



**HAL**  
open science

# Analyse du rôle du facteur de transcription Ikaros dans le développement des lymphocytes TH17

Gaëtan Maurer

► **To cite this version:**

Gaëtan Maurer. Analyse du rôle du facteur de transcription Ikaros dans le développement des lymphocytes TH17. Génomique, Transcriptomique et Protéomique [q-bio.GN]. Université de Strasbourg, 2017. Français. NNT : 2017STRAJ115 . tel-02918040

**HAL Id: tel-02918040**

**<https://theses.hal.science/tel-02918040>**

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.

**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ**  
**IGBMC - CNRS UMR 7104 - Inserm U 964**

# THÈSE

présentée par :

**Gaëtan MAURER**

soutenue le : 15 Décembre 2017

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

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Immunologie et Inflammation

## Analyse du rôle du facteur de transcription Ikaros dans le développement des lymphocytes T<sub>H</sub>17

THÈSE dirigée par :

**Dr KASTNER Philippe**

IGBMC – Illkirch, France

RAPPORTEURS EXTERNES :

**Dr BENLAGHA Kamel**

Hôpital Saint Louis – Paris, France

**Dr LOUVET Cédric**

CRTI – Nantes, France

EXAMINATEUR INTERNE :

**Pr SOULAS-SPRAUEL Pauline**

IBMC – Strasbourg, France

---

INVITÉ :

**Dr CHARVET Céline**

IGBMC – Illkirch, France

*À ma femme,*

## *Remerciements*

---

La partie remerciements est la dernière à rédiger et constitue l'une des plus agréables de ce manuscrit, non seulement car elle achève son écriture, mais également, car elle me permet de remercier les personnes importantes qui ont contribué à sa réalisation.

Tout d'abord, je remercie Susan et Philippe de m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire à l'IGBMC. Ils m'ont apporté beaucoup de choses, tant au niveau professionnel, qu'au niveau personnel durant ces 4 années passées. Je tiens particulièrement à remercier Susan pour nos nombreuses discussions matinales concernant les problèmes rencontrés au cours de mes expériences, et pour les solutions apportées. Mais je tiens également à la remercier pour ses conseils concernant l'après-thèse. Merci à Philippe d'avoir toujours répondu présent lors de mes nombreuses « petites » questions, pour sa supervision et son expertise, et pour avoir toujours corrigé mes rapports, ainsi que cette thèse.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance aux membres du jury, le Pr Pauline SOULAS-SPRAUEL, le Dr Kamel BENLAGHA, et le Dr Cédric LOUVET pour avoir accepté de juger ce travail de thèse.

Merci à Attila de m'avoir encadré lors de mon arrivée dans le laboratoire et pour m'avoir aidé dans de nombreuses expériences présentées dans ce manuscrit. Je remercie également Céline, car depuis son arrivée dans le laboratoire, ma vision du projet a totalement changé. Merci à toi d'avoir accepté de me superviser, et surtout de m'avoir poussé chaque jour sans jamais te décourager. Merci de m'avoir conseillé tant au niveau professionnel, qu'au niveau personnel. Nos discussions me manqueront énormément dans la suite de ma carrière, car malgré nos nombreux différends à certains moments, tu as un cœur immense et une gentillesse infinie. Un grand merci également pour les corrections apportées à ce manuscrit. Comme l'a dit Catherine Deneuve : « L'amitié, comme l'amour, demande beaucoup d'efforts, d'attention, de constance, elle exige surtout de savoir offrir ce que l'on a de plus cher dans la vie : du temps ! », et que de temps m'as-tu offert ! MERCI !

Merci également aux autres membres de l'équipe passés et présents pour vos discussions et vos sourires qui ont égayés les journées au labo. Merci particulièrement à Patricia qui a toujours été de bon conseil et qui m'a souvent dépanné. Merci également à Peggy et Beate pour votre aide certains jours plus difficiles que d'autres. Kate, un énorme merci pour tes

## *Remerciements*

---

encouragements lorsque tu étais encore dans le laboratoire, et bien après ton départ. Tes conseils m'ont énormément aidé lors de ma dernière année de thèse, et pour l'écriture de ce manuscrit.

Merci aux membres des autres équipes avec qui j'ai passé de bons moments. Merci Corinne, Audrey, Stéphanie, Véronique, Cathie et Céline tout particulièrement avec qui le repas de midi passait tellement plus vite et était tellement plus plaisant. J'espère vous revoir bientôt.

Merci à Claudine, ainsi qu'à Muriel, les déesses du FACS. Votre aide sur les machines m'a grandement facilité la tâche. Je remercie également vos ordinateurs qui m'ont aidé à vous donner des sueurs froides, lorsque j'échangeais vos câbles, ou que j'inversais vos écrans. Vous me manquez énormément car votre joie et votre bonne humeur était mon moteur pour les longues journées de tris.

Merci également aux autres personnes des plateformes que j'ai pu côtoyer au cours de mes années au sein de l'IGBMC (Violaine, Christelle, Stéphanie, Tao, Cathy, Doulaye, Bernard, toutes les filles de la culture cellulaire). J'ai appris énormément à vos côtés dans l'analyse des résultats de transcriptome et de ChIP-seq. Merci tout particulièrement à Romain avec qui j'ai pu discuter de tout et de rien, et qui m'aura vu souffrir aussi bien sur les trieurs, que lors des analyses des résultats de transcriptome et de ChIP-seq. Enfin, merci aux animaliers d'avoir pris soin de mes souris et surtout de m'avoir appris à gérer ces petits êtres qui sont très demandeurs, et qui ont un mordant (mon doigt s'en souvient encore) bien à eux pour se faire comprendre.

Merci à Carole pour son aide lors de l'écriture de cette thèse. Cela n'a pas été une mince affaire, mais nous avons réussi chacun notre tour. Merci à PJ pour sa bonne humeur et son aide informatique. Tu es un as de la souris (sans pattes^^)! Merci aux autres étudiants avec qui j'ai pu interagir tout au long de ma thèse. Nos discussions, et nos fous rires resteront gravés dans ma mémoire. Bonne continuation à vous tous, et bon courage lors de l'écriture de votre thèse.

Enfin, merci à tous les membres de ma famille, de ma belle-famille et à mes amis pour m'avoir encouragé et supporté au cours de mes études, et surtout au cours de ma thèse. Cela m'aura donné le courage d'avancer et de finir malgré les moments difficiles. Merci tout particulièrement à mes parents et surtout à mon père qui aura tout fait pour que je puisse faire

## *Remerciements*

---

des études. Merci à ma mère d'avoir essayé de comprendre ce qu'était mon travail jusqu'à aujourd'hui même si je voyais dans tes yeux tout le désespoir de ne pas comprendre. Merci Claudine et Mario pour vos encouragements, votre présence, et surtout d'avoir cru en moi. Merci à mes amis de m'avoir épaulé tout au long de ma thèse, et pour leurs encouragements. Un grand merci à toi Josh, avec qui j'aurai partagé de nombreuses bières en discutant de la thèse ! Ton amitié me va droit au cœur, et j'espère pouvoir te rendre la pareil quand tu écriras ton mémoire de droit.

Pour finir avec ces remerciements, je tiens à dire merci à la personne la plus importante pour moi : ma femme ! Ta présence aura été essentielle au cours de mes études et de ma thèse. Tu m'as soutenu sans jamais faillir, et j'espère pouvoir en faire autant pour toi. Merci de m'avoir redonné confiance en moi dans les moments difficiles, d'avoir accepté tous les sacrifices concédés pour en arriver là où je suis aujourd'hui. J'espère pouvoir désormais te consacrer plus de temps et concrétiser avec toi tous les projets que nous avons en tête. Avec tout mon amour ma choupi.

### **A**

Ac : Anticorps

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNc : ADN complémentaire

AF700 : Alexa Fluor 700

AHR : Aryl Hydrocarbon Receptor

AID : Activation Induced Cytidine  
Deaminase

AJI : Arthrite Juvénile Idiopathique

ARN : Acide RiboNucléique

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

### **B**

BATF : Basic leucine zipper transcription  
factor, ATF-like

BCL6 : B-cell lymphoma 6 protein

BCR : B-Cell Receptor

BLIMP1 : B lymphocyte-induced  
maturation protein 1

BMP : Bone Morphogenic Protein

BRG1 : Brahma-Related Gene 1

BSA : Bovine Serum Albumine

BV421 : Brillant Violet 421

### **C**

CCL20 : CC Chemokine Ligand 20

CCR6 : CC Chemokine Receptor 6

CD : Cluster de différenciation

cDC : conventional Dendritic Cells

CDK9 : Cycline Dependent Kinase 9

CFSE : Carboxyfluorescein Succinimidyl  
Ester

ChIP : Chromatin Immunoprecipitation

ChIP-seq : ChIP-sequencing

CIVD : Syndrome d'Immunodéficience  
Commune Variable

CK2 : Casein Kinase 2

CLP : Common Lymphoid Progenitor

CMH : Complexe Majeur  
d'Histocompatibilité

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques

CtBP : C-terminal Binding protein

CTLA-4 : Cytotoxic T-lymphocyte  
associated protein 4

CXCL : CXC Chemokine Ligand

CXCR3 : CXC Chemokine Receptor 3

### **D**

DAPI : 4'6-diamidino-2-phenylindole

DC : Dendritic Cells

DMSO : Dimethylsulfoxyde

DN : Double Négative

DP : Double Positive

DTT : Dithiothréitol

### **E**

EAE : Experimental Autoimmune  
Encephalomyelitis

EDTA : Ethylene Diamine Tetraacetic Acid

eF660 : eFluor 660

ENU : EthylNitrosoUrée

ETP : Early Thymic Progenitor

ER : Estrogen Receptor

### *F*

FACS : Fluorescence-Activated Cell Sorting

FasL : Fas Ligand

FCS : Foetal Calf Serum

FITC : Fluorescein Isothiocyanate

FLT3 : Fms-like Tyrosine Kinase 3

FT : Facteur de Transcription

### *G*

GAPDH : Glyceraldéhyde-3-phosphate Déshydrogénase

GATA3 : GATA-binding protein 3

Gfi1 : Groxth Factor Independent 1

GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor

GSEA : Gene Set Enrichment Analysis

GWAS : Genome-Wide Association Studies

Gzmb : Granzyme b

### *H*

HBSS : Hank's Balanced Salt Solution

HC-PC : Hétérochromatine Péricentromérique

HDAC : Histone Déacétylase

HEPES : Hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid

HRP : Horseradish Peroxydase

### *I*

ICC : Ikaros CD4-Cre

ICLP : Innate Common Lymphoid Progenitor

Id2 : Inhibitor of DNA binding 2

IFN : Interféron

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

ILC : Innate Lymphoid Cells

ILC87 : Ikaros Lck-Cre87

IMDM : Iscove's Modified Dulbecco's Medium

IRF4 : Interferon Regulatory Factor 4

### *J*

JAK : Janus Kinase

### *K*

KO : Knock-Out

### *L*

LAL-B ou T : Leucémie aigüe lymphoblastique de type B ou T

LB : Lymphocytes B

Lck : Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase

LEAF : Low Endotoxin, Azide Free

LED : Lupus Erythémateux Disséminé

LMPP : Lymphoid and Myeloid Primed Progenitor

LPL : Lamina Propria Lymphocytes

LT : Lymphocytes T



LT $\alpha$  ou  $\beta$  : Lymphotoxin  $\alpha$  ou  $\beta$

LTc : LT cytotoxique

LTh : LT « helper »

