophagy. *Journal of immunology* **194**, 4277–4286, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402571> (2015).
14. Wildin, R. S., Wang, H. U., Forbush, K. A. & Perlmutter, R. M. Functional dissection of the murine lck distal promoter. *Journal of immunology* **155**, 1286–1295 (1995).
15. Jia, W. & He, Y. W. Temporal regulation of intracellular organelle homeostasis in T lymphocytes by autophagy. *Journal of immunology* **186**, 5313–5322, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002404> (2011).
16. Jia, W. *et al.* Autophagy regulates T lymphocyte proliferation through selective degradation of the cell-cycle inhibitor CDKN1B/p27Kip1. *Autophagy* **11**, 2335–2345, <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1110666> (2015).
17. Liu, K. & Czaja, M. J. Regulation of lipid stores and metabolism by lipophagy. *Cell death and differentiation* **20**, 3–11 (2013).
18. Conway, K. L. *et al.* ATG5 regulates plasma cell differentiation. *Autophagy* **9**, 528–537, <https://doi.org/10.4161/auto.23484> (2013).
19. Pengo, N. *et al.* Plasma cells require autophagy for sustainable immunoglobulin production. *Nature immunology* **14**, 298–305, <https://doi.org/10.1038/ni.2524> (2013).
20. Chen, M. *et al.* Essential role for autophagy in the maintenance of immunological memory against influenza infection. *Nature Medicine* **20**, 503–510, <https://doi.org/10.1038/nm.3521> (2014).
21. Arnold, J. *et al.* Autophagy is dispensable for B-cell development but essential for humoral autoimmune responses. *Cell death and differentiation* **23**, 853–864, <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.149> (2016).
22. Chen, M., Kodali, S., Jang, A., Kuai, L. & Wang, J. Requirement for autophagy in the long-term persistence but not initial formation of memory B cells. *Journal of immunology* **194**, 2607–2615, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1403001> (2015).
23. Hara, T. *et al.* Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* **441**, 885–889, <https://doi.org/10.1038/nature04724> (2006).

Acknowledgements

We thank Prof. Noboru Mizushima for the gift of *Atg5^{fl/fl}* mice. This work was funded by the French Centre National de la Recherche Scientifique, the Laboratory of Excellence Medalis (ANR-10-LABX-0034) and the EquipEx program I2MC (ANR-11-EQPX-022), Initiative of Excellence (IdEx), Comité interregional de coordination du Grand-Est de la Ligue Contre le Cancer, Fondation Arthritis Courtin and Strasbourg University. It was also supported by grants from EU-funded (ERDF) project INTERREG V “RARENET”. Johan Arnold was a recipient of pre-doctoral fellowships from the Ministère de la Recherche et de l'enseignement supérieur and from Association de Recherche Contre le Cancer; Diane Murera of a pre-doctoral fellowship from the Fond National de Recherche de Luxembourg; Florent Arbogast and Delphine Bouis, of a pre-doctoral fellowship from the Ministère de la Recherche et de l'enseignement supérieur. SM acknowledges the support of the TRANSAUTOPHAGY COST Action, CA15138. We thank Pr Pauline Soulas-Sprauel for careful reading of the manuscript and valuable advises.

Author Contributions

D.M. and F.A. contributed equally to this work. D.M., F.A., J.A. and F.G. performed and designed experiments. F.A. and D.B. performed experiments. D.M., S.M. and F.G. wrote the article.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23993-0>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

Functional autophagy is required for homeostasis maintenance and survival of Langerhans cells.

Florent Arbogast^{1,2}, Delphine Bouis¹, Nikolaus Romani³, Björn E. Clausen⁴, Christopher G. Mueller¹, Frédéric Gros^{1,2}, Vincent Flacher^{1*}.

¹CNRS UPR 3572 "Immunology, Immunopathology and Therapeutic Chemistry"/Laboratory of Excellence Medalis, Institute of Molecular and Cellular Biology (IBMC), Strasbourg, France.

²University of Strasbourg, Strasbourg, France

³Innsbruck Medical University, Innsbruck, Austria

⁴Johannes Gutenberg Medical University, Institute of Molecular Medicine, Mainz, Germany.

* *Corresponding author*

ABSTRACT

Langerhans cells (LCs), the epidermal dendritic cell (DC) subset, present unique features compared to other DCs, notably a self-renewal capacity and an extended lifespan. Macroautophagy (often-named autophagy), a catabolic process regulated by several autophagy-related genes (Atgs), is crucial to prevent accumulation of harmful components in the cytoplasm of long-lived and self-renewing cells. Although autophagy deficiency does affect antigen presentation by conventional DCs but not their survival, previous study did not address LC maintenance. Here, we reveal that deletion of *Atg5* in LCs leads to apoptosis and to the progressive depletion of their epidermal network. This loss is neither link to mitochondria, nor metabolism defects. We demonstrated that *Atg5*-deficient LCs present an extended ER compartment associated with an increased apoptosis. Using a pharmacological inhibitor of autophagy, we observed the same features on human LCs. Altogether, we propose that autophagy is critical to selectively limit ER stress response and ensure LC survival, both in mice and humans.

KEY WORDS

Autophagy, Langerhans cells, ER stress, homeostasis, metabolism

ABBREVIATIONS

APC: antigen presenting cells
Atg: Autophagy-related genes
DCs: Dendritic cells
DETC: Dendritic epidermal T cells
ER: Endoplasmic Reticulum
FCS: fetal calf serum
IRE1: Inositol-requiring enzyme 1
LCs: Langerhans cells
LDs: Lipid droplets
LN: Lymph nodes
MHC-II: Major histocompatibility complex
MT: Mitotracker
ROS: reactive oxygen species
UPR: Unfolded protein response
TGF β -R1: Tumor growth factor β receptor 1
Xbp1 :X-box binding protein 1

INTRODUCTION

Langerhans cells (LCs) are resident sentinels of the epidermis, belonging to the antigen presenting cells (APCs) family (Nishibu et al., 2006). LCs arise from hematopoietic precursors, emerging from the yolk sac and the fetal liver, which colonise the skin before birth (Hoeffel et al., 2012). There, they may be maintained lifelong by local self-renewal mechanisms (Merad et al., 2002). Under stress conditions, such as pathogen recognition, LCs migrate to lymph nodes (LNs), where they directly prime T cell response and might contribute as other dendritic cells (DCs) to antigen presentation (Seneschal et al., 2012 ; Van den Berg et al., 2015). As the first immune cell to potentially encounter pathogens during skin infections, a better understanding of LCs biology appears critical.

Autophagy is a conserved mechanism of self-digestion, allowing the engulfment of cytoplasmic content into double-membrane vesicles, which fuse with lysosome for degradation and recycling of the sequestered content. Autophagy is regulated by nutrient sensors and is promoted as a response to nutrient starvation or to increased energetic demand. Autophagy can thus support metabolic needs (Galluzzi et al., 2014). It also acts as a quality-control mechanism for organelle, for instance by compensating Endoplasmic Reticulum (ER) expansion, and preventing the accumulation of misfolded protein aggregates during the

unfolded protein response (Anding et al., 2017; Niu et al., 2017). These selective forms of autophagy are particularly important in long-lived and self-renewing cells such as neurons, or B-1 B cells (Yoshii et al., 2016; Clarke et al., 2018). Autophagy is also important to sustain metabolic functions, by maintaining a function mitochondrial pool and by contributing to the efficient mobilization of fatty acids (Kim et al., 2014).

At this day, several studies focused on autophagy and its potential functions regarding macrophages and DCs as reviewed in (Ghislat et al., 2018; Bah et al., 2017). These studies demonstrated a role for autophagy in DCs functions, such as in antigen presentation or proinflammatory signals modulations, but concluded excluded that autophagy is necessary for either macrophages or DCs homeostasis. However, a recent paper reported a defect in splenic resident CD8⁺ DCs in absence of the autophagic core protein *Vps34* (Parekh et al., 2017). As LCs are self-renewing long-lived cells, fulfilling APC functions, exposed to stress related to low nutrients availability or UV irradiation in epidermis, autophagy might be important for LC homeostasis. We tested this hypothesis by monitoring the consequences of a specific deletion of *Atg5* in langerin-expressing cells.

RESULTS

ATG5 is necessary for Langerhans Cells network maintenance.

We first aimed to determine if ATG5 was necessary for basal maintenance of LCs. To do so, we generate *Atg5*^{+/-} langerin^{WT/Cre} by crossing previously described mice *Atg5*^{+/-} and *mlangerin*^{WT/Cre} (Arnold et al., 2015; Zahner et al., 2011). This first generation was then crossed with *Atg5*^{flax/flax}, described in (Hara et al., 2006), to generate *Atg5*^{flax/-} *mlangerin*^{WT/Cre} (further abbreviated *Atg5*^{flax/-}langerinCre) and their littermates *Atg5*^{flax+/-} *mlangerin*^{WT/Cre} (further abbreviated LM). These mice were genotyped as described by PCR in their original characterising paper (Figure S1A). We also confirm the efficiency of *Atg5* deletion by sorting LCs in draining lymph nodes (Figure S1B). Indeed, we were able to detect *Atg5* mRNA in LCs sorted from *Atg5*^{flax/-}langerinCre compared to our control mice, even if we observed similar level of the housekeeping gene *Gapdh*.

We then assessed LCs percentage among CD45 expressing cells in the epidermis by flow-cytometry. Since langerin expression in LCs is only complete between 7 and 10 days after birth (Trip et al., 2004), we first assessed LCs network at 10 days post birth and monitored it until 6 months (Figure 1A). In our control mice, we observed an increasing proportion of LCs

among CD45 expression populations in the epidermis until 6 weeks, with a decrease of LCs at 6 months. Such results were in accordance with previous reports (Trip et al., 2004). We observed 10 days post-birth a comparable proportion of LCs in *Atg5^{fllox/-}* langerinCre, suggesting an absence of major defect during the setting-up of LCs network in these mice. This proportion exponentially diminishes as a function of time, compared to control mice. Interestingly, LCs do not totally disappeared from the epidermis, but the population proportion reaches a plateau around 6 weeks after birth, which is maintain at least until 6 months. To avoid any bias in our analyses, we additionally compared LCs percentage to dendritic epidermal T cells (DETCs) percentage (figure S2). The LCs/DETCs ratio is under physiological conditions maintained around 1. We observed a significant decrease of this ratio in our *Atg5^{fllox/-}* langerinCre compared to control mice, confirming a loss of LCs as a function of time.

We also performed an immunofluorescent staining of LCs network using ear epidermis (figure 1B). As expected, we did not observe any obvious difference in LCs network when looking on 10 days mice. However, and accordingly to flow-cytometry results, we saw an important loss of LCs in 6 months old *Atg5^{fllox/-}* langerinCre. Interestingly, the remaining LCs were not disseminated along the epidermis, but rather forming patches. Such patterns are reminiscent of the one observed in tumor growth factor β receptor 1 (TGF β -R1) deficient LCs (Zahner et al., 2011).

Altogether, these results demonstrate that the core autophagic machinery protein ATG5 is crucial for epidermal LCs network maintenance.

ATG5 deficient LCs undergo apoptosis.

We then wanted to determine the reason that would lead to the observed decrease of ATG5 deficient LCs in the epidermis. LCs as other DCs, are able to migrate to LN, either spontaneously, or following inflammatory signals (Henri et al., 2010). Under physiological condition, TGF β -R1 is necessary to maintain an immature LCs state (Kel et al., 2010). Loss of TGF β signaling, induces a spontaneous maturation of LCs, which in return, upregulate several activation markers such as the major histocompatibility complex class two (MHC-II) or CD86. We first checked if in our *Atg5^{fllox/-}* langerinCre, LCs spontaneously mature and emigrate from the epidermis. We then measure the relative amount of MHC-II and CD86 expressed by LCs in the epidermis, during the first weeks of life of our mice (Figure 2A). We did not observe any difference in these markers expression in our *Atg5^{fllox/-}* langerinCre compared to our control mice. Since LCs are long-live cells DCs (Merad and Manz, 2009),

we reasoned that a massive emigration from the epidermis should lead to an accumulation of these cells in the LNs. We digested the inguinal and brachial LNs, two skin draining LNs, of 6 weeks old mice (Figure 2B). Interestingly, we observed a significant decrease in percentage and a tendency in LCs number and in our *Atg5^{fllox/-}* langerinCre compared to our control mice. Intriguingly a similar lowest amount of CD103+ DCs, a dermal subset that also express Langerin, was observed. However and as expected no difference were observed on other dermal DCs subsets that are not depleted in ATG5. These results exclude a massive deregulation in LCs spontaneous maturation and migration.

To compensate for this spontaneous migration and maintain the integrity of their epidermal network, LCs proliferate at several timepoints, notably 4 weeks after birth (Chorro et al., 2009; and unpublished observations). Consequently, we assessed if ATG5 deficient LCs present impaired proliferation capacities (Figure 2C). We observed comparable percentage of 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) and Ki-67 stained LCs in 4 weeks old *Atg5^{fllox/-}* langerinCre compared to our control mice. These results led us to exclude a major proliferative capacity in ATG5 deficient LCs.

Our next hypothesis was that LCs network was altered by an increased apoptosis of LCs in absence of *Atg5*. We assess this parameter by measuring the amount of the activated caspase-3 form in LCs by flow cytometry (Figure 3C). Interestingly, we observed an increased expression of this pro-apoptotic protein in ATG5 deficient LCs, both in epidermis and in LNs. Altogether, these results demonstrate that ATG5 is crucial, even at basal state, for LCs survival.

ATG5 is necessary for basal homeostasis maintenance of LCs.

We next investigated the potential causes of this increased apoptosis rate in ATG5 deficient LCs. Previous experiments performed under electron microscopy, allowed the observation of mitochondria in double membrane structure, reminiscent of autophagosomes (Schuler et al., 1984). Consequently, we assessed if mitophagy was impacted in LCs because of ATG5 deficiency. In this purpose, we performed a double staining of LCs with mitotracker (MT) Green and Deep Red, on LCs extracted from 2 weeks old mice. While MT Deep Red is sensitive mitochondrial membrane potential, MT Green stains mitochondrial membranes independently of the membrane potential, allowing the normalization the measurement of membrane potential to the mitochondrial load. In these settings, we neither observed a difference in mitochondrial load nor in decreased membrane potential mitochondria, in *Atg5^{fllox/-}* langerinCre compared to our control mice, (Figure 3A). We also assessed the

mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production by performing a mitoSox staining (Figure 3B). Again we did not observe any difference between *Atg5^{fllox/-}* langerinCre and control mice. These results demonstrate that mitophagy is either not ATG5-dependent in LCs, or that they are not sensible to mitophagy loss. Whatever, it excludes a role for mitophagy, in our model, for the observed loss in LCs epidermal network.