LTi : Lymphoid Tissue inducer

LTreg : LT régulateur

### **M**

MAF : Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Oncogene

MAI : Maladie Auto-Immune

MDSC : Myeloid-Derived Suppressor Cells

MFI : Mean Fluorescence Intensity

MPP : Multipotent Progenitor

### **N**

NH : Natural Helper

NK : Natural Killer

NuRD : Nucleosome Remodelling and Histone Deacetylase

### **O**

4-OHT : 4-hydroxytamoxifène

### **P**

PBS : Phosphate-buffered Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

pDC : plasmacytoid Dendritic Cells

PD-1 : Programmed Cell Death 1

PDL-1: Programmed Cell Death Ligand 1

PE : Phycoérythrin

PHD : Plant Homeodomain

PLZF : Promyelocytic Leukaemia Zinc Finger Protein

PMA : Phorbol 12-myristate 13-acétate

PP1 : Protein Phosphatase 1

PR : Polyarthrite Rhumatoid

PRC2 : Polycomb Repressor Complex 2

### **R**

RA : Retinoic Acid

RAG : Recombination Activating Gene

RANK : Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$  B

ROR $\gamma$ t : RAR-related Orphan Nuclear Receptor  $\gamma$ t

RORE : ROR element

RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium

RT-PCR : Reverse Transcription PCR

RT-qPCR : Real-Time quantitative PCR

### **S**

Sca-1 : Stem cells antigen 1

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SEP : Sclérose en Plaques

SNC : Système Nerveux Central

SP : Simple Positive

SPF : Specific Pathogen Free

STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription

SWI/SNF : Switch/Sucrose Non Fermentable

*T*

TBP : TATA box Binding Protein

TCR : T Cell Receptor

TdT : Terminal deoxynucleotidyl  
Transferase

TGF : Transforming Growth Factor

TNF : Tumor Necrosis Factor

TYK : Tyrosine Kinase

*V*

VEGF : Vascular Endothelial Growth  
Factor

*W*

WT : Wild Type

---

<b>Introduction</b> .....	1
<b>1. Les cellules de la lignée lymphoïde</b> .....	1
<b>1.1 Préambule</b> .....	1
<b>1.2 Les cellules lymphoïdes</b> .....	1
1.2.1 Les cellules dendritiques.....	1
1.2.2 Les lymphocytes B.....	2
1.2.3 Les cellules lymphoïdes innées.....	2
1.2.4 Les lymphocytes T.....	3
<b>2. Le compartiment lymphoïde T</b> .....	4
<b>2.1 De la moelle osseuse au thymus</b> .....	4
<b>2.2 Développement et maturation des lymphocytes T dans le thymus</b> .....	5
2.2.1 Les différents marqueurs de la différenciation.....	5
2.2.2 Développement des cellules T dans le thymus.....	6
2.2.3 Voies de signalisation et gènes gouvernant le développement des lymphocytes T.....	7
<b>2.3 Activation des lymphocytes T</b> .....	9
<b>2.4 Diversification des lymphocytes T</b> .....	10
<b>3. Les lymphocytes T<sub>H</sub>17</b> .....	13
<b>3.1 Découverte des lymphocytes T<sub>H</sub>17</b> .....	13
<b>3.2 Différenciation des lymphocytes T<sub>H</sub>17</b> .....	14
3.2.1 Facteurs impliqués lors de la différenciation des lymphocytes T <sub>H</sub> 17.....	14
3.2.2 Différenciation des lymphocytes T <sub>H</sub> 17 murins.....	16
3.2.3 Différenciation des lymphocytes T <sub>H</sub> 17 humains.....	19
<b>3.3 Le modèle régulateur versus pathogénique</b> .....	20
<b>3.4 La plasticité des lymphocytes T<sub>H</sub>17</b> .....	23
<b>3.5 Les autres types cellulaires produisant de l'IL-17</b> .....	25
3.5.1 Les lymphocytes TCD8 <sup>+</sup> IL-17A <sup>+</sup> .....	25
3.5.2 Les cellules NKT17.....	26
3.5.3 Les cellules ILC3.....	26
3.5.4 Les lymphocytes TCD4 <sup>+</sup> γδ.....	26
<b>4. Le facteur de transcription IKAROS</b> .....	27
<b>4.1 Découverte du facteur de transcription Ikaros</b> .....	27
<b>4.2 Structure du facteur de transcription Ikaros</b> .....	27

---

<u>4.3 Expression du facteur de transcription Ikaros</u> .....	28
4.3.1 Ikaros et le système hématopoïétique.....	28
4.3.2 Autres localisations d'Ikaros.....	29
<u>4.4 Régulation du facteur Ikaros</u> .....	29
4.4.1 Régulation transcriptionnelle.....	29
4.4.2 Régulation traductionnelle.....	29
4.4.3 Régulation post-traductionnelle.....	30
<u>4.5 Ikaros : activateur et répresseur de la transcription</u> .....	31
4.5.1 Ikaros est un activateur de la transcription.....	31
4.5.2 Ikaros est un répresseur de la transcription.....	31
4.5.3 Ikaros et son activité au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique.....	32
<u>4.6 Modèles murins déficients pour Ikaros et les conséquences liées</u> .....	33
4.6.1 La mutation dominante négative $Ik^{DN}$ .....	33
4.6.2 La mutation nulle $Ik^{\Delta}$ .....	34
4.6.3 La mutation plastic $Ik^{Plac}$ .....	34
4.6.4 La mutation hypomorphe $Ik^{LUL}$ .....	34
4.6.5 La mutation des doigts de zinc $Ik^{\Delta F}$ .....	34
4.6.6 La mutation ciblée $Ik^{cr}$ .....	35
<u>4.7 Les fonctions d'Ikaros dans le système hématopoïétique</u> .....	35
4.7.1 Ikaros dans les progéniteurs pluripotents.....	37
4.7.2 Ikaros dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes.....	37
4.7.3 Ikaros dans les lymphocytes B.....	37
4.7.4 Ikaros dans les lymphocytes T.....	38
<u>4.8 Ikaros et les pathologies humaines</u> .....	39
4.8.1 Ikaros et les leucémies de type B.....	39
4.8.2 Ikaros et les leucémies de type T.....	40
4.8.3 Ikaros dans d'autres pathologies.....	40
<u>5. La famille Ikaros et les lymphocytes <math>T_H17</math> dans les pathologies humaines</u> .....	42
<u>5.1 La famille Ikaros et les maladies auto-immunes</u> .....	42
5.1.1 Implication du facteur de transcription Ikaros.....	42
5.1.2 Le facteur de transcription Helios dans les MAI.....	43
5.1.3 Aiolos dans les pathologies humaines.....	43
5.1.4 Eos dans les pathologies humaines.....	43

<u>5.2 Les lymphocytes T<sub>H</sub>17 dans les pathologies auto-immunes</u>	44
5.2.1 Les lymphocytes T <sub>H</sub> 17 et le Lupus Erythémateux Disséminé	44
5.2.2 Les lymphocytes T <sub>H</sub> 17 dans la polyarthrite rhumatoïde	44
5.2.3 Les lymphocytes T <sub>H</sub> 17 et l'arthrite juvénile idiopathique	45
5.2.4 Les lymphocytes T <sub>H</sub> 17 dans le diabète de type 1	45
5.2.5 Les lymphocytes T <sub>H</sub> 17 et la sclérose en plaque	45
5.2.6 Les lymphocytes T <sub>H</sub> 17 dans les maladies inflammatoires de l'intestin	46
5.2.7 Les lymphocytes T <sub>H</sub> 17 et le psoriasis	46
5.2.8 Traitements ciblant les lymphocytes T <sub>H</sub> 17	46
<u>5.3 Les lymphocytes T<sub>H</sub>17 dans le cancer</u>	47
5.3.1 Rôle pro-tumoral des lymphocytes T <sub>H</sub> 17	47
5.3.2 Rôle anti-tumoral des lymphocytes T <sub>H</sub> 17	48
<b>Matériel et méthodes</b>	51
<u>1. Souris</u>	51
1.1 Souris I $\kappa$ <sup>L/L</sup>	51
1.2 Souris CD4-Cre I $\kappa$ <sup>fl</sup>	51
1.3 Souris Rosa-Cre I $\kappa$ <sup>fl</sup>	51
1.4 Souris CD45.1	51
<u>2. Cellules et culture cellulaire</u>	52
2.1 Milieux de culture, réactifs et plaques pour culture	52
2.2 Culture cellulaire	52
<u>3. Cytométrie de flux</u>	54
3.1 Réactifs	54
3.2 Suspension cellulaire	54
3.3 Anticorps	55
3.4 Marquages extra-cellulaires et intra-cellulaires	56
3.5 Tri cellulaire	58
<u>4. Préparation d'ADN et d'ARN</u>	59
4.1 Extraction d'ADN	59
4.2 Extraction d'ARN	59
<u>5. Réaction en chaîne par polymérase</u>	60
5.1 Génotypage	60

5.2 RT-PCR	61
5.3 RT-qPCR	62
6. Puces à oligonucléotides Affymetrix	63
7. Immunoprécipitation de chromatine et séquençage (ChIP-seq)	64
8. Western-Blot	65
9. GSEA (Gene Set Enrichment Analysis)	65
10. Analyses statistiques	66
<b>Résultats</b>	<b>67</b>
1. Ikaros augmente l'expression de ROR $\gamma$ t <i>in vitro</i>	69
1.1 L'expression de ROR $\gamma$ t est augmentée par Ikaros dans les ILC87	69
1.2 La délétion d'Ikaros diminue l'expression de ROR $\gamma$ t dans les lymphocytes TCD4 <sup>+</sup>	70
2. La délétion d'Ikaros inhibe la différenciation en LT $\alpha$ 17 et en LTreg <i>in vitro</i>	71
2.1 Les cellules T déficientes en Ikaros ont un défaut d'expression de l'IL-17A	71
2.2 L'utilisation d'anticorps bloquants pour les cellules T $\alpha$ 1 et T $\alpha$ 2 en culture ne permet pas la génération de cellules T $\alpha$ 17 en absence d'Ikaros	72
2.3 La délétion d'Ikaros réduit la génération de lymphocytes Treg	73
3. Ikaros régule d'autres facteurs au cours de la différenciation des lymphocytes T $\alpha$ 17	74
4. Ikaros est un régulateur de gènes décrits comme pathogénique	76
4.1 La délétion d'Ikaros augmente l'expression d'un groupe de gènes pathogéniques	76
4.2 La délétion d'Ikaros entraîne une augmentation de l'expression de GM-CSF	78
4.3 Les cellules déficientes en Ikaros ont le même phénotype en conditions de différenciation pathogénique et régulatrice	80
4.4 Le phénotype observé est toujours présent en utilisant un autre sérum	83
4.5 La production de GM-CSF est plus importante dans les cellules à faible indice de prolifération	84

<u>5. Les cellules KO sont-elles des cellules T<sub>H</sub>GM-CSF ou des cellules T<sub>H</sub>17 pathogéniques ?</u>	86
<u>6. Ikaros régule la différenciation T<sub>H</sub>17 de manière intrinsèque</u>	87
<u>7. La délétion d'Ikaros augmente l'apoptose dans les cellules KO en culture T<sub>H</sub>17</u>	88
<u>8. Ikaros régule de manière indirecte les gènes de la signature pathogénique</u>	89
<u>9. L'expression d'Ikaros est régulée au cours de la différenciation en LT<sub>H</sub>17</u>	90
<u>10. La signalisation d'Ikaros n'a pas les mêmes effets <i>ex vivo</i> que <i>in vitro</i> sur les lymphocytes T<sub>H</sub>17</u>	92
<u>11. La signalisation ne semble pas être affectée dans les cellules déficientes en Ikaros</u>	94
<b>Discussion</b>	98
<u>1. Ikaros est un régulateur de la différenciation en lymphocytes T<sub>H</sub>17</u>	98
<u>1.1 Ikaros régule l'expression de ROR<math>\gamma</math>t au cours de la différenciation en lymphocytes T<sub>H</sub>17</u>	98
<u>1.2 Ikaros régule l'expression d'autres facteurs impliqués dans la différenciation en lymphocytes T<sub>H</sub>17</u>	99
<u>1.3 Ikaros est important pour les LT<sub>H</sub>17 et les LTreg</u>	100
<u>2. Ikaros régule les gènes pathogéniques au cours de la différenciation en lymphocytes T<sub>H</sub>17</u>	101
<u>2.1 Ikaros régule l'expression de GM-CSF</u>	101
<u>2.2 Ikaros régule l'expression d'autres facteurs pathogéniques</u>	103
<u>3. Ikaros est impliqué dans d'autres voies de régulation au cours de la différenciation des lymphocytes T<sub>H</sub>17</u>	104
<u>3.1 Ikaros semble impliqué dans la régulation de la voie du TGF-<math>\beta</math></u>	104
<u>3.2 Ikaros semble réguler son expression au cours de la différenciation en lymphocytes T<sub>H</sub>17 de manière TCR-dépendante</u>	105
<b>Bibliographie</b>	106

## 1. INTRODUCTION

Figure 1 : Diversification des cellules lymphoïdes innées.....	3
Figure 2 : Marqueurs phénotypiques caractérisant les différentes sous-populations DN...	5
Figure 3 : Marqueurs phénotypiques détectés par cytométrie de flux.....	6
Figure 4 : Représentation du développement des cellules T dans le thymus.....	7
Figure 5 : Expression des facteurs de transcription au cours du développement des thymocytes.....	8
Figure 6 : Voie de signalisation du TCR.....	9
Figure 7 : Diversification des lymphocytes TCD4 <sup>+</sup> .....	11
Figure 8 : Représentation schématique de l'IL-12, de l'IL-23 et de leurs récepteurs.....	14
Figure 9 : Interaction des différents facteurs de transcription impliqués au cours de la différenciation des lymphocytes T <sub>H</sub> 17.....	15
Figure 10 : Modèle de fixation des facteurs de transcription ROR sur les gènes possédant une séquence RORE.....	16
Figure 11 : Différenciation des lymphocytes T <sub>H</sub> 17 chez la souris.....	18
Figure 12 : Expression cytokinique des lymphocytes T <sub>H</sub> 17 en fonction des cytokines utilisées lors de la différenciation.....	19
Figure 13 : Différenciation des lymphocytes T <sub>H</sub> 17 chez l'homme.....	20
Figure 14 : Schéma de différenciation des lymphocytes T <sub>H</sub> 17 selon <i>Lee et al.</i> , 2012.....	21
Figure 15 : Gènes décrits dans la signature « pathogénique » ou « non-pathogénique » selon <i>Lee et al.</i> , 2012.....	22
Figure 16 : Schéma de différenciation des lymphocytes T <sub>H</sub> 17 selon <i>Lee and Kuchroo</i> , 2015.....	22
Figure 17 : La plasticité des lymphocytes T <sub>H</sub> 17.....	24
Figure 18 : Hétérogénéité et plasticité des lymphocytes T <sub>H</sub> 17.....	25
Figure 19 : Structure de la protéine Ikaros et des différentes isoformes.....	28
Figure 20 : Association des isoformes d'Ikaros entre elles, ainsi que des différents membres.....	30
Figure 21 : Structure du complexe Ikaros-NuRD ainsi que de Mi-2β.....	31
Figure 22 : Domaines de liaison d'Ikaros avec les répresseurs.....	32
Figure 23 : Modèle de fonctionnement d'Ikaros.....	33
Figure 24 : Expression d'Ikaros dans l'hématopoïèse.....	35
Table 1 : Caractéristiques des lignées murines déficientes en Ikaros.....	36



## *Sommaire des Figures et Tableaux*

Table 1 suite : Caractéristiques des lignées murines déficientes en Ikaros.....	37
Figure 25 : Représentation des différents types de mutations touchant Ikaros et entraînant une LAL-B.....	39
Table 2 : Etudes évaluant le statut d'Ikaros dans les LAL-T.....	40
Table 3 : Représentation de différentes pathologies humaines impliquant les facteurs de la famille Ikaros.....	41
Table 4 : Gènes associés avec le lupus érythémateux disséminé.....	43
Figure 26 : Médicaments ciblant la voie T <sub>H</sub> 17 et leur utilisation dans les pathologies.....	47
Figure 27 : Rôle des cellules T <sub>H</sub> 17 dans l'immunité tumorale.....	50

### **3. RESULTATS**

Figure 28 : Ikaros se fixe sur le promoteur de <i>ROR gamma t</i> dans les thymocytes WT.....	68
Figure 29 : Les souris <i>Ik<sup>Lo</sup></i> présentent un phénotype déficitaire pour la formation des ganglions.....	68
Figure 30 : Ikaros augmente l'expression de ROR $\gamma$ t après translocation dans le noyau.....	69
Figure 31 : Vérification de la délétion d'Ikaros dans les modèles murins.....	70
Figure 32 : Les cellules déficientes en Ikaros ont un défaut d'expression de ROR $\gamma$ t.....	72
Figure 33 : Les cellules déficientes en Ikaros n'expriment pas d'IL-17A.....	73
Figure 34 : L'ajout d'anticorps bloquants ne permet pas la génération de lymphocytes T <sub>H</sub> 17 en absence d'Ikaros.....	74
Figure 35 : Les cellules déficientes en Ikaros n'expriment pas FoxP3.....	75
Figure 36 : La délétion d'Ikaros régule l'expression de nombreux gènes importants dans la différenciation en LT <sub>H</sub> 17.....	76
Figure 37 : La délétion d'Ikaros entraîne une augmentation de l'expression des gènes pathogéniques.....	77
Figure 38 : L'absence d'Ikaros dérégule l'expression des gènes différenciellement.....	79
Figure 39 : La délétion d'Ikaros augmente l'expression de GM-CSF en conditions de cultures régulatrices.....	80
Figure 40 : Les cellules exprimant GM-CSF expriment également ROR $\gamma$ t mais n'expriment pas IL-17A.....	81
Figure 41 : TGF- $\beta$ 3 a le même effet sur les cellules déficientes en Ikaros que TGF- $\beta$ 1.....	81
Figure 42 : La culture en condition pathogénique a le même impact sur l'expression de ROR $\gamma$ t que la culture en condition régulatrice.....	82

## Sommaire des Figures et Tableaux

Figure 43 : Les cellules déficientes en Ikaros expriment GM-CSF et ROR $\gamma$ t, mais n'expriment pas IL-17A.....	83
Figure 44 : L'expression de GM-CSF ne dépend pas du sérum.....	84
Figure 45 : Les cellules exprimant GM-CSF prolifèrent moins que les cellules exprimant IL-17A.....	85
Figure 46 : Les cellules déficientes en Ikaros expriment la signature des lymphocytes T <sub>H</sub> GM-CSF.....	86
Figure 47 : Les cellules déficientes en Ikaros ne semblent pas être des lymphocytes T <sub>H</sub> GM-CSF.....	87
Figure 48 : Le phénotype des cellules Ik <sup>ko</sup> dépend d'un facteur intrinsèque.....	88
Figure 49 : Les cellules déficientes en Ikaros entrent plus fortement en apoptose.....	89
Figure 50 : Ikaros régule de manière indirecte la plupart des gènes de la signature pathogénique.....	91
Figure 51 : L'expression d'Ikaros est modulée au cours de la différenciation T <sub>H</sub> 17.....	92
Figure 52 : La délétion d'Ikaros n'augmente pas l'expression de GM-CSF <i>ex vivo</i> , mais augmente le pourcentage de cellules Treg.....	93
Figure 53 : Les voies de signalisation de l'IL-6 et du récepteur des cellules T ne semblent pas affectées en absence d'Ikaros.....	94
Schéma bilan.....	96

# **1. Les cellules de la lignée lymphoïde**

## **1.1 Préambule**

Le système hématopoïétique murin est un modèle de développement pouvant s'auto-renouveler et générer les cellules hématopoïétiques tout au long de la vie. Les cellules hématopoïétiques correspondent à toutes les cellules du sang et du système immunitaire. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont à l'origine de la formation des cellules sanguines. Elles se développent et prolifèrent au niveau de la moelle osseuse, qui leur apporte les facteurs nécessaires à leur développement et à leur différenciation.

Les CSH sont à l'origine de la formation de progéniteurs lymphoïdes : les progéniteurs lymphoïdes commun ou CLP (*Kondo et al.*, 1997 ; *Krantz*, 2002). Les CLP donnent les cellules T, B, ou NK (cellules Natural Killer), ainsi que les cellules dendritiques et les cellules lymphoïdes innées. Ces cellules ont pour fonction de nous protéger contre différentes infections provoquées par des pathogènes comme les bactéries, les virus, ou encore les champignons. Elles vont sécréter des facteurs, comme des cytokines, ou des chimiokines permettant le recrutement des cellules du système immunitaire sur le lieu de l'infection, ou au niveau des organes lymphoïdes secondaires comme les ganglions, afin de produire une réponse adaptée au type d'infection.

Tout au long de ce manuscrit, je vais m'intéresser plus particulièrement aux lymphocytes TCD4<sup>+</sup> qui sont le sujet de ma thèse.

## **1.2 Les cellules lymphoïdes**

### **1.2.1 Les cellules dendritiques**

Les cellules dendritiques expriment toutes l'intégrine CD11c. Les cellules dendritiques immatures sont circulantes et elles vont entrer dans les tissus périphériques pour ingérer les antigènes par phagocytose. Cette étape permettra l'achèvement de leur maturation, permettant ainsi une migration vers les organes lymphoïdes, dans lesquels elles pourront activer les lymphocytes T (LT) spécifique de l'antigène. Il existe différents types de cellules dendritiques : les cellules dendritiques conventionnelles (cDC) qui sont toutes des cellules présentatrices d'antigène (CPA) professionnelles. Cette population de cellules dendritiques exprime des marqueurs de surface caractéristiques comme le CD11b ou le CD8 $\alpha$  (*Vremec et al.*, 2000 ; *Wu et al.*, 1996). Il existe aussi les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) qui se distinguent

par l'expression de B220 et CD317 (*Grouard et al., 1997*). Ce sont aussi des CPA qui ont été caractérisées comme productrices d'interféron (IFN)  $\alpha$  et  $\beta$ .