Unfolded protein response (UPR) is a cascade of several pathways induced in response to ER stress (Hetz and Rapa, 2018). In particular, the inositol-requiring enzyme 1 (IRE1)/X-box binding protein 1 (Xbp1) axis of the UPR, control DCs survival and maturation (Grootjans et al., 2016). Interestingly, heat-map generated on Immgen highlighted that LCs are supposed to express the higher level of several genes involved in UPR among DCs population (Figure S3). Since autophagy contribute to regulate ER swelling and to limit UPR response (Song et al., 2018), we stained the ER compartment, of LCs extracted from 2 weeks old mice, by using ER-tracker, a dye highly specific for ER membrane (Figure 3C). Using this strategy, we observed an expended ER compartment in *Atg5^{fllox/-}* langerinCre compared to our control mice. In DCs, previous reports demonstrated that an IRE1/Xbp1 overactivation is associated with a higher generation of lipid droplets (LDs) (Grootjans et al., 2016). Thus we assess, this compartment by using bodipy, a neutral lipid staining dye (Figure 3D). Accordingly, we observed a higher neutral lipid load in *Atg5^{fllox/-}* langerinCre compared to our control mice, which suggests a higher number of LDs in these mice. To confirm this result, we observed these bodipy stained LCs under confocal microscope. Accordingly, we observed a higher number of bodipy spots, confirming that *Atg5^{fllox/-}* langerinCre possess a higher lipid droplets load.

Altogether these results demonstrate that ATG5 is crucial for basal LCs homeostasis maintenance.

Lipophagy is dispensable at short time for LCs survival.

Regarding these results, we could however not exclude that ATG5 deficiency impaired LDs mobilisation through lipophagy. Indeed, LDs accumulation could also lead to an ER stress and a defective energetic mobilisation, both eventually leading to apoptosis (Velázquez et al., 2016). To determine if lipid droplets accumulation leads to a cellular cytotoxicity, we treated LCs extracted from 6 weeks old C57BL/6 epidermis, with etomoxir, a carnitine palmitoyltransferase I, blocking the import and mobilisation of fatty acids by mitochondria. Consequently, we observed a higher neutral lipid load in treated LCs, compared to their

none-treated counterpart 24h after treatment (Figure 4A). However, we did not observe any difference in percentage of caspase-3 expressing LCs (Figure 4B). These results suggest that a higher lipids load, does not induce lipid toxicity in LCs.

To determine if LCs rely on lipophagy to generate energy, we starved LCs extracted from 6 weeks old epidermis in PBS completed with 0,5% fetal calf serum for 8 hours. We then monitored the glucose uptake of these cells, using (2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose) (2-NDBG), a fluorescent glucose analogue (Figure 4C). We did not observe any difference in the relative amount of 2-NDBG uptake by LCs from *Atg5^{flox/-}* langerinCre compared to control LCs. This result suggests that LCs are probably not relying that much on fatty acid metabolism.

Altogether, these results suggests that lipophagy is not crucial in LCs.

Autophagy is necessary to maintain human LCs homeostasis.

We then wanted to investigate if this homeostasis maintenance of LCs is mediated by a specific role of ATG5 or if it involved selective autophagy. To do so, we treated LCs extracted from 6 weeks old C57BL/6 with the phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor, wortmannin, which inhibit the initiation of the autophagic process. We then assess if wortmannin treatment reproduce the previously described phenotype. Interestingly, we observed an increased ER compartment, and a higher neutral lipids load in treated LCs, compared to none-treated one (Figure 5A).

Based on these results, we assessed if human LCs share the same requirement for autophagy. We similarly treated human LCs with wortmannin. We observed, comparably to mice, an increased ER compartment and also a higher neutral lipids load in treated LCs compared to none-treated one (Figure 5B).

Altogether, these results demonstrate that autophagy is required to limit ER stress in both mice and human LCs.

MATERIALS AND METHODS

Mice

Mice were bred and maintained on a C57BL/6N background at the animal facility of the Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IBMC, Strasbourg). *Atg5^{flox/flox}* and mLangerinCre mice were respectively gifted by N. Mizushima and B.E. Clausen and

previously characterized (Hara et al., 2006; Zahner et al., 2011). [*Atg5*^{+/-}; mLangerinCre] were obtained from a first cross between mLangerinCre and *Atg5*^{+/-} (described in Arnold et al., 2015), then bred to *Atg5*^{fllox/fllox} to obtain [*Atg5*^{fllox/-}; mLangerinCre] and littermates [*Atg5*^{fllox/+}; mLangerinCre]. Mice were genotyped for their *Atg5* allele and the mLangerinCre transgene as previously described (Arnold et al., 2015; Zahner et al., 2011). All mice were bred and maintained in accordance with guidelines of the local institutional Animal Care and Use Committee.

Cell preparation and culture

Brachial and inguinal lymph nodes were digested in R2 buffer, composed of RPMI-1640 medium containing L-glutamine (Lonza), supplemented with 2% fetal calf serum (FCS; Dutscher), 50 mM β -Mercaptoethanol (Gibco), 1% Gentamicin (Gibco), 10 mM HEPES (Lonza), and containing 50 μ g.ml⁻¹ DNase and 10 μ g.ml⁻¹ collagenase D (Roche) for 1h at 37°C under agitation.

To assess the impact of autophagy inhibition on homeostasis, back skin was digested in R2 buffer, containing 1mg.ml⁻¹ dispase II (Roche) overnight at 4°C. Entire epidermis was then deposited on RPMI medium supplemented with 10% FCS (Dutscher), 50 mM β -Mercaptoethanol, (Gibco), 1% Gentamicin (Gibco), and 10 mM HEPES (Lonza), in Petri Dish at 37°C for 24h to allow the crawl-out of LCs.

LCs percentage in skin, basal caspase 3 activation and proliferation assays were measured after back skin digestion with Trypsin (Origin ?) for 45min at 37°C. Epidermis was then dilacerated with forceps and further separated by 15min digestion in TrypLE (ThermoFisher) on a rotating wheel.

Glucose uptake

Cells obtained by crawl-out were starved for 24h in PBS (Lonza) supplemented with 0.5% FCS for 8 hours. Cells were then incubated in presence of 150 μ M of 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-D-glucose(N13195, ThermoFischer) for 30min at 37°C.

Pharmacological inhibitions

Cells obtained by crawl-out were incubated with the phosphatidylinositol 3 kinase inhibitor wortmannin (W1628) or the carnitine palmitoyltransferase-1 inhibitor, etomoxir (E1905), both purchased from Sigma-Aldrich, at respectively 10 μ M and 200 μ M for 24h at 37°C.

5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation

BrdU was administered by intraperitoneal injection of 100 μ L BrdU (1mg/mL; Sigma) 72 hours prior to analysis, and also delivered in mice drinking water at a concentration of 0.8 mg/ml. Cells were fixed with Cytotfix/Cytoperm buffer (BD Biosciences) and permeabilized with permeabilization buffer (BD Biosciences). DNA was then denatured with a DNase solution (100 μ g/mL, BD Biosciences) in order to improve the accessibility of the incorporated BrdU to the detection antibody.

Flow cytometry staining and analysis

Analyses of cell populations were performed using a ten-colour fluorescence cytometer (GalliosTM Beckman-Coulter), according to standard protocols.

The following antibodies and reagents were used FITC, PE, PerCP5.5, PeCy7, APC, AF700, APCCy7 anti-mouse CD8 (53-6.7), CD11c (HL3), CD103 (M290), Caspase 3 (C92-605), BrdU (B44), Ki67 (B56) from BD Biosciences, Langerin (929F3) from Dendritics, Ia-Ie (M51114.15.2), TCR $\gamma\delta$ (GL3), CD45 (30F11) from Biolegend, HLA-DR (L203) from R&D. FVD450 and FVD780 (65-0863-14 and 65-0865-14) from eBiosciences were used as viability markers. Mitotracker Green, Deep Red (M7514, M22426) MitoSox (M36008), Bodipy (D3922) and ER-tracker (E12353), stainings were performed accordingly to supplier (ThermoFisher) protocols. Data were analyzed with FlowJo software (Treestar).

Quantitative real-time RT-PCR analysis

RNA was extracted from lymph nodes sorted LCs on a FACS Aria cell sorter (BD Biosciences) with RNeasy microKit (Qiagen) and cDNA was obtained with Maxima Reverse Transcriptase Kit (ThermoFisher) using a T100 Thermal cycler (Biorad). Quantitative real-time PCR was performed on cDNA using Taqman preAmp MasterMix and Taqman Universal Mastermix (ThermoFisher) and Assays-on-Demand probes (*Gapdh*: Mm03302249_g1, *Atg5*: Mm00504340_m1). Each sample was amplified in triplicate in a StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystems). mRNA levels were calculated with the StepOne v2.1 software (Applied Biosystems), using the comparative cycle threshold method, and normalized to the mean expression of *Gapdh* housekeeping gene.

Epidermis Immunofluorescence

Ear epidermis was separated from the dermis by ammonium thiocyanate digestion (0.15M) for 20min at 37°C. Epidermis was then fixed using glacial acetone for 15min at 4°C and

permeabilized with TBS 2% BSA 0.05% Triton. Antibodies (see clones used in flow-cytometry) were incubated overnight at 4°C. 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, D1306, Molecular Probes) was incubated 15min at RT. Tissues were mounted and observed under a confocal microscope (Yokogawa Spinning Disk, Zeiss).

LCs Immunostaining

Cells obtained by crawl-out were stained with Mitotracker, ER-tracker or Bodipy (see references used in flow-cytometry), and added on Lab-Tek chamber slides (Thermo Scientific Nunc) coated with a poly-L-Lysine solution (Sigma-Aldrich) diluted in ultra-pure water (Lonza Inc.) 0.02% (v/v) to enhance cellular adhesion. Cells were fixed using 2% paraformaldehyde in PBS, for 15min at RT. Cells were then stained with an anti-p62 (ab56416; abcam) and anti-langerin (929F3; Dendritics) overnight at 4°C. p62 was indirectly stained by a donkey anti-mouse secondary antibody coupled to an Alexa555 dye was used (A-31570, ThermoFisher). DAPI (see above) was incubated 15min at RT. Tissues were mounted and observed under a confocal microscope (Yokogawa Spinning Disk, Zeiss).

Statistical analysis

Statistical significance was calculated with a two-tailed Mann & Whitney test using Prism software (GraphPad). All data were presented as mean \pm standard Error of the Mean (SEM). P-values < 0.05 were considered statistically significant (*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$, ****, $p < 0.0001$).

FUNDING

This work was funded by the French Centre National de la Recherche Scientifique, the Laboratory of Excellence Medalis (ANR-10-LABX-0034) and the EquipEx program I2MC (ANR-11-EQPX-022), Initiative of Excellence (IdEx), Strasbourg University, and the Fondation Arthritis Courtin. Florent Arbogast and Delphine Bouis were recipients of pre-doctoral fellowships from the Ministère de la Recherche et de l'enseignement supérieur.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Pr. Noboru Mizushima and Pr. B.Clausen respectively for their gift of *Atg5^{fl/fl}* mice and mLangerinCre mice.

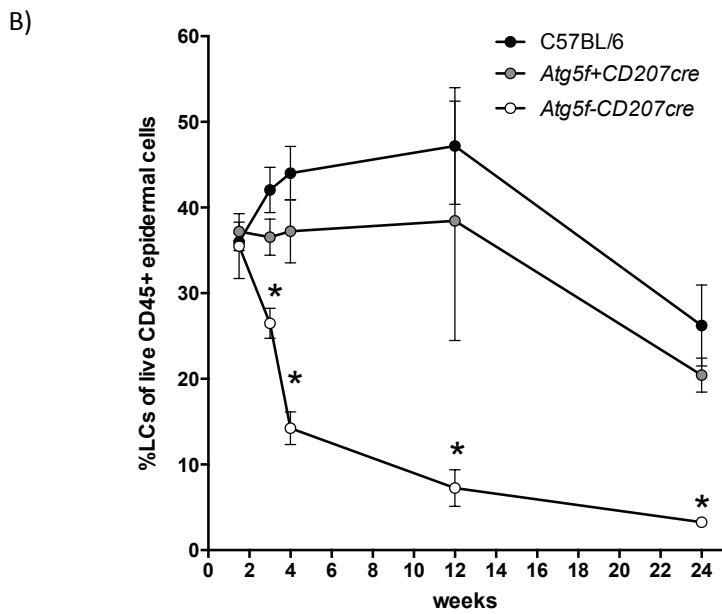
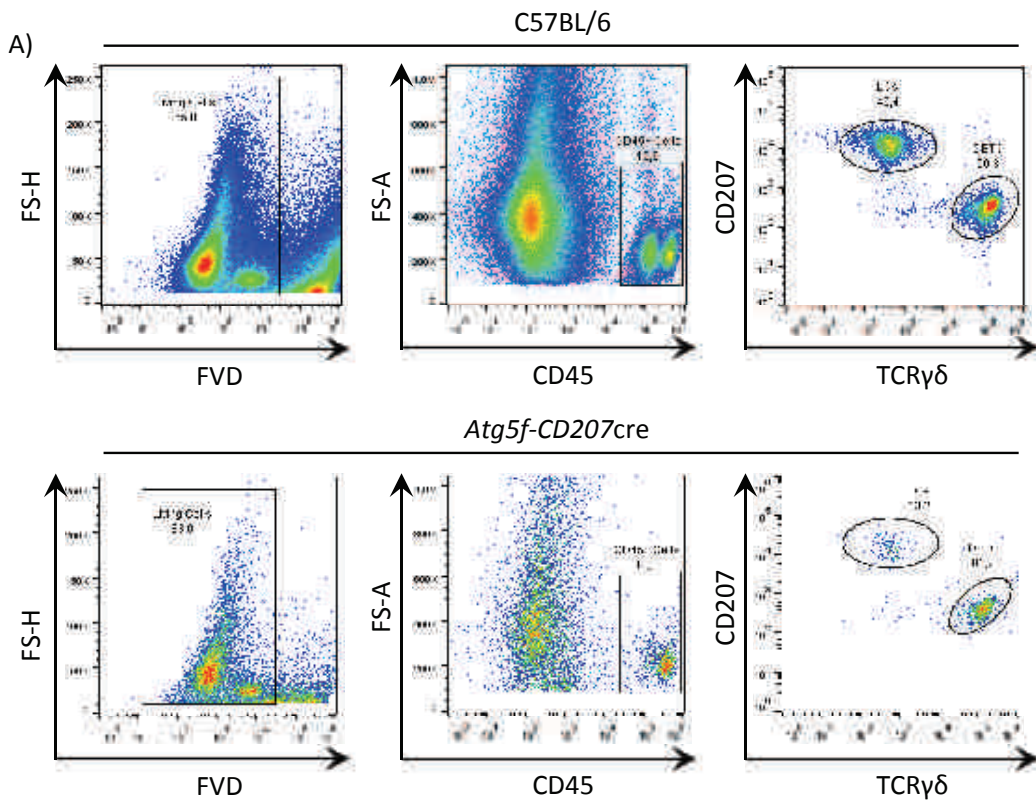
AUTHOR CONTRIBUTIONS