### 1.2.2 Les lymphocytes B

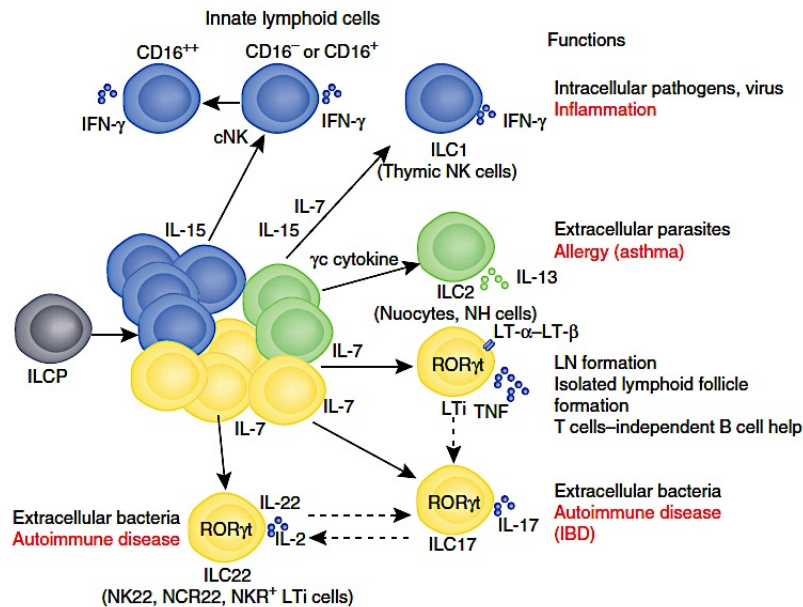
Les lymphocytes B (LB) immatures se développent au niveau de la moelle osseuse avant de migrer dans les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions...), afin de devenir des cellules B matures (*Hardy et al., 2007*). Les LB reconnaissent les antigènes grâce à des immunoglobulines (Ig) de surface appelées anticorps (Ac). Chaque LB produira un Ac spécifique d'un antigène. Les Ig fixées à la membrane servent de récepteur pour l'antigène et sont appelées récepteur des cellules B (BCR). Ces mêmes Ig seront produites et sécrétées sous forme d'Ac circulants par les LB matures appelés plasmocytes. Cette sécrétion permettra la neutralisation des antigènes cibles, puis la destruction du pathogène par deux mécanismes : l'opsonisation, ou l'activation du complément permettant la lyse de l'antigène cible.

De nombreux FT sont connus pour être indispensables à la génération des LB matures. Entre autres, les protéines E2A, Pax5 et Ikaros sont nécessaires. En effet, des souris déficientes pour E2A, Pax5 ou pour Ikaros ne développent aucun LB mature (*Bain et al., 1997 ; Urbanek et al., 1994 ; Kirstetter et al., 2002*).

### 1.2.3 Les cellules lymphoïdes innées

Les cellules lymphoïdes innées (ILC) ont la capacité d'exprimer les mêmes cytokines que les populations T auxiliaires, et de ce fait, peuvent effectuer les mêmes rôles que ces dernières (*Spits and Di Santo, 2011*). Tout comme les LT auxiliaires, les ILC dérivent du CLP qui donnera par la suite un progéniteur commun aux ILC (ICLP) grâce à l'expression du facteur de transcription PLZF (promyelocytic leukaemia zinc finger) et dépendent de la voie Id2 (Inhibiteur de la différenciation). Ce ICLP donnera naissance à plusieurs sous-populations cellulaires en fonction de l'environnement cytokinique dans lequel il se trouvera (**Figure 1**). Ainsi les ILC peuvent être groupées en trois famille : les ILC1, les ILC2 et les ILC3. Le groupe des ILC1 contient les cellules NK, naturellement cytotoxiques et importantes dans l'élimination des cellules tumorales ainsi que dans la réponse immunitaire contre les virus. Ce groupe contient aussi les cellules ILC1 exprimant l'IFN- $\gamma$ . Ces dernières nous protègent contre les infections virales et contre les bactéries intracellulaires (comme les LT<sub>H1</sub>), et leur activité est augmentée en présence d'IL-12 et d'IL-18. Le groupe des ILC2 contient les ILC2 (aussi appelées nuocytes) et produisant de l'IL-13. Elles se différencient sous l'influence de l'IL-25

et de l'IL-33. Les ILC2 (comme les  $LT_{H2}$ ) sont impliquées dans la lutte contre les parasites extracellulaires. La branche ILC3 contient des cellules exprimant le facteur de transcription  $ROR\gamma t$ . Ce groupe inclue les cellules inductrices des tissus lymphoïdes ( $LT_i$ ), les ILC17 et les ILC22. Toutes ces cellules ont besoin de l'IL-7 pour leur développement.



**Figure 1: Diversification des cellules lymphoïdes innées.** Adapté de *Spits et Di Santo, 2010*. La figure présente un schéma de différenciation des ILC à partir d'un progéniteur commun (ILCP). Les cytokines nécessaires à la différenciation de la sous-population est présentée. Chaque sous-population d'ILC produit des cytokines représentées sur le schéma, ainsi que leur rôle dans la défense immunitaire, ou dans l'induction de maladies auto-immunes. ILCP – Innate Lymphoid Common Progenitor, NK – Natural Killer ; NH – Natural Helper,  $LT\alpha$  or  $\beta$  - Lymphotoxin  $\alpha$  or  $\beta$ .

#### 1.2.4 Les lymphocytes T

Lors de la réponse immunitaire adaptative, les  $LT$  naïfs vont être activés afin de se différencier en  $LT$  auxiliaires  $CD4^+$  ( $LT_H$ ) ou cytotoxiques  $CD8^+$  ( $LT_C$ ). Les  $LT_C$  sont activés par des antigènes endogènes présentés sur le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I), alors que les  $LT_H$  sont activés par un peptide exogène présenté par le CMH-II. Les  $LT_C$  activés détruisent les cellules tumorales, ou les cellules infectées par une action cytotoxique mettant en jeu une apoptose déclenchée par les perforines et les granzymes. Les  $LT_H$  agissent plus en tant que régulateurs du système immunitaire. Les cytokines sécrétées par les  $LT_H$  moduleront l'activité de cellules cibles, et chaque cytokine sera sécrétée par un type spécifique de  $LT_H$ . La décision sur la voie empruntée par les descendants des  $LT$  naïfs dépend des cytokines présentes dans le milieu lors de l'expansion clonale et de la différenciation, mais aussi de l'affinité du complexe TCR/CMH et des molécules de costimulation. La différenciation de ces cellules sera abordée plus en détail dans le point suivant.

## 2. Le compartiment lymphoïde T

Le développement des lymphocytes T au niveau du thymus est un processus finement régulé. La caractérisation des progéniteurs de la lignée T a permis de comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires qui contrôlent l'engagement vers cette lignée. Les précurseurs des LT migrent de la moelle osseuse vers le thymus où le récepteur des cellules T (TCR) sera réarrangé. Le TCR composé d'une chaîne  $\alpha$  et  $\beta$ , et compatible avec les molécules du soi portées par le CMH, transmettra un signal de survie en interagissant avec l'épithélium thymique, permettant la sélection positive des cellules. Les récepteurs reconnaissant les molécules du soi, quant à eux, conduiront à la mort cellulaire et à l'élimination grâce à un mécanisme de sélection négative. Les cellules T survivantes arriveront à maturité et quitteront le thymus afin d'aller en périphérie. Elles migreront via le sang dans les organes lymphoïdes périphériques, afin d'y être activées si elles reconnaissent une APC présentant un antigène étranger qui leur est spécifique. Cette activation aboutit à l'expansion clonale du LT, puis à sa différenciation en LT effecteur. Ces lymphocytes effecteurs sont attirés vers les sites d'inflammation afin d'activer les macrophages, ou de détruire les cellules infectées. D'autres LT effecteurs seront recrutés dans les zones riches en LB afin d'activer la réponse humorale.

### 2.1 De la moelle osseuse au thymus

Les LT dérivent des CSH présentes dans la moelle osseuse, et possédant le potentiel de donner les lignées cellulaires sanguines. Les précurseurs hématopoïétiques les plus immatures au niveau de la moelle osseuse ont un phénotype dit LSK, négatif pour les marqueurs de lignage (Lin), mais positif pour Sca-1 et c-Kit (*Ikuta and Weissman, 1992 ; Spangrude et al., 1988*). Les cellules LSK n'exprimant pas Flt-3, un récepteur de cytokine aussi appelé CD135, peuvent encore s'auto-renouveler. Par contre, celles qui expriment Flt-3 sont appelées progéniteur multipotent (MPP), car elles ne peuvent plus se renouveler, mais elles deviennent des précurseurs lymphoïdes précoces (*Igarashi et al., 2002*). De ce fait, l'existence de ces cellules montre une spécialisation vers la lignée lymphoïde très précoce dans l'hématopoïèse. A terme, ces précurseurs lymphoïdes précoces vont aboutir à la formation de précurseurs lymphoïdes communs qui possèdent un potentiel de différenciation en LB ou en LT (*Kondo et al., 1997*). Les CLP expriment fortement la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-7 et Flt-3, et proviennent de MPP ayant exprimé le FT Ikaros (*Allman et al., 2003*) et qui ont reçu un signal via Flt-3 (*Sitnicka et al., 2003*).

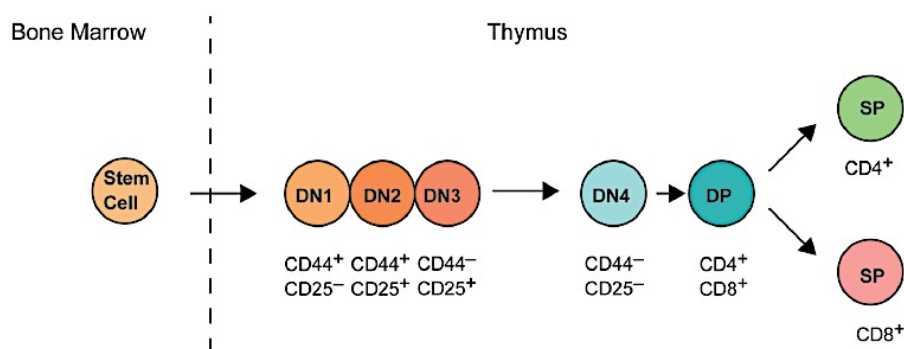
Enfin, Notch1 est nécessaire au développement des LT dans le thymus. De ce fait, les précurseurs doivent être capable d'exprimer Notch1 et de répondre à son signal (*Radke et al.*, 1999). L'expression constitutive d'un récepteur Notch activé dans la moelle osseuse aboutit à un développement ectopique de LT (*Pui et al.*, 1999) soulignant l'importance de la voie de signalisation Notch dans le développement des LT.

## 2.2 Développement et maturation des lymphocytes T dans le thymus

### 2.2.1 Les différents marqueurs de la différenciation

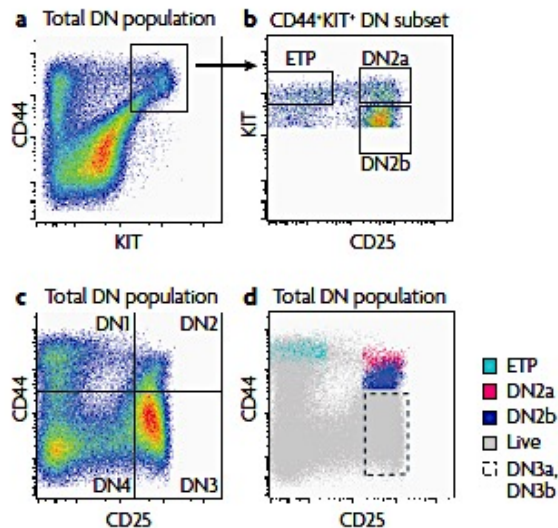
Les étapes du développement des thymocytes ont lieu dans le thymus et induisent des recombinaisons au niveau des gènes codant le récepteur des cellules T (TCR), ainsi que des changements au niveau de l'expression des protéines de surface comme celles du complexe CD3, mais aussi celles des co-récepteurs CD4 et CD8. Les lymphocytes immatures CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> (aussi appelés DN) se différencient en thymocytes CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> (aussi appelés DP) avant d'évoluer vers le stade CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> ou CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup> (appelés SP). Comme le montre les figures 2 et 3, les cellules DN sont subdivisées en quatre populations définies par l'expression des marqueurs CD44 et CD25 (*Godfrey et al.*, 1993), et peuvent être suivies par cytométrie de flux.

Néanmoins, les quatre populations DN ont été affinées. De ce fait, par exemple la population DN1 a été subdivisée en populations DN1a-DN1e, mais aussi la population DN3 en DN3a et DN3b (*Porritt et al.*, 2004 ; *Taghon et al.*, 2006).



**Figure 2: Marqueurs phénotypiques caractérisant les différentes sous-populations DN.**

Adapté de *Ohsugi*, 2013. Les cellules sont représentées de gauche à droite dans l'ordre de maturation. Les marqueurs exprimés sont représentés sous chaque cellule. DN – Double négative, DP – Double positive, SP – Simple positive. DN1 : CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>; DN2 : CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>; DN3 : CD44<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>; DN4 : CD44<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>; DP: CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>; SP: CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> ou CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>.



**Figure 3: Marqueurs phénotypiques détectés par cytométrie de flux (Rothenberg et al., 2008).**

a. Profil d'expression en cytométrie de flux de CD44 et cKit de thymocytes DN d'une souris adulte.

b. Profil d'expression de cKit et CD25 des DN CD44+ cKit+ permettant de distinguer les progéniteurs des DN2.

c. Profil d'expression de CD44 et de CD25 des cellules DN permettant d'identifier les populations DN1, DN2, DN3 et DN4.

d. Localisation des cellules progénitrices, DN2 et DN3 par l'expression de CD44 et de CD25.

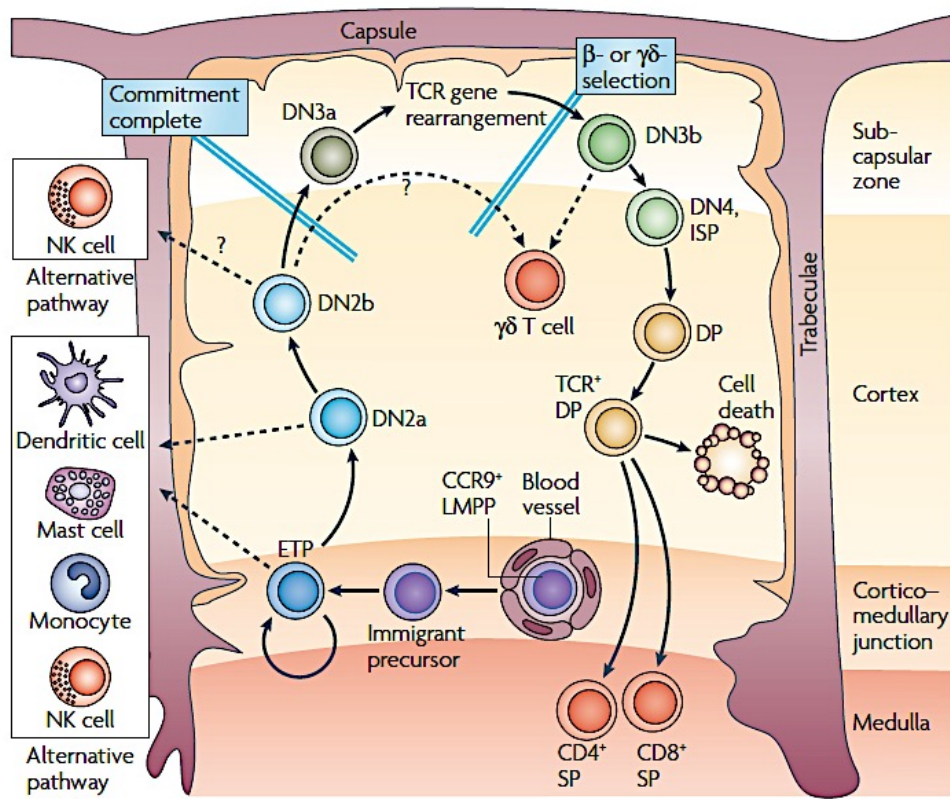
### 2.2.2 Développement des cellules T dans le thymus

Les progéniteurs thymiques (ETP) ayant migré dans le thymus vont initier la maturation des thymocytes (**Figure 4**). Ces progéniteurs vont permettre la formation de la sous-population DN1 qui n'exprime ni CD4, ni CD8, mais CD44. La sous-population DN2 se formera grâce à l'expression de différents gènes dont *Rag-1* et *Rag-2* (Gène activant la recombinaison) induisant le réarrangement des gènes impliqués dans la formation du TCR, et de CD3. Finalement, cette population de cellules DN2 permet l'engagement vers la lignée T et ce processus sera achevé au stade DN3 (Masuda et al., 2007 ; Taghon et al., 2006). La maturation et le passage au stade DN4 est aussi accompagné de changements au niveau de l'expression des gènes, dont la dérégulation du récepteur c-Kit qui était exprimé jusqu'à présent et important pour le développement des thymocytes.

Au stade DN3, la prolifération s'arrête permettant le réarrangement des gènes V(D)J du TCR afin de former le premier locus complet réarrangé du TCR $\beta$  (cela s'effectue aussi avec les chaînes  $\gamma$  et/ou  $\delta$ ). Les cellules restent à ce stade jusqu'à ce que le locus  $\beta$  soit correctement réarrangé. Les cellules avec un TCR $\beta$  non-fonctionnel meurent rapidement. Pour les autres cellules, la chaîne  $\beta$  exprimée s'apparie avec une chaîne auxiliaire (cellule pré-T  $\alpha$ ). Ce récepteur sera exprimé à la surface cellulaire avec le CD3 permettant la signalisation au niveau des LT. Ceci aboutit à la prolifération des cellules et à l'expression de CD4 et de CD8 permettant d'obtenir des cellules double-positives (DP). Les cellules DP vont arrêter de proliférer afin de réarranger le locus de la chaîne  $\alpha$  pour passer les étapes de sélection positive et négative. Les cellules ayant passé ces étapes de sélection donneront les cellules matures simples positives (CD4+ ou CD8+) (**Figure 4**). Par la suite, ces cellules migreront dans les



organes lymphoïdes secondaires afin d'y effectuer leurs fonctions (Ciofani and Zuniga-Pflücker, 2010).

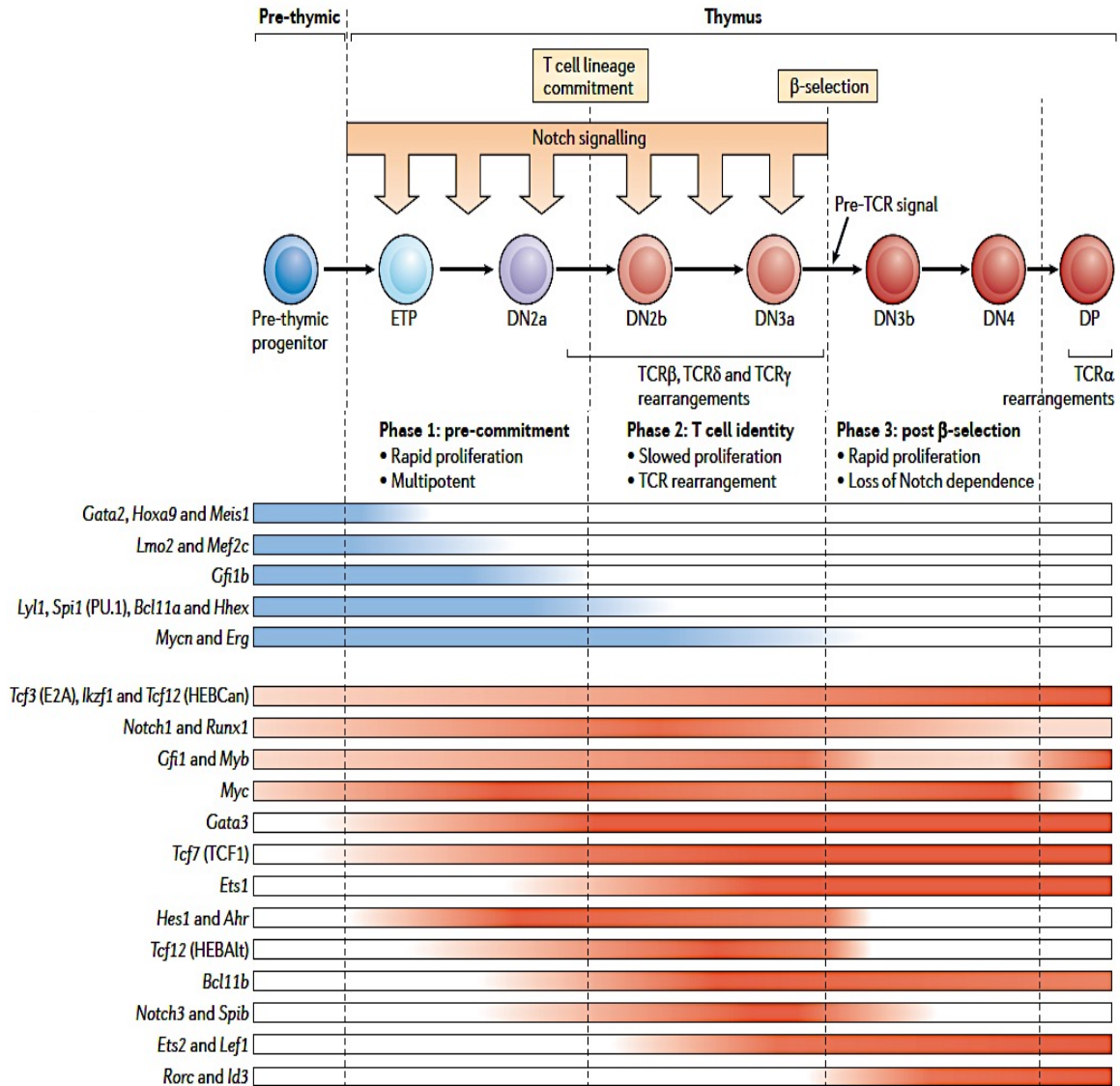


**Figure 4: Représentation du développement des cellules T dans le thymus (Rothenberg et al., 2008).** Le thymus est divisé en deux régions distinctes : le cortex et la médulla, dans lesquelles se différencient les thymocytes. Les progéniteurs thymiques (ETP) entrent dans le thymus depuis le vaisseau sanguin au niveau de la jonction cortico-médullaire. Les ETP ont toujours la capacité de se différencier en plusieurs lignées hématopoïétiques dans le thymus, mais ils la perdent au stade DN2/3. Les stades de différenciation sont associés à la localisation du thymocyte dans le thymus, la maturation des cellules DN ayant lieu dans le cortex, avec une accumulation des cellules DN3 à l'extrémité du thymus, et celle des cellules DP dans la zone médullaire.