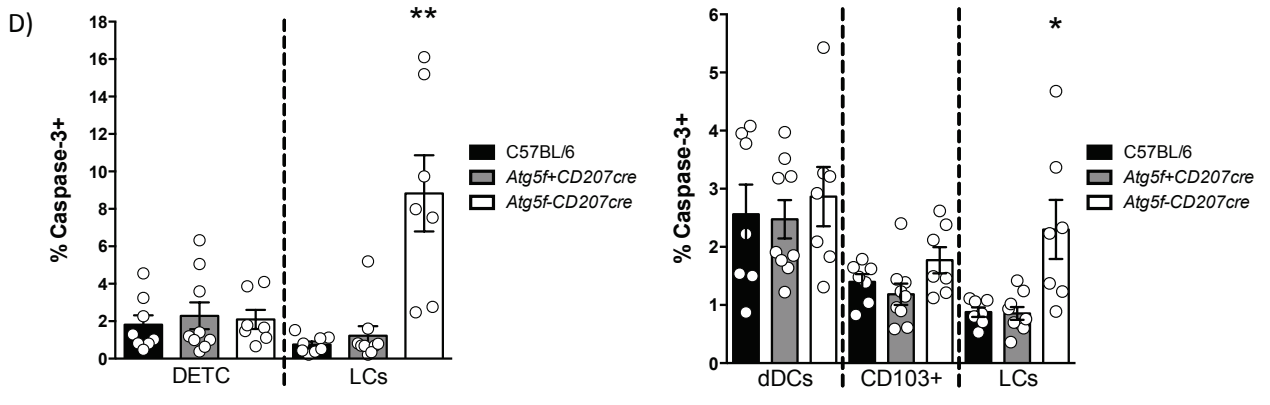
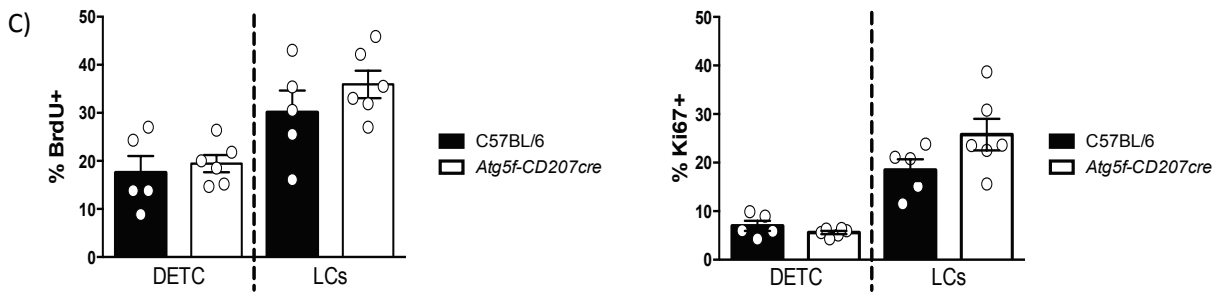
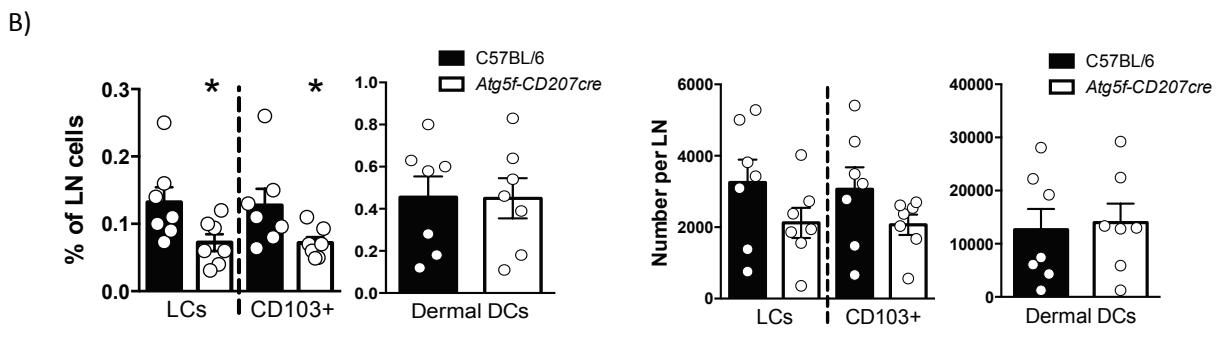
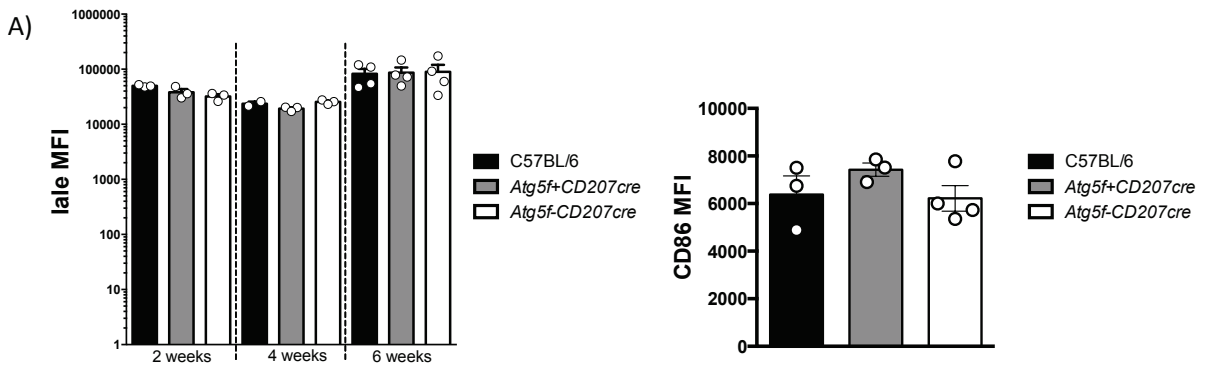
F.A, F.G. and V.F. designed the research.

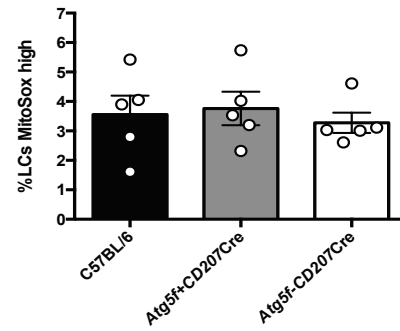
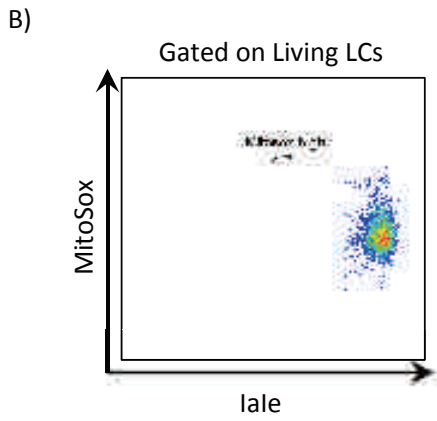
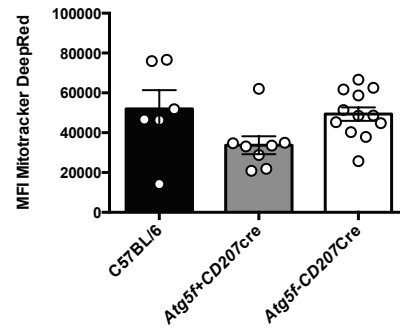
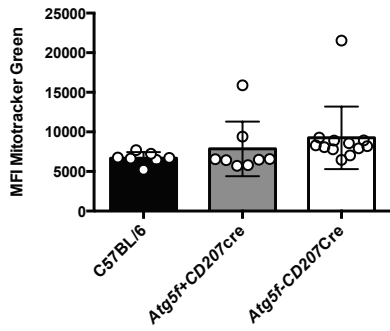
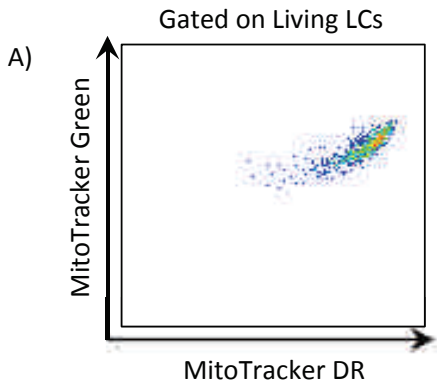
F.A, D.B. and V.F. performed the research.

F.A and V.F. analyzed the data.

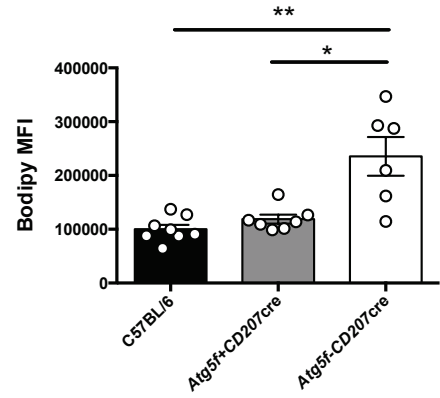
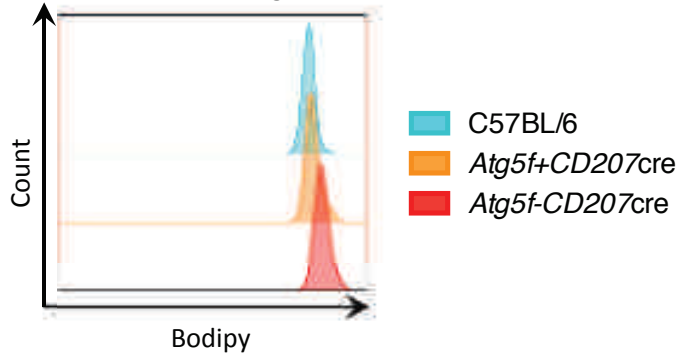
F.A, F.G. and V.F. wrote the paper.



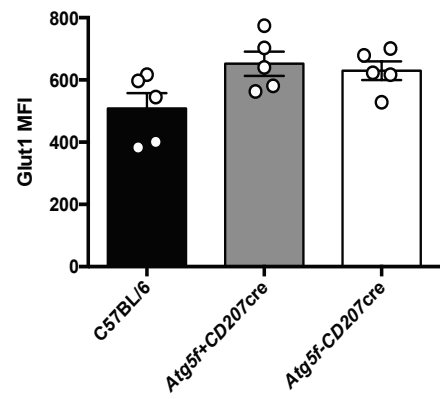
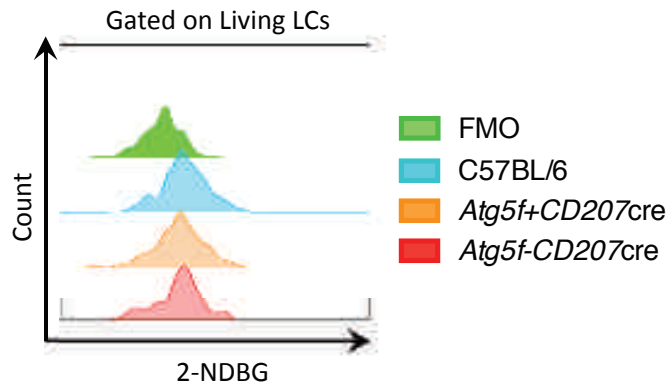




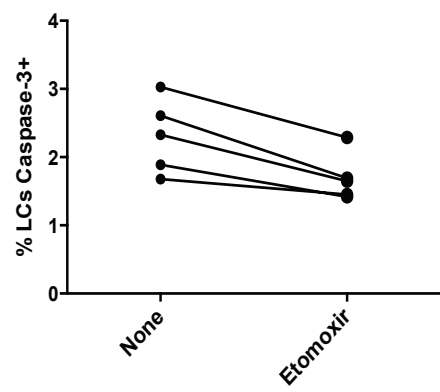
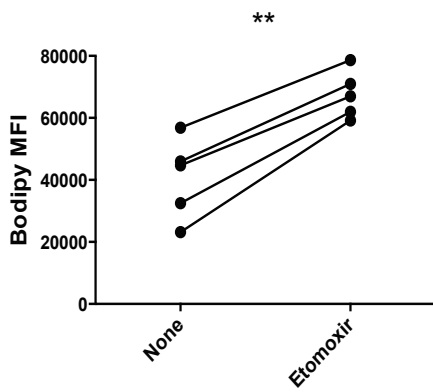
A) Gated on Living LCs