### 2.2.3 Voies de signalisation et gènes gouvernant le développement des lymphocytes T

Sur les dernières années, un pool de facteurs régulateurs a été identifié lors du développement des lymphocytes T. Ce développement dépend fortement de facteurs de transcription qui ont une expression définie en fonction du stade de différenciation dans lequel se situe le LT. Comme je l'ai mentionné en 2.1, la voie Notch est essentielle pour le développement des lymphocytes T ainsi que pour leur différenciation. En effet, en absence de Notch1, le développement des thymocytes est bloqué (Radke et al., 1999). La voie de signalisation Notch influence la spécification entre la voie lymphoïde ou la voie myéloïde des progéniteurs précoces (Pui et al., 1999). De plus, d'autres facteurs ont été décrit par Yui and Rothenberg en 2014 (Figure 5). La plupart de ces gènes sont importants pour le développement

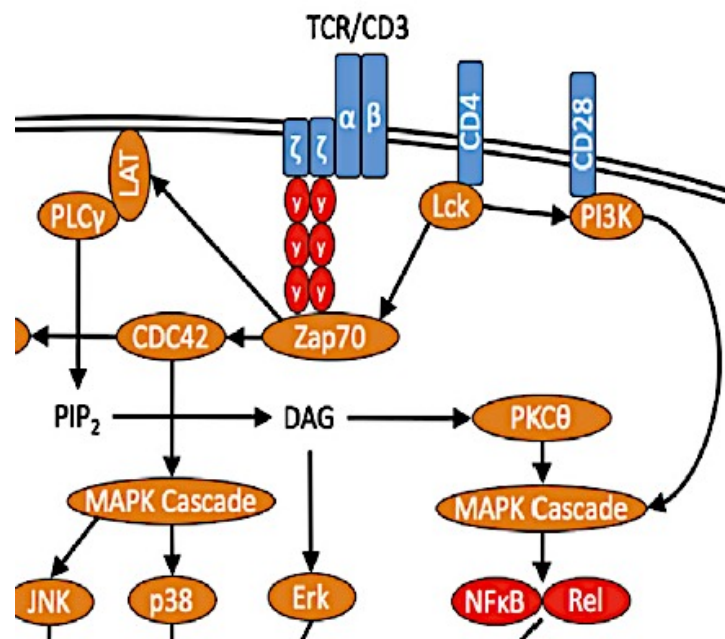
des LT, car leur inactivation ou leur sur-expression dans des modèles murins abouti à des effets dramatiques sur le processus de maturation (*Yui and Rothenberg, 2014*).



**Figure 5: Expression des facteurs de transcription au cours du développement des thymocytes.** Adapté de *Yui and Rothenberg, 2014*. Les facteurs de transcription représentés en bleu sont exprimés dans les progéniteurs et dans les précurseurs thymiques, et sont responsables de la mise en place de la lignée T (Phase 1). Un autre groupe représenté en rouge regroupe les gènes importants lors de l'établissement de l'identité des cellules T et permettant les différentes étapes de maturation. Ces gènes sont surtout important lors du réarrangement du TCR (phase 2). Après la  $\beta$ -sélection, des gènes spécifiques contrôlent la prolifération rapide, ainsi que la perte de dépendance à la voie de signalisation Notch (Phase 3). Finalement, l'expression croissante de CD4 et CD8 est contrôlée et suivie par un arrêt de la prolifération nécessaire pour le réarrangement de la chaîne  $\alpha$  du TCR.

### 2.3 Activation des lymphocytes T

L'activation des lymphocytes nécessite deux signaux pour être efficace (*Lafferty and Cunningham, 1975*). Le premier signal est induit par le complexe TCR/peptide permettant la transduction du signal par la molécule CD3, via des motifs ITAM pouvant être phosphorylés par la tyrosine kinase Lck (**Figure 6**). Cette dernière est associée à CD4 ou CD8 de manière intracellulaire, et pourra phosphoryler CD3 après la reconnaissance initiale TCR/p-CMH/co-récepteur (*Malissen et al., 2014*). Ceci est suivi par l'activation de Zap70 qui est une tyrosine kinase qui phosphoryle le domaine intracellulaire de la protéine Lat (*Roncagalli et al., 2014*). Cela conduit à une cascade d'événements de signalisation entraînant la transcription de facteurs indispensables pour le maintien de la prolifération des LT. L'activation des lymphocytes T uniquement via le TCR conduit à des cellules anergiques (*Jenkins and Schwartz, 1987*). De ce fait, un signal supplémentaire est nécessaire pour une activation complète des LT en conditions physiologiques. La co-stimulation la plus connue est celle impliquant CD28 sur les cellules T et la protéine B7 (aussi appelée CD80 ou CD86) sur l'APC (*June et al., 1987 ; Linsley et al., 1990*). Néanmoins, l'activation des LT peut être inhibée par CTLA4 (Cytotoxic Lymphocyte-



**Figure 6: Voie de signalisation du TCR.** Adapté de *van Panhuys, 2016*. Le CD4 ou le CD8 reconnaissant le complexe formé par le peptide présenté par le CMH-I ou CMH-II est associé à la tyrosine kinase Lck. Cette fixation associée à la reconnaissance du peptide par le TCR entraîne la phosphorylation du CD3 par Lck. Ceci permet le recrutement de Zap70 qui phosphorylera à son tour des résidus intracellulaires contenus sur Lat, et permettant la diversification du signal et son amplification. Finalement, les cellules seront aussi activées par des cytokines sécrétées par les APC (IL-12, IL-4) ou par l'environnement cellulaire qui permettra de stimuler la différenciation en un type de lymphocyte T auxiliaire.

Associated Protein) qui possède une plus grande affinité pour la protéine B7 (*Linsley et al.*, 1990). PD-1 et son récepteur est aussi connu pour être un inhibiteur de l'activation des LT (*Freeman et al.*, 2000 ; *Okazaki et al.*, 2002).

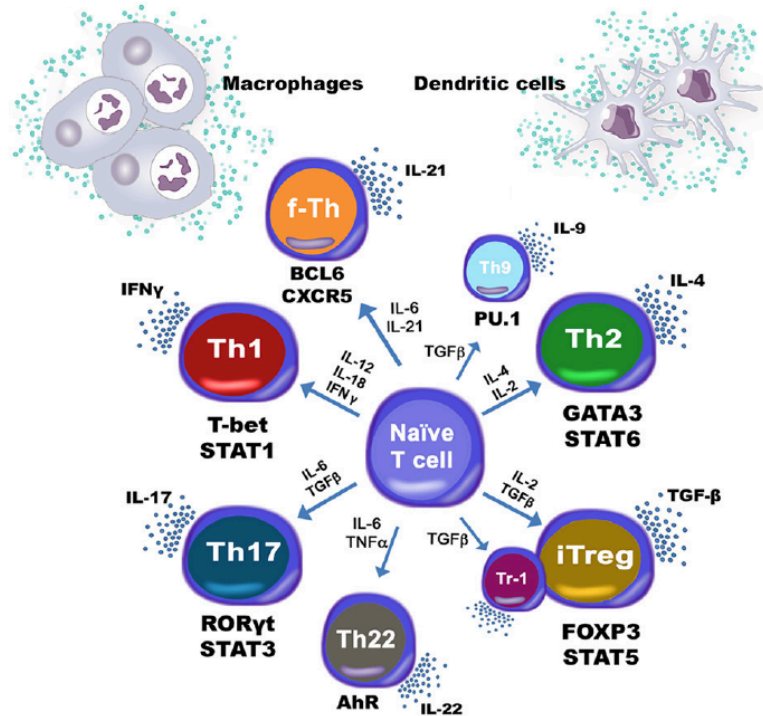
## 2.4 Diversification des lymphocytes T

Après la maturation des LT, une stimulation supplémentaire permet à ces derniers d'acquérir une activité différente et des fonctions telles que la cytotoxicité ou la production des cytokines variées.

Les LTCD8<sup>+</sup> reconnaissent des antigènes présentés par le CMH-I et se diversifient en une sous-population appelée LT cytotoxiques, en référence aux molécules sécrétées induisant la lyse des cellules cibles. Les LTCD8<sup>+</sup> sont décrits grâce aux marqueurs de surfaces qu'ils expriment et à leur fonction, et jouent un rôle dans la destruction directe des cellules infectées ou tumorales (*Shrikant et al.*, 2010).

Les LTCD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> ont une durée de vie courte, néanmoins, certains lymphocytes dits mémoires persistent plus longtemps après une infection. Ces cellules peuvent se maintenir plusieurs années dans les organes lymphoïdes ainsi que dans les tissus périphériques et pourront répondre plus rapidement lors d'une nouvelle infection par le même antigène (*Broere et al.*, 2011 ; *Luckheeram et al.*, 2012).

Les LT naïfs expriment les marqueurs de surface CD44<sup>+</sup>CD45R(B)<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> (*Desbarats et al.*, 1999) et sont activés après avoir reconnu un antigène présenté par une cellule présentatrice d'antigène. Ils subiront un programme de différenciation en fonction de l'environnement cytokinique dans lequel ils se trouveront. Les cytokines présentes activeront des voies de signalisation spécifiques, et qui détermineront le programme de différenciation. Les LTCD4<sup>+</sup> naïfs peuvent se différencier en lymphocytes T<sub>H</sub>1, ou T<sub>H</sub>2, ou T<sub>H</sub>9, ou T<sub>H</sub>17 ou Treg. Ils peuvent aussi donner lieu à des lymphocytes T folliculaires (T<sub>fh</sub>) (*Zhou et al.*, 2009) (**Figure 7**).



**Figure 7: Diversification des lymphocytes TCD4<sup>+</sup>.** Adapté de *Carbo et al.*, 2014. La figure présente un schéma de différenciation des LTCD4<sup>+</sup> naïfs en LT auxiliaires. Les cytokines nécessaires à la différenciation des sous-populations (représentées sur les flèches bleues), ainsi que le facteur de transcription essentiel au développement (indiqués en-dessous de chaque cellule) sont présentés. Chaque sous-population de LT auxiliaires produit des cytokines qui sont représentées à côté des cellules. La différenciation est médiée entre autres par les cytokines sécrétées par les macrophages et les cellules dendritiques. Cellules T auxiliaires de type 1 (T<sub>H</sub>1), de type 2 (T<sub>H</sub>2), de type 9 (T<sub>H</sub>9), de type 17 (T<sub>H</sub>17), de type 22 (T<sub>H</sub>22), cellules T folliculaires (f-Th), cellules T régulatrices induites (iTreg) et de type 1 (Tr-1). ROR $\gamma$ t – Retinoic-Acid Orphan Nuclear Receptor  $\gamma$ t, TGF – Transforming Growth Factor, TNF – Tumor Necrosis Factor, STAT – Signal Transducer and Activator of Transcription, AhR – Aryl Hydrocarbon Receptor, BCL6 – B Cell Lymphoma 6.

- Les lymphocytes T<sub>H</sub>1 activent les macrophages et produisent majoritairement de l'interleukine (IL)-2 et de l'IFN- $\gamma$ . Ces cellules ont besoin de l'expression du facteur de transcription (FT) T-bet (*Szabo et al.*, 2000 ; *Zhou et al.*, 2009) et sont les médiateurs de la réponse cellulaire (Réponse impliquant également les LTc).

- Les lymphocytes T<sub>H</sub>2 activent les lymphocytes B (LB) et produisent majoritairement de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-6. Ces cellules ont besoin de l'expression du FT GATA-3 (*Zheng and Flavell*, 1997) et sont les médiateurs de la réponse humorale (Réponse impliquant la production d'anticorps par les LB différenciés en plasmocytes).

- Les lymphocytes T<sub>H</sub>17 (*Park et al.*, 2005 ; *Harrington et al.*, 2006) activent les neutrophiles et ont un rôle majeur dans l'inflammation. Elles produisent de l'IL-17 et de l'IL-22 (*Chen et al.*, 2007) permettant une réponse contre les bactéries extracellulaires et contre les

champignons, et ont besoin de l'expression du FT ROR $\gamma$ t (*Ivanov et al.*, 2006). Elles se situent essentiellement au niveau de la lamina propria du petit intestin.

- Les lymphocytes T<sub>H</sub>9 ont été décrites comme cellules productrices d'IL-9 (*Veldhoen et al.*, 2008 ; *Dardalhon et al.*, 2008) et requièrent le facteur de croissance TGF- $\beta$ , ainsi que l'IL-4 pour se différencier. Les LT<sub>H</sub>9 sont impliqués dans la lutte contre les parasites, et plus récemment, ont montré un rôle dans la lutte contre le cancer grâce aux cytokines sécrétées (*Vegran et al.*, 2015).

- Les lymphocytes T régulateurs (Treg) produisent de l'IL-10 et ont besoin du facteur de croissance TGF- $\beta$  en fortes concentrations pour se différencier. Ces cellules jouent un rôle dans l'auto-immunité en supprimant les LT auto-réactifs, et permettent de moduler la réponse immunitaire en inhibant la prolifération des autres lymphocytes T auxiliaires (*Bettelli et al.*, 2006).

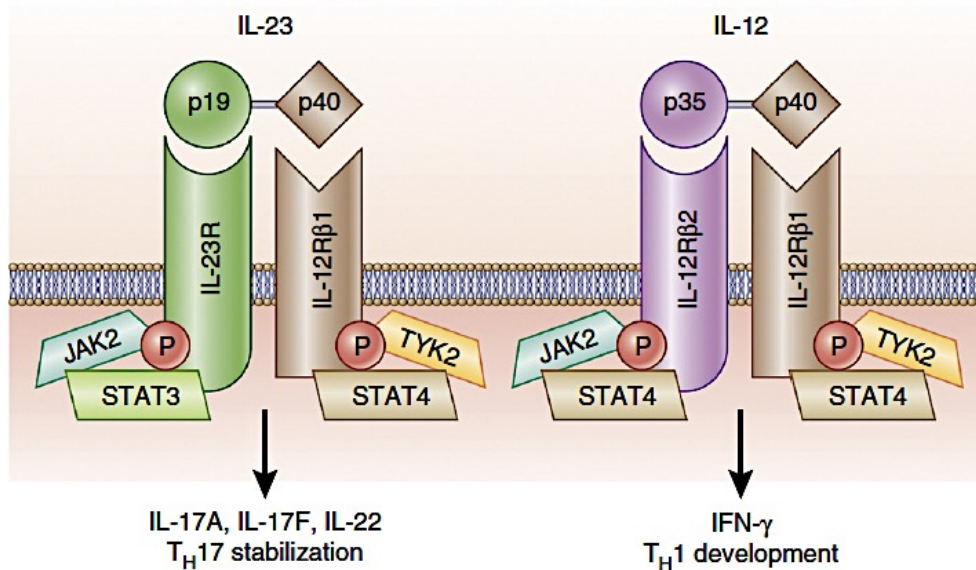
- Les lymphocytes T folliculaires (T<sub>H</sub>) se situent principalement au niveau des centres germinatifs, où ils vont permettre aux LB d'effectuer la maturation d'affinité ainsi que le changement de classe des anticorps. Les T<sub>H</sub> sont caractérisés par l'expression de l'IL-21, ainsi que le FT Bcl-6 et les récepteurs de surface CXCR-5 et PD-1 (*Crotty*, 2011).

- Les lymphocytes T<sub>H</sub>GM-CSF sont une population récemment décrite exprimant spécifiquement du GM-CSF et de l'IL-3. Cette population requiert de l'IL-7 pour se différencier via l'activation du FT STAT-5 (*Sheng et al.*, 2014).

### 3. Les lymphocytes T<sub>H</sub>17

#### 3.1 Découverte des lymphocytes T<sub>H</sub>17

Le modèle de lymphocytes auxiliaires a été instauré en 1986 par Mossman et Coffman (*Mossman et al.*, 1986, *Coffman and Carty*, 1986), dans lequel ils ont proposé l'existence de populations permettant la mise en place d'une réponse inflammatoire (via les LT<sub>H</sub>1), ou une réponse permettant l'activation des LB (via les LT<sub>H</sub>2). Ce modèle est resté en vigueur de nombreuses années, et avec celui-ci, le fait que les LT<sub>H</sub>1 soient responsables de l'induction des maladies auto-immunes (MAI) via l'expression d'IFN- $\gamma$ . Cette sous-population est dépendante de l'IL-12, qui permet l'activation du FT T-bet (décrit en 2.4 Figure 7) et l'expression d'IFN- $\gamma$ . L'IL-12 est composée de deux sous-unités, notées p35 et p40 qui s'associent pour former un hétéro-dimère, et permet la phosphorylation de STAT4 (Signal Transducer and Activator of Transcription) via les protéines tyrosines kinases JAK2 et TYK2 en réponse à la fixation de l'IL-12 sur son récepteur (**Figure 8**). Cependant, la délétion des lymphocytes T<sub>H</sub>1 par délétion de l'IL-12(p35), ou de l'IL-12R $\beta$ 2, ou de l'IFN- $\gamma$ R ou de STAT-1 (*Bettelli et al.*, 2004) montre un accroissement de la maladie dans plusieurs modèles auto-immuns, et remet en cause l'implication des LT<sub>H</sub>1 en tant que cellules responsables de l'induction des maladies auto-immunes. A la même période, l'IL-23 a été décrite comme partageant la sous-unité p40 avec l'IL-12 (*Oppmann et al.*, 2000). Cette cytokine est aussi un hétéro-dimère possédant la sous-unité p19 à la place de p35 (**Figure 8**). La fixation de l'IL-23 sur son récepteur (IL-23R) permet également la phosphorylation de facteurs STAT via l'activation de JAK2 et TYK2. Cependant, au contraire de l'IL-12 qui permet la dimérisation de deux facteurs STAT4 pour activer la transcription des gènes cibles, l'IL-23 permet la dimérisation de STAT3 et STAT4 initiant la transcription d'autres gènes cibles. Il a été montré que l'utilisation d'anticorps bloquant la sous-unité IL-12p40 ou IL-23p19 chez des souris permet de les rendre résistantes à certaines MAI (*Cua et al.*, 2003). Dans la continuité de ces études, il a été montré que l'IL-23 active la production d'IL-17 par les cellules T activées (*Aggarwal et al.*, 2003) et que cette cytokine induit l'expansion des lymphocytes TCD4<sup>+</sup> sécrétant de l'IL-17 (*Langrish et al.*, 2005, *Murphy et al.*, 2003).



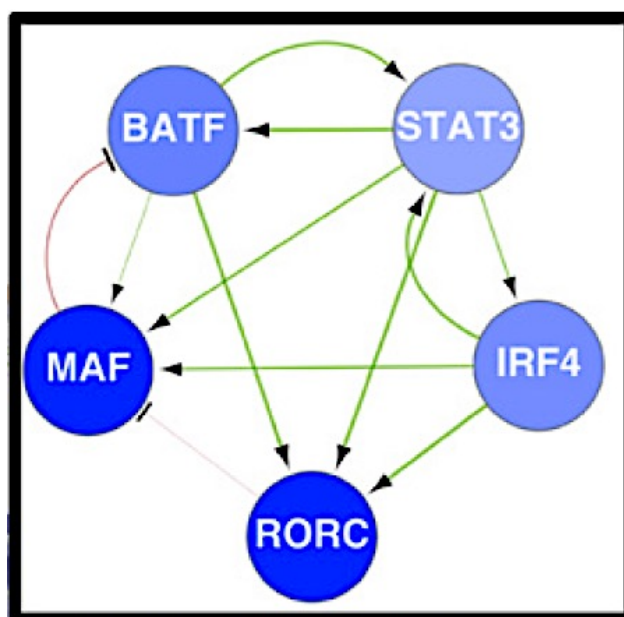
**Figure 8: Représentation schématique de l'IL-12, de l'IL-23 et de leurs récepteurs.** Adapté de Teng *et al.*, 2015. L'IL-12 est composée des sous-unités IL-12/23p40 et IL-12p35, alors que l'IL-23 contient les sous-unités IL12/23p40 et IL-23p19. Le récepteur de l'IL-12 est composé de l'IL-12Rβ2 et de l'IL-12Rβ1, alors que le récepteur de l'IL-23 contient l'IL-12Rβ1 et l'IL-23R. La liaison de l'IL-12 à son récepteur active la phosphorylation de STAT4 par JAK2 et TYK2 permettant la sécrétion d'IFN-γ par les LT<sub>H</sub>1. La liaison de l'IL-23 sur son récepteur active également la voie de signalisation JAK-STAT, mais passe par STAT3 préférentiellement afin d'activer la sécrétion d'IL-17A, d'IL-17F et d'IL-22.

## 3.2 Différenciation des lymphocytes T<sub>H</sub>17

### 3.2.1 Facteurs impliqués lors de la différenciation des lymphocytes T<sub>H</sub>17

Comme chez les LT<sub>H</sub>1 et les LT<sub>H</sub>2 régulés par T-bet et GATA-3 respectivement, les LT<sub>H</sub>17 sont régulés par l'expression du facteur de transcription RORγt, qui est le régulateur principal de la différenciation des LT<sub>H</sub>17 (Ivanov *et al.*, 2006). Néanmoins, ce FT et son expression sont régulés en amont par d'autres facteurs (Ciofani *et al.*, 2012, Yosef *et al.*, 2013). Comme le montre la figure 9, il existe une coopération entre BATF (Basic-Leucine Zipper Transcription Factor ATF-like), IRF4 (Interferon Regulatory Factor 4) et STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) lors de l'initiation de la différenciation des LT<sub>H</sub>17 pour activer la transcription du gène *Rorc*, codant pour RORγt (Brüstle *et al.*, 2007, Yang *et al.*, 2007). Ce dernier pourra participer à l'effet du complexe formé par BATF/STAT3/IRF4 de manière forte sur un pool de gènes impliqués lors de la différenciation en LT<sub>H</sub>17, comme *Il17a* ou *Il17f* ou *Il22*. RORγt sera également important pour inhiber l'expression du facteur MAF, qui est un inhibiteur de l'expression de plusieurs gènes pro-inflammatoires comme *Ccr6*, ou *Tnf*.