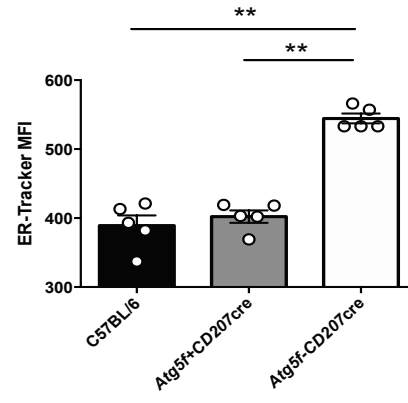
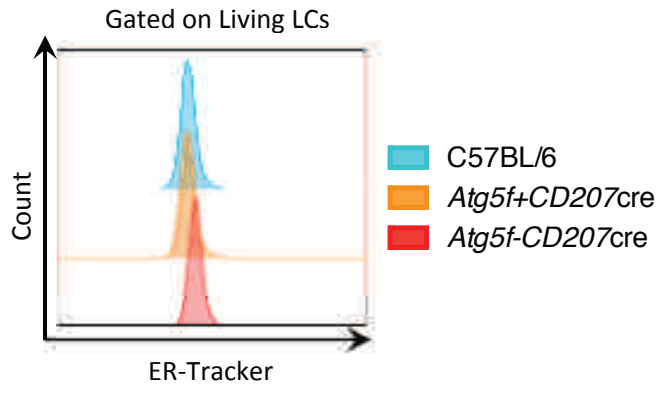


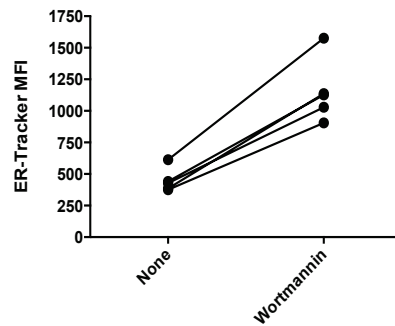
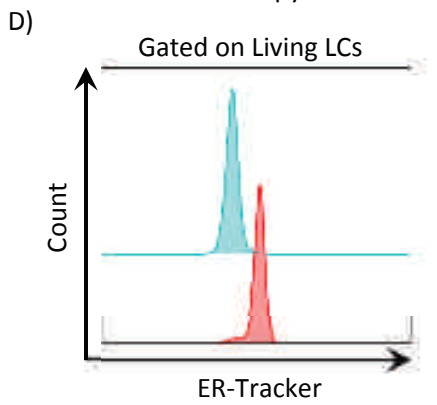
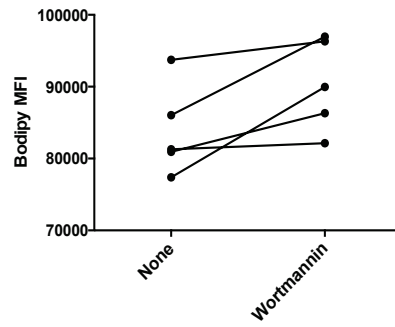
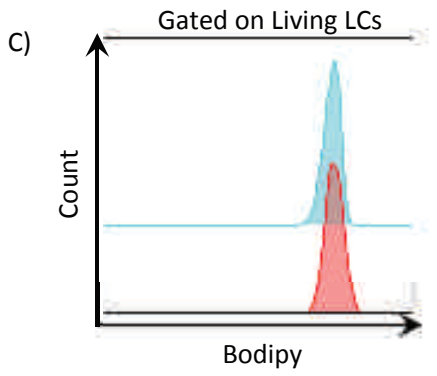
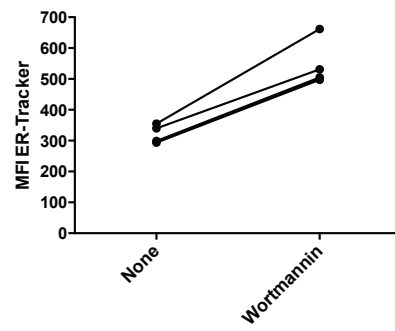
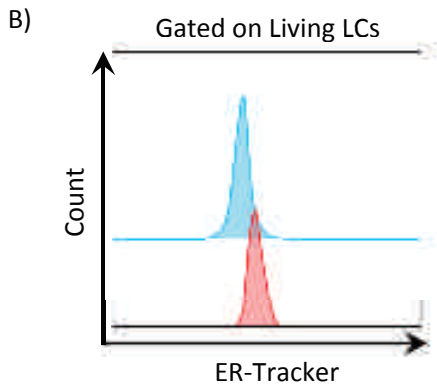
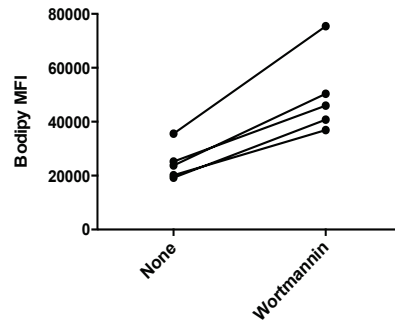
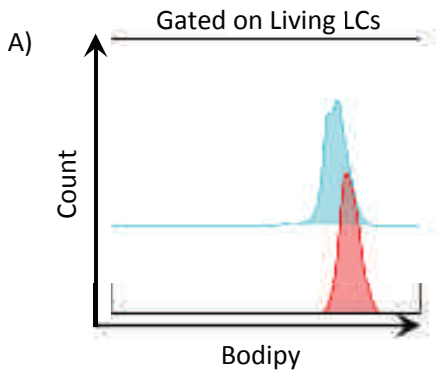
B)

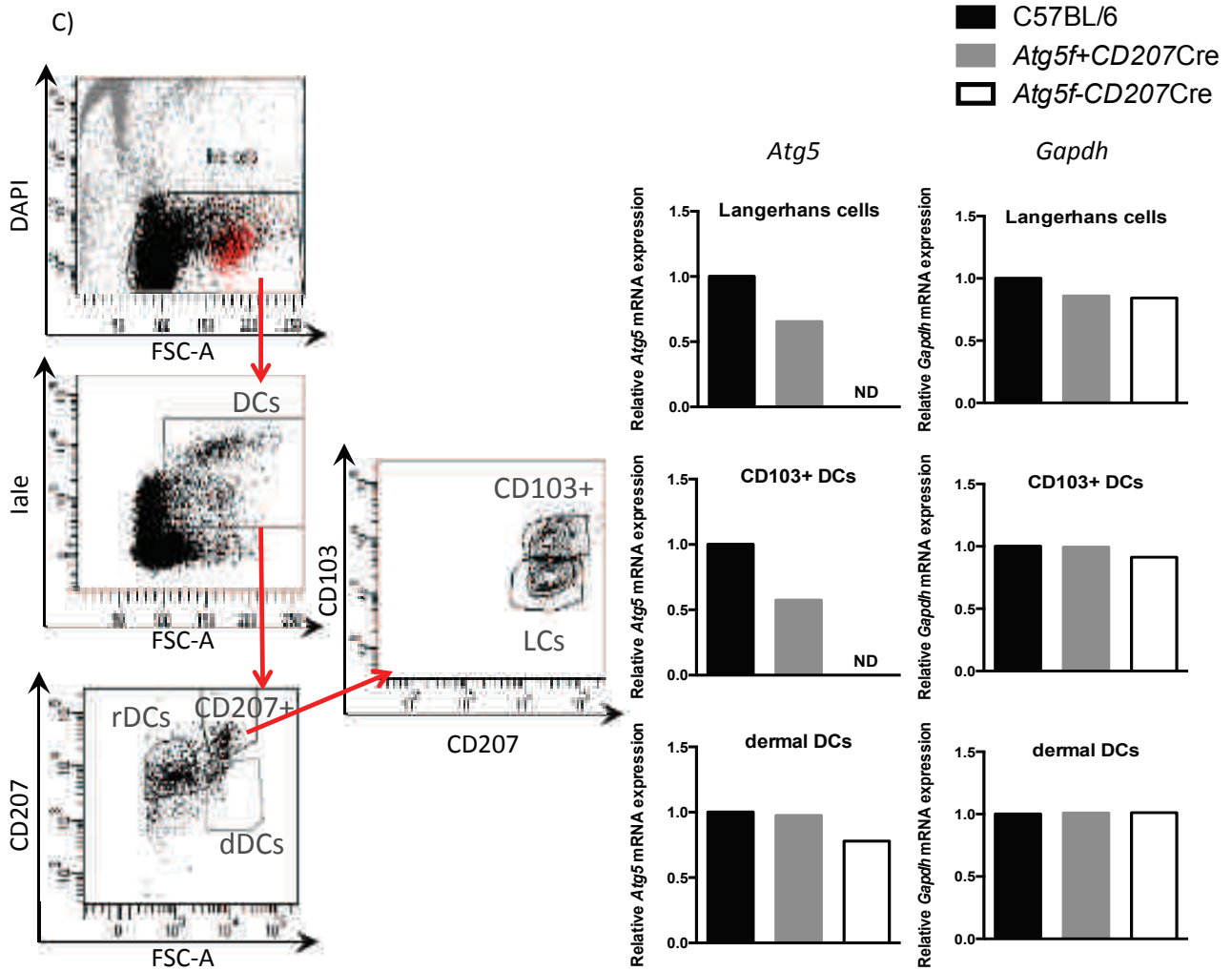
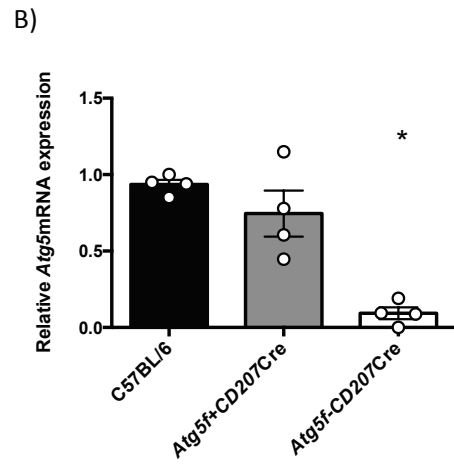
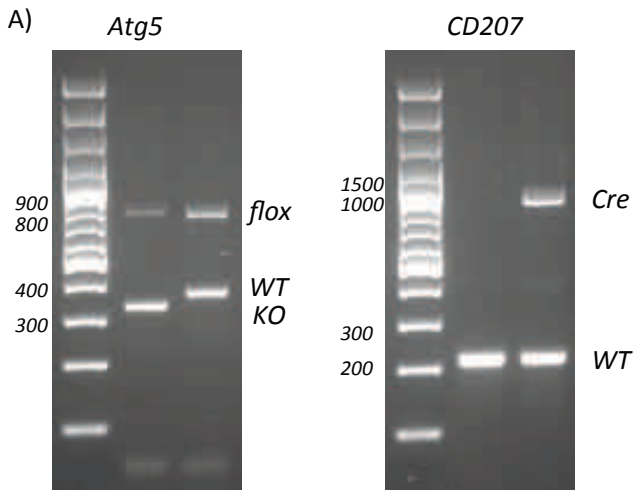


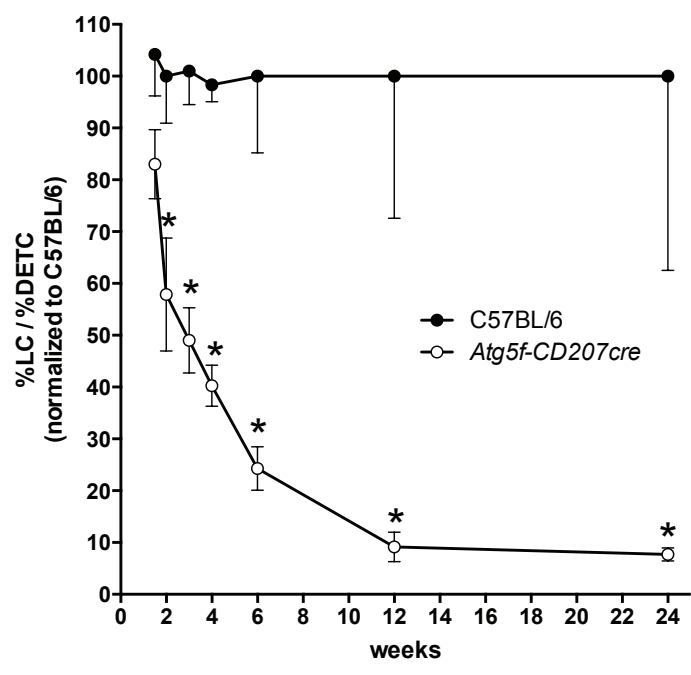
C)











SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Phenotyping of autoreactive B cells with labeled nucleosomes in 56R transgenic mice

Vincent Gies^{1,2}, Delphine Bouis¹, Mickaël Martin^{1,2,3}, Jean-L. Pasquali^{1,2,3}, Thierry Martin^{1,2,3}, Anne-S. Korganow^{1,2,3} & Pauline Soulas-Sprauel^{1,2,4} 

Received: 1 August 2017

Accepted: 21 September 2017

Published online: 16 October 2017

The phenotypic characterization of self-reactive B cells producing autoantibodies is one of the challenges to get further insight in the physiopathology of autoimmune diseases. We took advantage of our previously developed flow cytometry method, using labeled nucleosomes, prominent autoantigens in systemic lupus erythematosus, to analyze the phenotype of self-reactive B cells in the anti-DNA B6.56R mouse model. We showed that splenic anti-nucleosome B cells express mostly kappa light chains and harbor a marginal zone phenotype. Moreover, these autoreactive B cells fail to acquire a germinal center phenotype and are less abundant in the transitional T3 compartment. In conclusion, the direct detection of autoreactive B cells helped determine their phenotypic characteristics and provided a more direct insight into the B cell tolerance process in B6.56R mice. This method constitutes an interesting new tool to study the mechanisms of B cell tolerance breakdown in B6.56R mice crossed with autoimmune prone models.

B cells play an important role in the development and pathogenesis of autoantibody (autoAb) mediated autoimmune diseases. In healthy individuals, after a stochastic rearrangement of B cell receptors (BCR) during VDJ recombination, up to 75% of newly generated immature B cells of the bone marrow (BM) are autoreactive¹. But the relatively low occurrence of autoimmune diseases, i.e. 3–8%², implies that mechanisms exist to remove these autoreactive B cells or to render them unresponsive. Maintenance of B cell tolerance occurs at various checkpoints during B cell development. Central B cell tolerance mechanisms take place within the BM, and include clonal deletion, anergy, and receptor editing. B cells that leave the BM express a functional BCR and migrate to the peripheral lymphoid organs to mature^{3–7}. However, some autoreactive B cells still reach the periphery. Therefore, additional peripheral tolerance checkpoints exist to remove these pathogenic B cells and include notably clonal deletion, anergy, and inhibition by regulatory T or B cells^{3–9}.

Failure in one or more of these mechanisms may lead to tolerance breakdown and development of autoimmune diseases, such as systemic lupus erythematosus (SLE)¹⁰. This progressive and complex disease is notably characterized by a defect in apoptotic cell clearance, leading to autoAb production against various nuclear antigens, especially double-strand DNA (dsDNA) and nucleosomes. This results in immune complex deposits in blood vessels and different organs, responsible for both systemic and local chronic inflammation^{11–16}. Tolerance breakdown is an early event as anti-nucleosome autoAbs can be detected up to 10 years prior the first symptoms of the disease^{17,18}. One of the remaining open questions is the precise phenotype of the autoreactive B cells producing these pathogenic antinuclear autoAbs. Most of our knowledge comes from the analysis of B cell hybridomas generated with B cells from anti-DNA transgenic mice¹⁹. Although these studies provided primordial data regarding tolerance mechanisms, the technology used is not suitable for large scale analysis and does not allow a direct phenotypic approach^{20,21}. We previously developed a novel flow cytometry-based method to identify self-reactive B cells with fluorescent nucleosomes in B6.56R mice²². Nucleosomes constitute the main autoantigen in SLE. Indeed, although anti-dsDNA Abs are the most common autoAbs observed in SLE¹², free DNA is usually rare and rather exist in the form of circulating nucleosomes, suggesting that nucleosomes constitute

¹CNRS UPR 3572 “Immunopathology and Therapeutic Chemistry”/Laboratory of Excellence Médalis, Institute of Molecular and Cellular Biology (IBMC), Strasbourg, France. ²Department of Clinical Immunology and Internal Medicine, National Reference Center for Autoimmune Diseases, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France. ³UFR Médecine, Université de Strasbourg, Strasbourg, France. ⁴UFR Sciences pharmaceutiques, Université de Strasbourg, Illkirch-Graffenstaden, France. Delphine Bouis and Mickaël Martin contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to P.S.-S. (email: pauline.soulas@ibmc-cnrs.unistra.fr)

both the driving immunogens and the targets of anti-dsDNA antibodies^{18,23}. Moreover, nucleosomes have multiple autoepitopes^{24,25}, allowing the detection of a large spectrum of representative pathogenic B cells. The 56R anti-dsDNA heavy (H) chain knock-in mouse model is a useful tool to study B tolerance towards ubiquitous autoantigens, such as nucleosomes²⁶. The 56R transgene, a mutated form of the anti-3H9 DNA H chain, forms a BCR with an anti-DNA specificity when combined with almost all endogenous light chains. On a C57BL/6 (B6) background, the 56R mutation (B6.56R) leads to a partial loss of tolerance^{19,27}, allowing autoAb production with high affinity for dsDNA and nuclear components^{19,26,28}. The B6.56R mouse has an in-frame 56R H chain rearrangement (constant region of “a” haplotype) on one allele (i.e. the transgenic allele), and normal B6H chain genes (constant region of “b” haplotype) on the other. In this model, detection of autoreactive B cells is based on the identification of cells carrying the transgene by PCR, or by flow cytometry using anti-haplotype antibodies. Indeed, the two H chain alleles can be differentiated using anti-IgM^a antibodies that specifically bind to IgM with an heavy chain constant region of “a” haplotype (corresponding to the transgenic H chain), and anti-IgM^b antibodies that bind to BCR expressed by the endogenous allele (“b” haplotype)¹⁹. However, editing of variable regions or pairing with specific endogenous light chains (e.g. V κ 21) are known to abrogate DNA binding of the 56R H chain^{19,26} and only 36% of the spontaneous hybridomas produced from B6.56R B cells recognize DNA²⁶. Therefore, identification of the 56R H chain with only anti-IgM^a labeling is not ideal to analyze autoreactive B cells in this model. For these reasons, we used labeled nucleosomes to characterize B cells based on their genuine autoreactivity²². In addition, B6.56R mice do not develop illness despite production of anti-dsDNA autoAbs²⁶, unless they are crossed with autoimmune prone mice^{29,30}. Thus, our method could help decipher how autoreactive B cells are tolerized in this model.

In this report, we directly phenotyped splenic anti-nucleosome B cells in B6.56R mice and showed that most of them are kappa (κ) positive, harbor a marginal zone (MZ) phenotype with only few with follicular (FO) B cells characteristics. In addition, they failed to acquire a germinal center (GC) phenotype. These results reflect a means to avoid any pathogenic activation of these anti-nucleosome B cells. Indeed autoreactive B cells are likely promoted into locations where their chances of inappropriate activation decrease.

Results

Splenic B cell subsets modifications in B6.56R mice. Based on the gating strategy defined in Fig. 1a, the different splenic B cell subsets were evaluated by flow cytometry. B220⁺ B cells were decreased both in absolute number and frequency in B6.56R mice compared to C57BL/6 control mice ($12.4 \times 10^6 \pm 2.1$ vs. $34.4 \times 10^6 \pm 5.3$ and $27.9\% \pm 1.2$ vs. $47.5\% \pm 1.7$ respectively) (Fig. 1b and Supplementary Table 1). MZ B cells were increased in transgenic mice ($4.8 \times 10^6 \pm 0.6$ in B6.56R vs. $2.9 \times 10^6 \pm 0.4$ in C57BL/6 and $36.2\% \pm 2.0$ vs. $10.6\% \pm 0.7\%$) while FO B cells were decreased both in absolute and relative numbers ($8.1 \times 10^6 \pm 2.4$ vs. $23.8 \times 10^6 \pm 3.2$ and $48.2\% \pm 1.6$ vs. $76.8\% \pm 1.3$). Among the more immature B cell subsets, transitional B cells were decreased in B6.56R compared to C57BL/6 mice ($0.5 \times 10^6 \pm 0.1$ vs. $2.1 \times 10^6 \pm 0.2$ and $2.1\% \pm 0.3$ vs. $7.6\% \pm 0.5$ respectively) (Fig. 1c and Supplementary Table 1). Further analysis showed a majority of T2 B cells in controls ($3.7\% \pm 0.5$ of B220⁺ cells) while the T3 compartment was the main transitional subset in transgenic mice ($1.2\% \pm 0.2$ of B220⁺ cells) (Fig. 1d). These data are in accordance with the literature²⁶. In addition, no significant difference was found in the GC subset, neither in relative nor in absolute numbers (Fig. 1c and Supplementary Table 1).

We analyzed the heavy chain usage in B6.56R mice, in order to determine if the increase of MZ B cells is related to a potential sequestration of B cells with the 56R transgenic heavy chain (stained with anti-IgM^a antibody). The majority of splenic B220⁺ B cells were IgM^{a+} ($74.3\% \pm 1.2$) (Fig. 1e). These cells preferentially harbor a MZ phenotype compared to IgM^{b+} ($38.6\% \pm 1.1$ vs. $28.1\% \pm 2.4$), whereas there was a higher frequency of IgM^{b+} in the FO B cell compartment ($62\% \pm 2.7$ vs. $49.6\% \pm 1.8$) (Fig. 1f). These data are consistent with a preferential migration of potential autoreactive B cells into the MZ. However, only a fraction of IgM^{a+} B cells have a self-reactive BCR, due to receptor editing of variable regions or pairing of transgenic heavy chain with specific endogenous light chains^{19,26}. Thus, we decided to further analyse the phenotype of autoreactive B cells using a flow cytometry based-assay using labeled nucleosomes²².

Phenotype of anti-nucleosome B cells. In accordance with our previous results²², a significant fraction of B cells from B6.56R mice were labeled with nucleosomes. This staining was almost specific to B cells expressing the 56R heavy chain, and only few B cells from C57BL/6 were labeled (Supplementary Fig. 1). First, we assessed the light chain usage in B6.56R mice (Fig. 2). Considering all B220⁺ B cells, $77.8\% \pm 1.4$ expressed κ chains, $2.6\% \pm 0.2$ lambda (λ) chains and $5.2\% \pm 0.8$ co-expressed both chains. In a fraction of B cells ($14.4\% \pm 1.0$), no light chain expression could be detected using commercially antibodies against κ or λ (Fig. 2 and Supplementary Table 2). This latter population could be putative V λ x expressing B cells, a light chain that abrogates DNA-binding^{31,32}. Further analysis showed a higher frequency of κ expressing B cells in nucleosome⁺ compared to nucleosome⁻ B cells compartment ($92.6\% \pm 0.8$ vs. $73.9\% \pm 1.3$ respectively), with a low frequency of both λ ⁺ B cells ($2.1\% \pm 0.2$ vs. $2.8\% \pm 0.2$) and B cells expressing dual receptors ($3.5\% \pm 0.5$ vs. $6.2\% \pm 1.0$). Finally, the proportion of cells without any κ or λ detection was almost negligible among the nucleosome⁺ B cells (Fig. 2b and Supplementary Table 2).

Compared to nucleosome⁻ B cells, those that bound nucleosomes were chiefly associated with a MZ phenotype ($56.7\% \pm 2.7$ nucleosome⁺ vs. $27.2\% \pm 1.7$ nucleosome⁻) and a low representation of FO B cells ($35.0\% \pm 1.9$ nucleosome⁺ vs. $54.1\% \pm 1.5$ nucleosome⁻). These data argue for FO exclusion and MZ sequestration of nucleosome⁺ B cells (Fig. 3a,b and Supplementary Table 2). Interestingly, although there were very few nucleosome⁺ B cells in C57BL/6 mice, these cells harbor a similar phenotype compared to B6.56R mice, with an increased frequency in the MZ compartment at the expense of the FO compartment compared to nucleosome⁻ B cells ($17.2\% \pm 1.6$ nucleosome⁺ vs. $10.3\% \pm 0.7$ nucleosome⁻ MZ B cells and $65.8\% \pm 1.9$ nucleosome⁺ vs. $77.3\% \pm 1.3$ nucleosome⁻ FO B cells respectively) (Fig. 3c). These results suggest the existence of a potential similar MZ

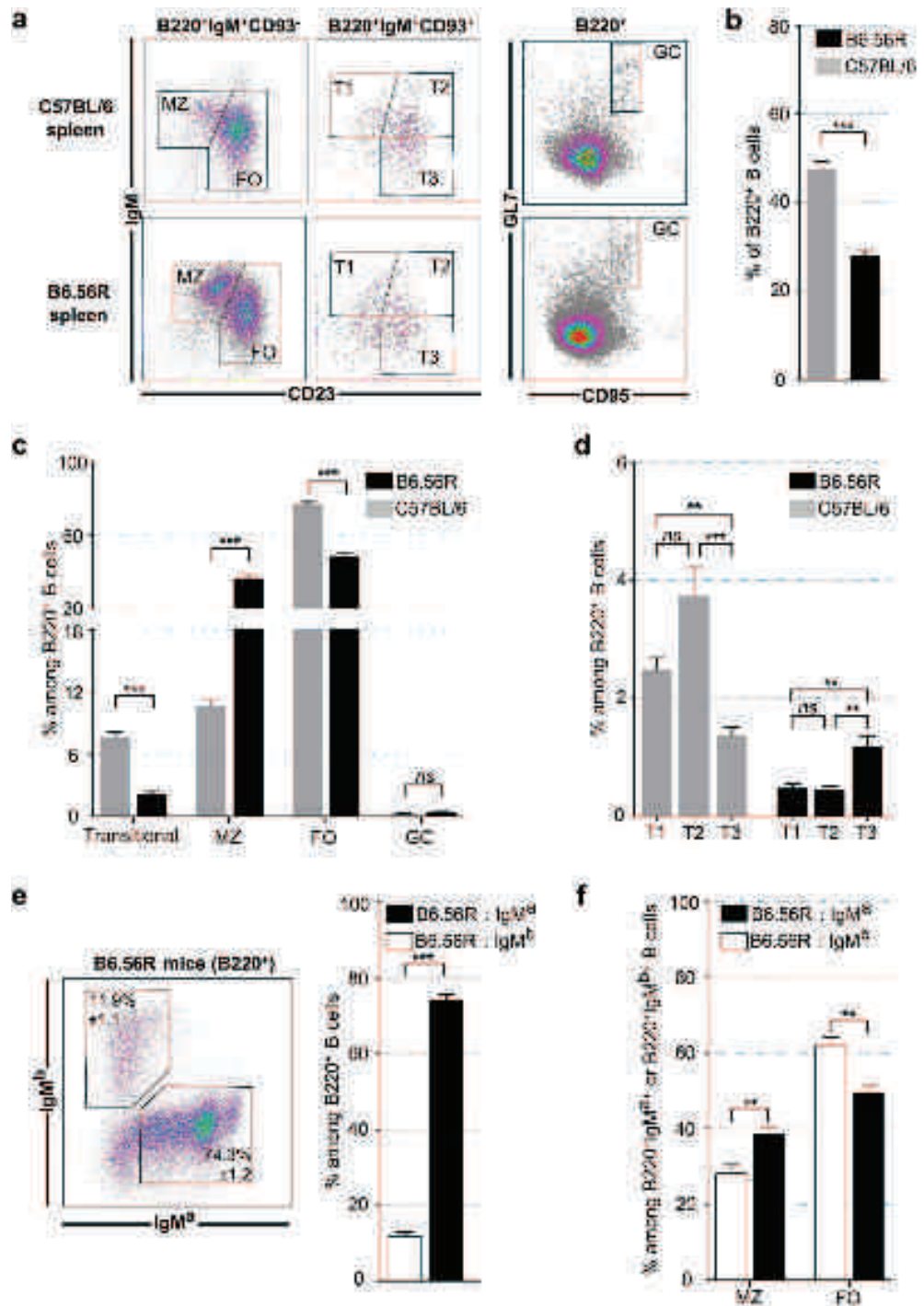


Figure 1. B6.56R mice display lower proportion of total B cells, transitional B cells and FO B cells but a higher MZ B cell frequency, compared to C57BL/6 mice. **(a)** Gating strategy of the different splenic B cell subsets. **(b)** B220⁺ B cells frequency in B6.56R mice (black) compared to C57BL/6 control mice (grey). **(c)** Frequency of the different splenic B cell subsets (percentage among B220⁺ cells) in B6.56R mice (black) compared to C57BL/6 mice (grey). **(d)** Transitional B cell frequency (percentage of B220⁺ cells) in B6.56R mice (black) and C57BL/6 mice (grey). **(e)** IgM⁺ and IgM⁺ B cell frequency (percentage of B220⁺ cells) in B6.56R mice. **(f)** Frequency of MZ or FO B cells, among IgM⁺ (black) or IgM⁺ (white) B cell populations in B6.56R (indicated as the percentage of cells among IgM⁺B220⁺ or IgM⁺B220⁺ cells). n ≥ 7 in each group; mean ± SEM; spleen; mice aged from 2 to 8 months old. Two-tailed Mann-Whitney U-test. *P < 0.05, **P < 0.005, ***P < 0.001.

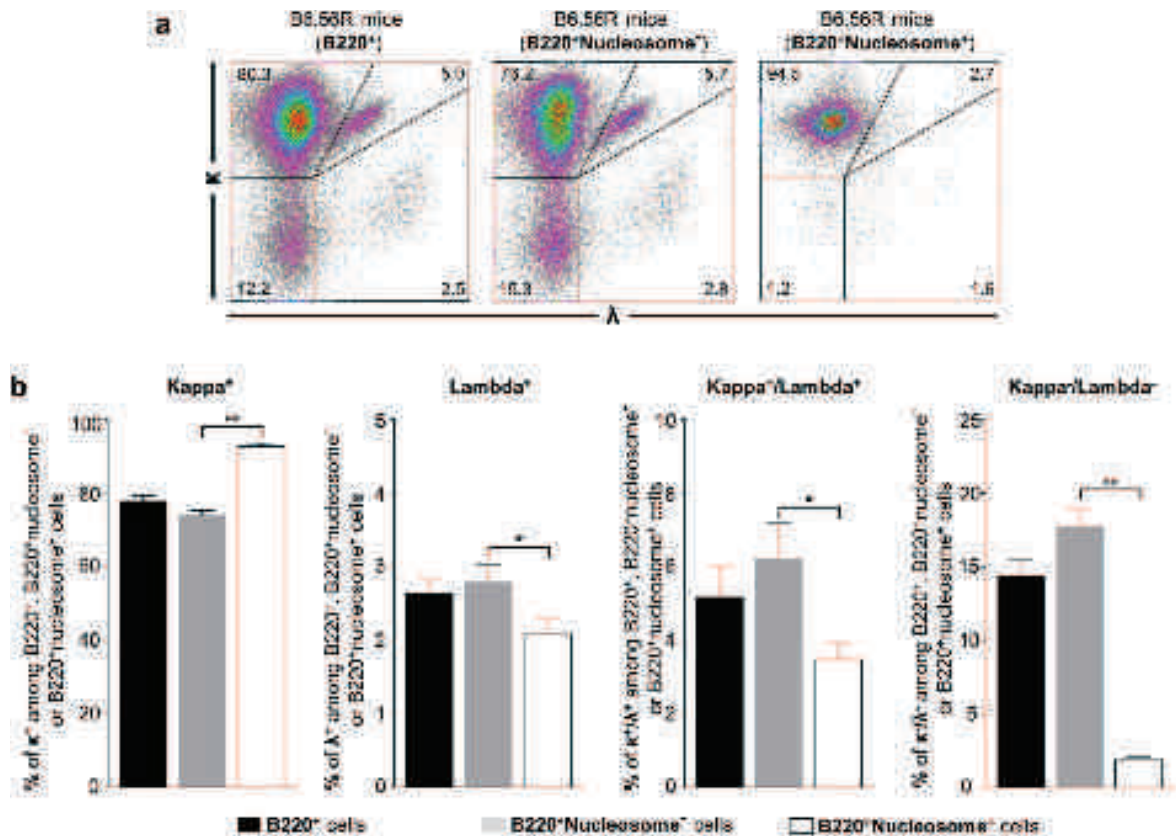


Figure 2. In B6.56R mice, nucleosome⁺ B cells mainly express the κ light chain. (a) Representative plots of κ and λ staining among B220⁺, B220⁺ nucleosome⁻ or B220⁺ nucleosome⁺ cells from B6.56R mice. (b) Frequency of κ^+ , λ^+ , κ^+/λ^+ or κ^-/λ^- B cells (indicated as percentage among B220⁺, B220⁺ nucleosome⁻ or B220⁺ nucleosome⁺ cells) in B6.56R mice. n = 5; spleen; mean \pm SEM; 4 months old mice. Two-tailed Mann-Whitney U-test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$.

sequestration mechanism in wild-type mice. With regard to the more immature B cells in B6.56R mice, a lower frequency of total transitional B cells was found in the nucleosome⁺ compared to the nucleosome⁻ B cells ($1.8\% \pm 0.2$ vs. $2.3\% \pm 0.3$ respectively), with a lower proportion of T3 subset (Fig. 4 and Supplementary Table 2). Finally, few GC B cells were found among nucleosome⁺ B cells ($0.14\% \pm 0.02$ vs. $0.58\% \pm 0.09$), indicative of a potential GC exclusion of autoreactive B cells (Fig. 5 and Supplementary Table 2). Similar results were obtained when only the IgM⁺ B cell population was analyzed (Supplementary Fig. 2), supporting the conclusion that these changes are directly related to self-reactivity and are not solely the consequence of 56R transgene expression.

Based on these results, we represented the cellular composition of each B cell subset. With respect to the transitional population in B6.56R mice, the proportion of nucleosome⁺ B cells was relatively high (26.4%) and the lowest representation of nucleosome⁺ B cells was in the T3 subset. MZ B cells had the highest cellular proportion of nucleosome⁺ B cells, as they represented almost half (47.7%) of the cellular content, whereas anti-nucleosome B cells represented 22.3% of FO B cells (Fig. 6). In the same manner, in C57BL/6 mice, MZ B cell population displayed a higher proportion of nucleosome⁺ cells compared to FO B cell compartment (Fig. 6). Finally, in B6.56R mice, GC B cells constituted the compartment with the lowest proportion of autoreactive B cells (10.3%) (Fig. 6). Altogether, these results are likely the consequence of tolerance mechanisms leading to sequestration of self-reactive B cells into the MZ, at the expense of FO and GC compartments.

Discussion

The development of autoreactive B cells is tightly regulated, and failure in one or more of the tolerance mechanisms underlying elimination of autoreactive B cells may lead to autoantibody-mediated diseases. Anti-dsDNA is one of the most common autoantibodies in SLE³³, and B6.56R mice possess self-reactive B cells producing such autoantibodies²⁶.

Herein we show that B6.56R mice display an increased MZ proportion. This expansion has been directly implicated in SLE pathogenesis in some murine models^{34,35}, as the MZ is a major source of autoreactive B cells³⁶. It has been suggested that a chronic BCR stimulation could promote homing of B cells into the MZ³⁷. In agreement with this point, we show that nucleosome⁺ B cells, recognizing an ubiquitous autoantigen, adopt a MZ phenotype. Because MZ B cells are not favored for affinity maturation or class switching³⁷, nucleosome⁺ B cells in the B6.56R model could be preferentially localized in MZ to reduce the propensity of inappropriate activation. The

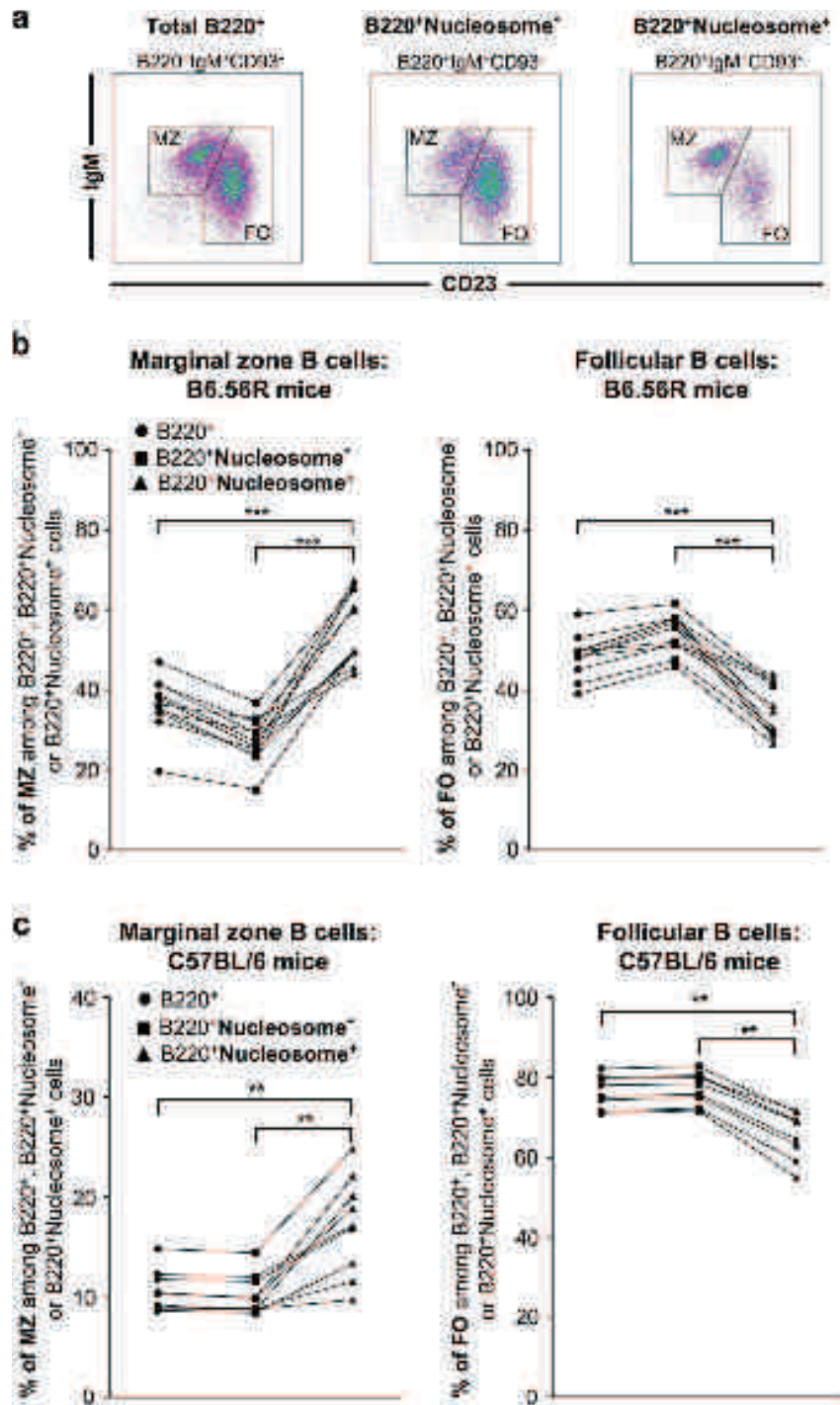


Figure 3. In B6.56R mice, nucleosome⁺ B cells harbor a MZ phenotype. (a) Gating strategy for flow cytometry analysis of total B220⁺ cells (left), nucleosome⁻ B cells (middle) and nucleosome⁺ B cells (right) in B6.56R mice. (b,c) Frequency of total B cells (●), nucleosome⁻ (■) and nucleosome⁺ B cells (▲) in MZ and FO B cell compartments in B6.56R (b) and C57BL/6 (c) mice (indicated as percentages among B220⁺, B220⁺nucleosome⁻ or B220⁺ nucleosome⁺ cells). n ≥ 9 in each group; spleen; mice aged from 2 to 8 months old. Two-tailed Wilcoxon matched paired signed-rank test. *P < 0.05, **P < 0.005, ***P < 0.001.

presence of DNA reactive BCRs is likely to promote autoreactive B cells into microenvironment where the risk of any autoimmune response is decreased. However paradoxically, in the MZ B cells are more exposed to polyclonal B cell stimuli, such as lipopolysaccharides (LPS)^{38,39}, suggesting additional mechanisms to prevent activation

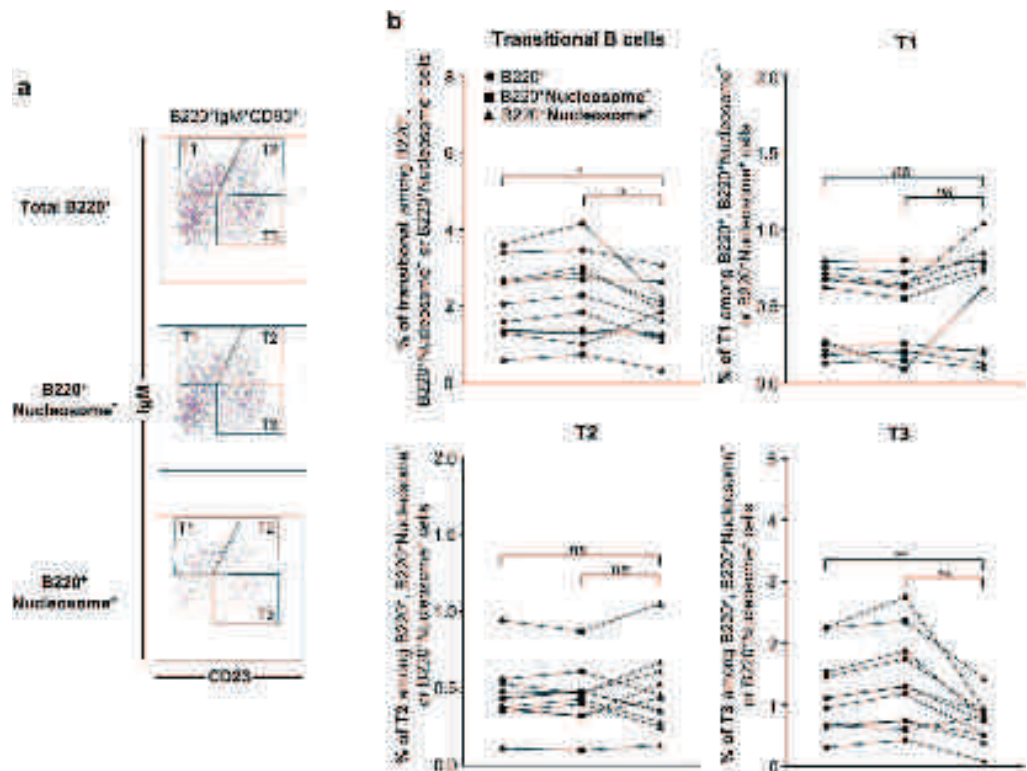


Figure 4. B6.56R mice show decreased frequency of nucleosome⁺ B cells in the transitional B cell compartment, with a specific lower representation of T3 B cells. (a) Gating strategy for flow cytometry analysis of total B220⁺ cells (left), nucleosome⁻ B cells (middle) and nucleosome⁺ B cells (right) in B6.56R mice. (b) Frequency of total B cells (●), nucleosome⁻ (■) and nucleosome⁺ B cells (▲) in total, T1, T2 and T3 transitional B cell compartments in B6.56R mice (indicated as percentages among B220⁺, B220⁺ nucleosome⁻ or B220⁺ nucleosome⁺ cells). n = 11; spleen; mice aged from 2 to 8 months old. Two-tailed Wilcoxon matched paired signed-rank test. *P < 0.05, **P < 0.005, ***P < 0.001.

of autoreactive B cells in this location. Similarly to what was described in 56R mice on a BALB/c background, these B cells could undergo apoptosis followed by a rapid clearance by phagocytes⁴⁰. The lower representation of self-reactive B cells within the FO B cell compartment reduces the risk of inappropriate activation, since B cells excluded from this compartment cannot recirculate through the body and have a short half-life^{41–43}.

In addition, we demonstrate that nucleosome⁺ B cells fail to acquire a GC phenotype, a tolerance mechanism that has been shown to be defective in SLE patients⁴⁴. However, B6.56R mice spontaneously produce anti-dsDNA autoAbs of both IgM and IgG isotypes²⁶, suggesting that nucleosome⁺ B cells could differentiate and undergo class-switching via an extrafollicular pathway⁴⁵.

Emigrant B cells that have passed the BM tolerance checkpoints migrate into the spleen to complete their maturation. These cells are known as transitional B cells, and can be further divided into three subsets – T1 (CD93⁺IgM^{high}CD23⁻), T2 (CD93⁺IgM^{high}CD23^{low}) and T3 (CD93⁺IgM^{low}CD23^{high})^{46,47}. T1 B cells give rise to T2 B cells, that become FO precursors or can differentiate into T3 B cells^{46–49}. The T1 stage appears to be an important tolerance checkpoint, as suggested by studies showing that BCR crosslinking induces excessive T1 B-cell apoptosis^{50–52}. Further maturation of T1 B cells is marked by a BAFF-mediated survival, with an upregulation of BAFF-R⁵³, and by enhancement of deletional tolerance, with an increased sensitivity to anti-IgM-mediated apoptosis⁵⁴. Thus, self-reactive T2 B cells are usually deleted, or may be oriented towards the T3 population that remains anergic in response to BCR cross-linking^{55,56}. Lupus-prone mice are characterized by a decrease in T3 B cells⁴⁷, suggesting that this subset has an important role in autoimmunity development. Consistent with this hypothesis, we observed that this subset is more enriched in nucleosome⁻ rather than in nucleosome⁺ B cells. Thus, it seems that the T3 compartment is not a reservoir for functional autoreactive B cells but rather consists of inactive B cells that have successfully undergone tolerance. It is tempting to speculate that the T3 compartment is reduced in lupus-prone mice due to a defective tolerance process. On the contrary, the higher frequency of total T3 B cells representation in B6.56R mice could be the consequence of effective tolerance mechanisms leading to anergic autoreactive B cells unable to bind the nucleosome, explaining the lower proportion of T3 nucleosome⁺ B cells in B6.56R mice.

The suppression of autoreactivity is completed in part by receptor editing, allowing for the replacement of variable segments expressed by B cells^{19,57–60}. This mechanism notably involves rearrangements of κ and eventually λ chains^{61–63}. In B6.56R mice, the majority of anti-nucleosome B cells express a κ light chain, and only few express λ

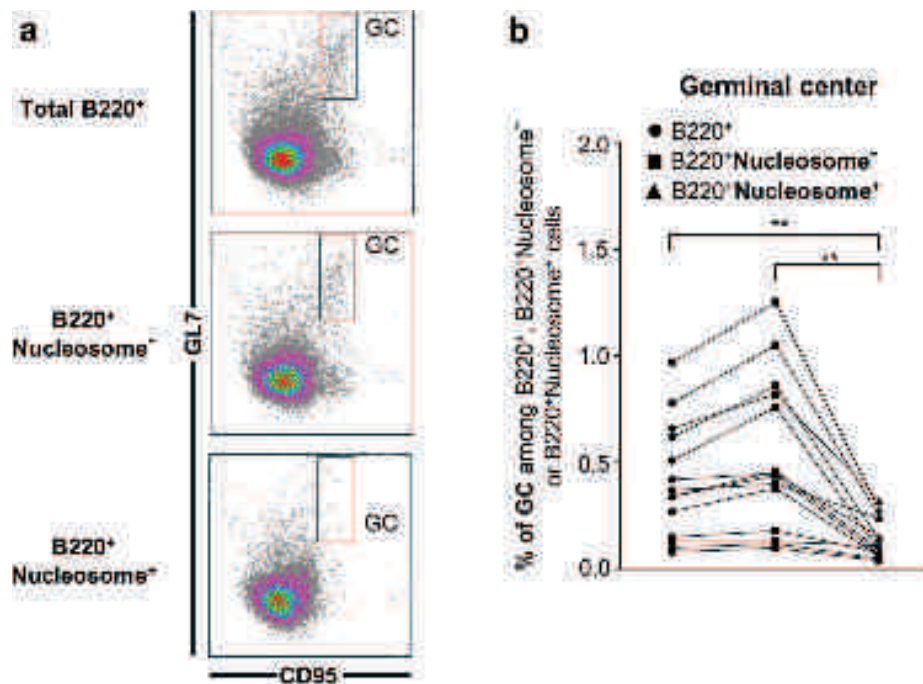


Figure 5. In B6.56R mice, nucleosome⁺ B cells fail to acquire a germinal center phenotype. (a) Gating strategy for GC B220⁺ cell, nucleosome⁻ and nucleosome⁺ B cell analysis (left). (b) Frequency of total B cells (●), nucleosome⁻ (■) and nucleosome⁺ B cells (▲) in GC in B6.56R mice (indicated as percentage among B220⁺, B220⁺nucleosome⁻ or B220⁺nucleosome⁺ cells (right)). n = 14; spleen; mice aged from 2 to 8 months old. Two-tailed Wilcoxon matched paired signed-rank test. **P* < 0.05, ***P* < 0.005.

chains. The absence of nucleosome⁺ B cells in the putative V λ x⁺ B-cell population – i.e. κ/λ double negative cells after staining with commercially available antibodies – supports the fact that the V λ x editor is present and able to eliminate DNA binding capacity of the 56R transgene^{31,32}. In addition, some κ^+/λ^+ B cells, that are known to be located in the MZ⁶⁴, are present. These cells have undergone several rounds of receptor editing in a timeframe that is long enough to allow for the co-rearrangement of a λ and new κ chain. This isotopic inclusion leads to the expression of a λ chain that allows DNA binding by the 56R transgene and one κ that abrogates this interaction⁶⁴. It was suggested that this dual expression leads to a strong decrease of autoreactive BCR density, and such partial autoreactive B cells only display a low affinity towards the autoantigen⁶⁴. Our results confirm this hypothesis with an absence of nucleosome binding among dual receptor expressing B cells, showing that this population is unable to interact with labeled nucleosomes because of diluted autoreactive BCR reactivity. However, as proposed by Li *et al.*, the low residual autoreactivity could be sufficient to explain the homing of these B cells into the MZ^{31,64}, where their sequestration may prevent their GC entry to control their pathogenic properties.

Taken together, these data directly highlight the existence of peripheral tolerance mechanisms that limit the development of autoreactive FO B cells and that render them unable to acquire a GC phenotype. This process results in an accumulation of self-reactive MZ B cells. Our flow cytometry assay, using labeled nucleosomes, can directly and quickly elicit the phenotype of these autoreactive B cells and give information about their preferential location. It is a useful tool for the study of B cell tolerance breakdown mechanisms, for example in B6.56R crossed with autoimmune prone models. This could provide new clues to elucidate the pathogenesis of autoimmune diseases, such as SLE.

Materials and Methods

Mice. All experiments were carried out in accordance with the European Community guidelines on the protection of animals used for scientific purposes (Directive 2010/63/UE) and approved by the Regional Ethics Committee of Strasbourg (CREMEAS). 2 to 8 months-old C57BL/6 or B6.56R mice were bred in our animal facility (approved by French Veterinary Services, #F67–482–2). B6.56R transgenic mice were genotyped by PCR amplification of tail DNA⁶⁵. 56R mice on C57BL/6 background were kindly provided by M. Weigert (Department of Pathology, University of Chicago, Chicago, IL, USA).

Nucleosome isolation, labeling and characterization. Labeled nucleosome were produced as previously described²². Briefly, nucleosomes were isolated from L1210 cells and DNA concentration was measured (dilution 1:100 in 0.1% (v/v) SDS solution). 200 μ L of unlabeled nucleosome solution was mixed with 250 μ L of buffer (10 mM Tris-HCl, 0.7 mM EDTA, 3.6 M NaCl). 5-fold molar excess of AlexaFluor488 C₅-maleimide (Molecular Probes) was added and incubated 3 hours at room temperature. Successive dialyses against solutions

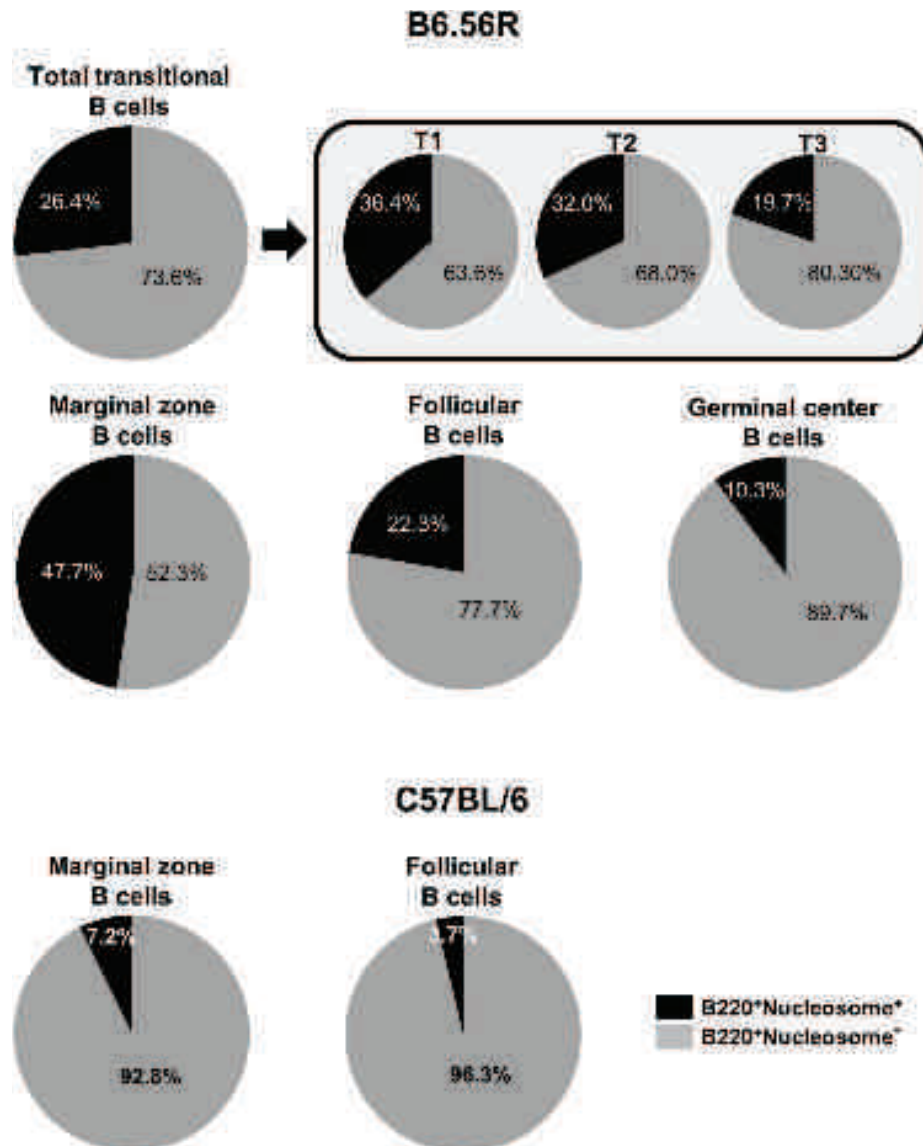


Figure 6. Composition of splenic B cell compartments. Repartition of nucleosome⁺ (black) and nucleosome⁻ (grey) B cell splenic subsets in B6.56R and C57BL/6 mice. $n \geq 9$; spleen; mice aged from 2 to 8 months old.

of decreasing ionic force were performed. DNA concentration was measured (dilution 1:100 in 0.1% (v/v) SDS solution) and the samples were stored at -20°C .

Flow Cytometry. Flow cytometry was performed as previously described²². All steps are done in PBE (PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4), 0.5% (w/v) BSA, 2 mM EDTA) buffer on ice, unless otherwise specified. Briefly, 1×10^6 splenocytes were incubated with 100 μL of nucleosome solution (2 μg of DNA/mL) and incubated 20 min at 4°C . The cells were washed twice in PBE/0.1% (v/v) Tween 20 and classical surface staining was performed for 15 min at 4°C . Cell viability was assessed by incubation with Fixable Viability Dye eFluor 780 (eBioscience) following the manufacturer's protocol. Acquisition was performed on a Gallios flow cytometer (Beckman Coulter). Data analysis was performed using Kaluza software (Beckman Coulter) with "logicle" compensation⁶⁶. A comprehensive list of anti-mouse antibodies used for this experiment includes: IgM^a (clone DS-1), IgM^b (clone AF6-78), B220 (clone RA3-6B2), CD95 (clone Jo2), kappa (187.1) and lambda 1, 2 and 3 (R26-46) from BD Biosciences; CD23 (clone B3B4) and CD93 (clone AA4.1) from eBioscience; CD138 (clone 281-2) and GL7 (clone GL7) from BioLegend; streptavidin-AlexaFluor700 from Molecular Probes.

Statistics. Statistical comparison between groups was carried out using nonparametric two-tailed Wilcoxon matched paired signed-rank test or nonparametric two-tailed Mann-Whitney U-test using Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.). All data were presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). A p-value less than 0.05 was considered as significant.

References

1. Wardemann, H. *et al.* Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science* **301**, 1374–1377 (2003).
2. Jacobson, D. L., Gange, S. J., Rose, N. R. & Graham, N. M. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **84**, 223–243 (1997).
3. Halverson, R., Torres, R. M. & Pelanda, R. Receptor editing is the main mechanism of B cell tolerance toward membrane antigens. *Nat. Immunol.* **5**, 645–650 (2004).
4. Goodnow, C. C., Sprent, J., Fazekas de St Groth, B. & Vinuesa, C. G. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* **435**, 590–597 (2005).
5. Shlomchik, M. J. Sites and stages of autoreactive B cell activation and regulation. *Immunity* **28**, 18–28 (2008).
6. Nemazee, D. Mechanisms of central tolerance for B cells. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 281–294 (2017).
7. Pelanda, R. & Torres, R. M. Receptor editing for better or for worse. *Curr. Opin. Immunol.* **18**, 184–190 (2006).
8. Wang, P. & Zheng, S. G. Regulatory T cells and B cells: implication on autoimmune diseases. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **6**, 2668–2674 (2013).
9. Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T. & Ono, M. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell* **133**, 775–787 (2008).
10. Tsokos, G. C. Systemic lupus erythematosus. *N. Engl. J. Med.* **365**, 2110–2121 (2011).
11. Winfield, J. B., Faiferman, I. & Koffler, D. Avidity of anti-DNA antibodies in serum and IgG glomerular eluates from patients with systemic lupus erythematosus. Association of high avidity antinative DNA antibody with glomerulonephritis. *J. Clin. Invest.* **59**, 90–96 (1977).
12. Hahn, B. H. Antibodies to DNA. *N. Engl. J. Med.* **338**, 1359–1368 (1998).
13. van Bruggen, M. C. *et al.* Nucleosomes and histones are present in glomerular deposits in human lupus nephritis. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* **12**, 57–66 (1997).
14. van der Vlag, J. & Berden, J. H. M. Lupus nephritis: role of antinucleosome autoantibodies. *Semin. Nephrol.* **31**, 376–389 (2011).
15. Jacobi, A. M. & Diamond, B. Balancing diversity and tolerance: lessons from patients with systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.* **202**, 341–344 (2005).
16. Muñoz, L. E., Lauber, K., Schiller, M., Manfredi, A. A. & Herrmann, M. The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. *Nat. Rev. Rheumatol.* **6**, 280–289 (2010).
17. Arbuckle, M. R. *et al.* Development of Autoantibodies before the Clinical Onset of Systemic Lupus Erythematosus. *N. Engl. J. Med.* **349**, 1526–1533 (2003).
18. Bizzaro, N., Villalta, D., Giavarina, D. & Tozzoli, R. Are anti-nucleosome antibodies a better diagnostic marker than anti-dsDNA antibodies for systemic lupus erythematosus? A systematic review and a study of meta-analysis. *Autoimmun. Rev.* **12**, 97–106 (2012).
19. Li, H., Jiang, Y., Prak, E. L., Radic, M. & Weigert, M. Editors and editing of anti-DNA receptors. *Immunity* **15**, 947–957 (2001).
20. Jiang, X. *et al.* A novel strategy for generation of monoclonal antibodies from single B cells using rt-PCR technique and *in vitro* expression. *Biotechnol. Prog.* **22**, 979–988 (2006).
21. Tiller, T. *et al.* Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. *J. Immunol. Methods* **329**, 112–124 (2008).
22. Gies, V. *et al.* Identification of autoreactive B cells with labeled nucleosomes. *Sci. Rep.* **7**, 602 (2017).
23. Rumore, P. M. & Steinman, C. R. Endogenous circulating DNA in systemic lupus erythematosus. Occurrence as multimeric complexes bound to histone. *J. Clin. Invest.* **86**, 69–74 (1990).
24. Stemmer, C., Briand, J. P. & Muller, S. Mapping of linear histone regions exposed at the surface of the nucleosome in solution. *J. Mol. Biol.* **273**, 52–60 (1997).
25. Muller, S., Dieker, J., Tincani, A. & Meroni, P. L. Pathogenic anti-nucleosome antibodies. *Lupus* **17**, 431–436 (2008).
26. Sekiguchi, D. R. *et al.* Development and selection of edited B cells in B6.56R mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **176**, 6879–6887 (2006).
27. Radic, M. Z. *et al.* Residues that mediate DNA binding of autoimmune antibodies. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **150**, 4966–4977 (1993).
28. Chen, C. *et al.* Deletion and editing of B cells that express antibodies to DNA. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **152**, 1970–1982 (1994).
29. Fukuyama, H., Nimmerjahn, F. & Ravetch, J. V. The inhibitory Fcγ receptor modulates autoimmunity by limiting the accumulation of immunoglobulin G+anti-DNA plasma cells. *Nat. Immunol.* **6**, 99–106 (2005).
30. Liu, Y. *et al.* Lupus susceptibility genes may breach tolerance to DNA by impairing receptor editing of nuclear antigen-reactive B cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **179**, 1340–1352 (2007).
31. Li, Y., Louzoun, Y. & Weigert, M. Editing Anti-DNA B Cells by V λ x. *J. Exp. Med.* **199**, 337–346 (2004).
32. Peterson, L. K. *et al.* SLAP deficiency decreases dsDNA autoantibody production. *Clin. Immunol. Orlando Fla* **150**, 201–209 (2014).
33. Tan, E. M. Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv. Immunol.* **44**, 93–151 (1989).
34. Grimaldi, C. M., Michael, D. J. & Diamond, B. Cutting edge: expansion and activation of a population of autoreactive marginal zone B cells in a model of estrogen-induced lupus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **167**, 1886–1890 (2001).
35. Mackay, F. *et al.* Mice Transgenic for Baff Develop Lymphocytic Disorders along with Autoimmune Manifestations. *J. Exp. Med.* **190**, 1697–1710 (1999).
36. Chen, X., Martin, F., Forbush, K. A., Perlmutter, R. M. & Kearney, J. F. Evidence for selection of a population of multi-reactive B cells into the splenic marginal zone. *Int. Immunol.* **9**, 27–41 (1997).
37. Martin, F. & Kearney, J. F. Marginal-zone B cells. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 323–335 (2002).
38. Cyster, J. G. B cells on the front line. *Nat. Immunol.* **1**, 9–10 (2000).
39. Martin, F. & Kearney, J. F. B-cell subsets and the mature preimmune repertoire. *Marginal zone and B1 B cells as part of a 'natural immune memory'*. *Immunol. Rev.* **175**, 70–79 (2000).
40. Kishi, Y. *et al.* Apoptotic marginal zone deletion of anti-Sm/ribonucleoprotein B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 7811–7816 (2012).
41. Cyster, J. G. & Goodnow, C. C. Antigen-induced exclusion from follicles and anergy are separate and complementary processes that influence peripheral B cell fate. *Immunity* **3**, 691–701 (1995).
42. Phan, T. G. *et al.* B cell receptor-independent stimuli trigger immunoglobulin (Ig) class switch recombination and production of IgG autoantibodies by anergic self-reactive B cells. *J. Exp. Med.* **197**, 845–860 (2003).
43. Thien, M. *et al.* Excess BAFF Rescues Self-Reactive B Cells from Peripheral Deletion and Allows Them to Enter Forbidden Follicular and Marginal Zone Niches. *Immunity* **20**, 785–798 (2004).
44. Cappione, A. *et al.* Germinal center exclusion of autoreactive B cells is defective in human systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* **115**, 3205–3216 (2005).
45. Odegard, J. M. *et al.* ICOS-dependent extrafollicular helper T cells elicit IgG production via IL-21 in systemic autoimmunity. *J. Exp. Med.* **205**, 2873–2886 (2008).
46. Allman, D. *et al.* Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **167**, 6834–6840 (2001).
47. Teague, B. N. *et al.* Cutting Edge: Transitional T3 B Cells Do Not Give Rise to Mature B Cells, Have Undergone Selection, and Are Reduced in Murine Lupus. *J. Immunol.* **178**, 7511–7515 (2007).

48. Srivastava, B., Quinn, W. J., Hazard, K., Erikson, J. & Allman, D. Characterization of marginal zone B cell precursors. *J. Exp. Med.* **202**, 1225–1234 (2005).
49. Giltiay, N. V. *et al.* Overexpression of TLR7 promotes cell-intrinsic expansion and autoantibody production by transitional T1 B cells. *J. Exp. Med.* **210**, 2773–2789 (2013).
50. Loder, F. *et al.* B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *J. Exp. Med.* **190**, 75–89 (1999).
51. Petro, J. B. *et al.* Transitional type 1 and 2 B lymphocyte subsets are differentially responsive to antigen receptor signaling. *J. Biol. Chem.* **277**, 48009–48019 (2002).
52. Su, T. T. & Rawlings, D. J. Transitional B lymphocyte subsets operate as distinct checkpoints in murine splenic B cell development. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **168**, 2101–2110 (2002).
53. Hsu, B. L., Harless, S. M., Lindsley, R. C., Hilbert, D. M. & Cancro, M. P. Cutting edge: BlyS enables survival of transitional and mature B cells through distinct mediators. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **168**, 5993–5996 (2002).
54. Niiron, H. & Clark, E. A. Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 945–956 (2002).
55. Merrell, K. T. *et al.* Identification of anergic B cells within a wild-type repertoire. *Immunity* **25**, 953–962 (2006).
56. Liubchenko, G. A. *et al.* Potentially autoreactive naturally occurring transitional T3 B lymphocytes exhibit a unique signaling profile. *J. Autoimmun.* **38**, 293–303 (2012).
57. Gay, D., Saunders, T., Camper, S. & Weigert, M. Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. *J. Exp. Med.* **177**, 999–1008 (1993).
58. Radic, M. Z., Erikson, J., Litwin, S. & Weigert, M. B lymphocytes may escape tolerance by revising their antigen receptors. *J. Exp. Med.* **177**, 1165–1173 (1993).
59. Tiegs, S. L., Russell, D. M. & Nemazee, D. Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J. Exp. Med.* **177**, 1009–1020 (1993).
60. Kalinina, O. *et al.* Light chain editors of anti-DNA receptors in human B cells. *J. Exp. Med.* **211**, 357–364 (2014).
61. Liu, X., Linden, M. & Van Ness, B. Induced kappa receptor editing shows no allelic preference in a mouse pre-B cell line. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **165**, 7058–7063 (2000).
62. Ramsden, D. A. & Wu, G. E. Mouse kappa light-chain recombination signal sequences mediate recombination more frequently than do those of lambda light chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 10721–10725 (1991).
63. Yamagami, T. *et al.* Four of five RAG-expressing Jkappa^{-/-} small pre-BII cells have no L chain gene rearrangements: detection by high-efficiency single cell PCR. *Immunity* **11**, 309–316 (1999).
64. Li, Y., Li, H. & Weigert, M. Autoreactive B cells in the marginal zone that express dual receptors. *J. Exp. Med.* **195**, 181–188 (2002).
65. Erikson, J. *et al.* Expression of anti-DNA immunoglobulin transgenes in non-autoimmune mice. *Nature* **349**, 331–334 (1991).
66. Tung, J. W. *et al.* Modern flow cytometry: a practical approach. *Clin. Lab. Med.* **27**, 453–468, v (2007).

Acknowledgements

This research was supported by ANR program “Investissements d’Avenir” (ANR-11-EQPX-022), by EU-funded (ERDF) project INTERREG V “RARENET” and by grants from Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (API 2012 HUS N°5543). We thank Martin Weigert (Department of Pathology, University of Chicago, Chicago, IL, USA) for providing 56R on C57BL/6 background. We thank Christopher Mueller (CNRS UPR 3572 “Immunopathology and Therapeutic Chemistry”/Laboratory of Excellence Médalis, Institute of Molecular and Cellular Biology (IBMC), Strasbourg, France) for correction of the manuscript.

Author Contributions

V.G., J.L.P., T.M., A.S.K. and P.S.S. designed the research. V.G., D.B. and M.M. performed the research. V.G., D.B., M.M., J.L.P., T.M., A.S.K. and P.S.S. analyzed the data. V.G., M.M. and P.S.S. wrote the paper.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13422-z>.

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher’s note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article’s Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017



Delphine BOUIS



Etude des conséquences d'un gain de fonction de Sting chez la souris : Modèle STING V154M/WT

RESUME

Des mutations gains de fonction du gène *STING* chez l'Homme (telles que V155M) déclenchent une pathologie autoinflammatoire sévère de type interféronopathie, le SAVI (*Sting associated vasculopathy with onset in infancy*), une vasculopathie associée à une fibrose pulmonaire et des symptômes lupus-like.

Afin de mieux comprendre la physiopathologie du SAVI, nous avons généré un modèle murin porteur de la mutation correspondante grâce à la technologie CRISPR/Cas9.

Ces souris STING V154M/WT développent un phénotype SCID (déficit immunitaire combiné sévère) avec diminution des LT, des LB et des NK en périphérie, et une expansion du compartiment myéloïde. Ce défaut de développement est observé précocement dès le stade pré-proB dans la moelle osseuse, et au stade DN2 dans le thymus, et semble intrinsèque aux cellules hématopoïétiques. De plus, ces souris présentent une hypogammaglobulinémie sévère. Les LT et LB matures présentent également des défauts intrinsèques. Enfin, les souris présentent une signature IFN, mais leur phénotype SCID est IFN de type I-indépendant.

Ces résultats mettent en évidence un rôle important de STING dans le développement lymphoïde.

Mots clés : *STING, V154M, SCID, IFN I, développement lymphoïde.*

ABSTRACT

In humans, point mutations in *STING* gene, such as V155M, lead to a severe autoinflammatory disease called SAVI (*Sting associated vasculopathy with onset in infancy*), classified as interferonopathy and characterized by vasculopathy, pulmonary fibrosis and a lupus-like pathology.

In order to better understand the pathophysiology of SAVI, we generated a mouse model with the corresponding mutation, using CRISPR/Cas9 technology.

These STING V154M/WT mice develop a SCID (*severe combined immunodeficiency disease*) with decrease of peripheral T, B and NK cells, and expansion of myeloid compartment. This defect seems to be present since the early stages, i.e. pre-proB cells stage in bone marrow and DN2 stage in thymus, and seems intrinsic to hematopoietic cells. In addition, these mice present a strong hypogammaglobulinemia. Mature T and B cells also present intrinsic defaults. Finally, these mice present an IFN signature but their phenotype is independent of the IFN pathway.

These results highlight an important role of STING in lymphoid development.

Key words : *STING, V154M, SCID, IFN I, lymphoid development.*