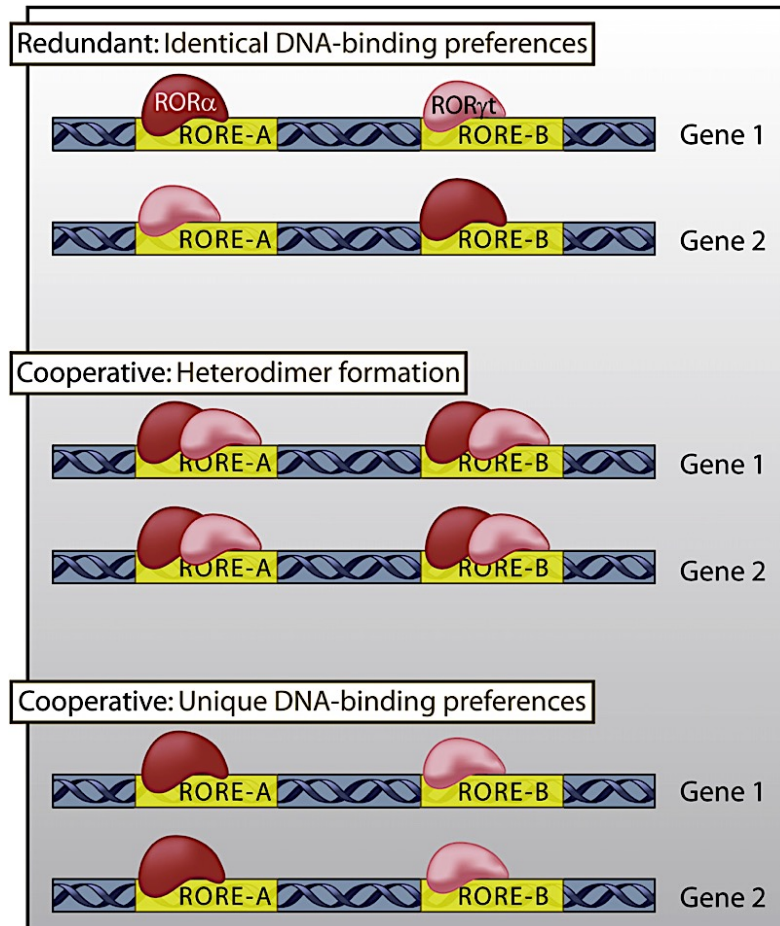


**Figure 9: Interactions des différents facteurs de transcription impliqués au cours de la différenciation des lymphocytes T<sub>H</sub>17.** Adapté de *Ciofani et al.*, 2012. Les flèches vertes montrent les interactions entre les facteurs de transcription, alors que les traits rouges représentent les effets inhibiteurs. Ainsi, le gène *Rorc* codant la protéine ROR $\gamma$ t est régulé par le complexe BATF/STAT3/IRF4. BATF - Basic-Leucine Zipper Transcription Factor ATF-like, IRF4 - Interferon Regulatory Factor 4, STAT3 – Signal transducer and Activator of transcription 3, RORC – Retinoic-Acid Related Orphan Nuclear Receptor, MAF - Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Oncogene.

Comme le montre la figure 9, il existe une boucle de régulation entre les FT BATF, STAT3 et IRF4 permettant un renforcement de leurs expressions et une inhibition de BATF par MAF permettant de réguler la réponse cellulaire. Ainsi, les cellules T<sub>H</sub>17 nécessitent une activation continue via STAT3 (*McGeachy et al.*, 2009) sous peine de se différencier en une autre sous-population auxiliaire dépendant des cytokines présentes : phénomène appelé plasticité des LT<sub>H</sub>17 (décrit plus tard dans ce manuscrit) (*Hirota et al.*, 2011, *Lee et al.*, 2009).

Depuis la description en 2006 de l'implication de ROR $\gamma$ t dans la différenciation des lymphocytes T<sub>H</sub>17, les études qui ont suivies se sont intéressées uniquement à ce facteur de transcription. Néanmoins, en 2008, *Yang et al.* ont montré que le facteur de transcription ROR $\alpha$  était aussi impliqué lors de la différenciation des LT<sub>H</sub>17. En utilisant un modèle murin déficient pour ROR $\alpha$  et ROR $\gamma$ t, les auteurs ont montré que ces souris étaient résistantes à l'EAE (un modèle mimant la sclérose en plaque humaine), alors que des souris déficientes uniquement pour l'expression de ROR $\alpha$  ou de ROR $\gamma$ t sont encore susceptibles de contracter la maladie, mais dans une moindre mesure. Deux modèles d'activation des facteurs ROR sont proposés: 1) Les facteurs ROR peuvent exercer un effet redondant sur les gènes possédant des séquences spécifiques à chacun, et contenant un élément ROR dépendant ; 2) Une coopération peut exister

entre les deux facteurs, soit par formation d'un hétérodimère se fixant sur les séquences contenant un élément ROR, soit par fixation préférentielle sur une séquence contenant un élément ROR (**Figure 10**).



**Figure 10: Modèle de fixation des facteurs de transcription ROR sur les gènes possédant une séquence RORE.** Adapté de *Sundrud and Rao, 2008*. Deux gènes possédant des éléments de réponse aux facteurs ROR distincts, RORE-A et RORE-B sont représentés. ROR $\alpha$  et ROR $\gamma$ t peuvent être redondants et fixer le même élément de réponse aux facteurs ROR (premier schéma), ou ils peuvent fixer un élément de réponse sous forme d'hétérodimère (schéma du milieu), ou ils peuvent reconnaître de manière indépendante et spécifique un élément de réponse aux facteurs ROR (schéma du bas). En réalité, chaque gène cible de ROR $\alpha$  et de ROR $\gamma$ t doit contenir chaque élément de réponses aux facteurs ROR dans son promoteur, ou dans ses régions régulatrices distales, et doit donc pouvoir être fixé de l'une ou des trois manières différentes présentées.

### 3.2.2 Différenciation des lymphocytes T<sub>H</sub>17 murins

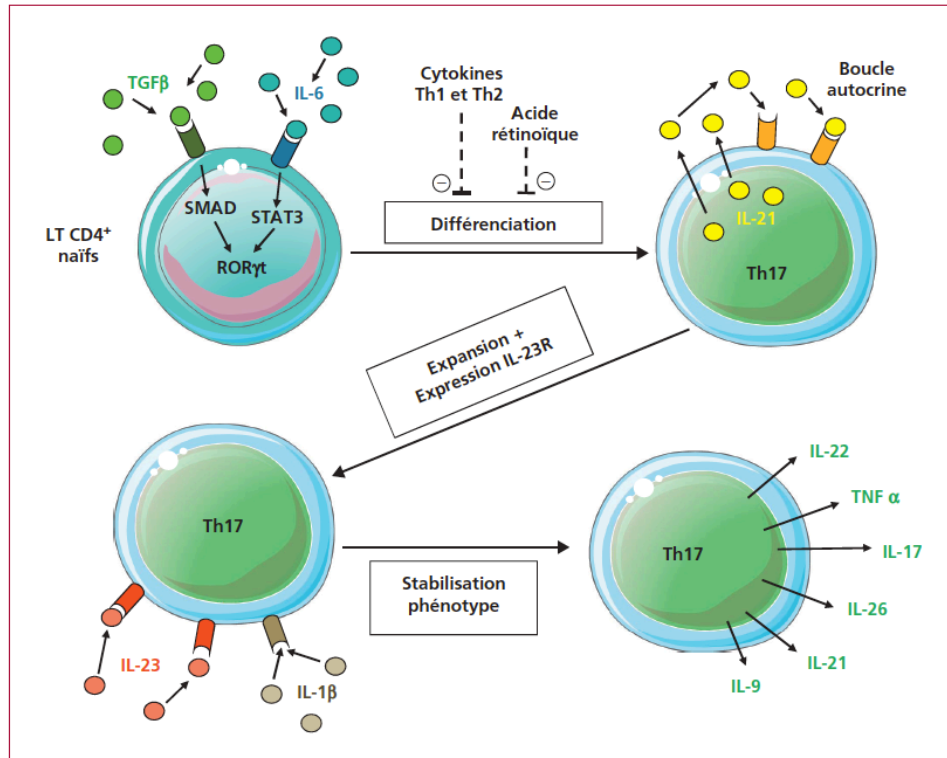
Dans la continuité des recherches effectuées sur l'IL-23, deux équipes ont montré qu'en absence d'IFN- $\gamma$  et d'IL-4, cette cytokine pouvait augmenter l'expression d'IL-17A dans des cellules différenciées en LT<sub>H</sub>17 (*Harrington et al., 2005, Park et al., 2005*). Néanmoins, le récepteur de l'IL-23 n'étant pas présent sur les LTCD4 naïfs, cette cytokine ne pouvait pas être l'initiateur de la différenciation *de novo* des LT<sub>H</sub>17. Ainsi, en 2006, trois équipes ont montré

qu'en présence de TGF- $\beta$ 1 (cytokine anti-inflammatoire permettant la différenciation des LTreg), l'IL-6 (cytokine pro-inflammatoire) était suffisante pour induire la différenciation de LTCD4<sup>+</sup> naïfs en lymphocytes T<sub>H</sub>17, via l'expression de ROR $\gamma$ t (*Betelli et al.*, 2006, *Mangan et al.*, 2006, *Veldhoen et al.*, 2006) (**Figure 11**). L'IL-6 agit sur la différenciation en LT<sub>H</sub>17 grâce à deux mécanismes : 1) l'IL6 inhibe la différenciation des LTreg et promeut la différenciation des LT<sub>H</sub>17 (*Korn et al.*, 2007), 2) l'IL-6 active l'expression de facteurs essentiels pour la différenciation en LT<sub>H</sub>17 dans les cellules TCD4<sup>+</sup> naïves comme l'IL-23R ou encore l'IL-21 (*Ivanov et al.*, 2006, *Zhou et al.*, 2007). Par la suite, l'IL-23 sécrétée par les cellules dendritiques, ainsi que l'IL-21 agissant de manière autocrine pourront maintenir la survie des LT<sub>H</sub>17 (**Figure 11**).

Les LT<sub>H</sub>17 obtenus en présence de TGF- $\beta$ 1 et d'IL-6 sécrètent de l'IL-17, mais aussi de l'IL-10 et pas d'IFN- $\gamma$  (**Figure 12a**). L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire sécrétée majoritairement par les LTreg, néanmoins, elle peut aussi être sécrétée par les LT<sub>H</sub>17 permettant de réguler leur activité pro-inflammatoire. L'IL-6 permettra la phosphorylation de STAT3 et son activité, alors que le TGF- $\beta$ 1 permettra la régulation du FT Gfi-1. Ce dernier inhibe l'activité d'ectonucléotidases, CD39 et CD73, importantes pour réguler l'activité pro-inflammatoires des cellules (*Chalmin et al.*, 2012).

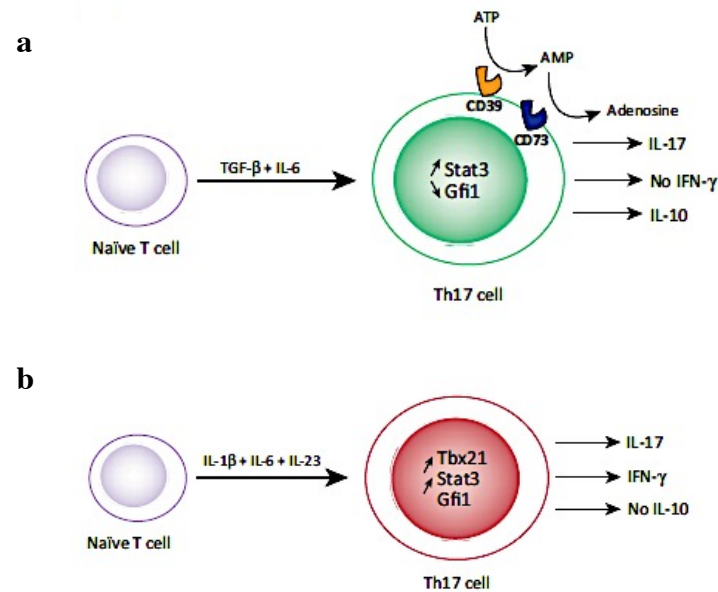
Si la production d'IL-6 par les cellules dendritiques permettant la différenciation des LT<sub>H</sub>17 est un fait avéré, ce n'est pas le cas pour le TGF- $\beta$ 1, dont la source est toujours discutée. En effet, il est possible que des cellules dendritiques activées en présence de *Mycobacterium tuberculosis* et en présence de zymosan permettent une production de TGF- $\beta$  suffisante (*Veldhoen et al.*, 2006). Néanmoins, les cellules Treg sont pressenties pour être la principale source de TGF- $\beta$  lors de la différenciation des LT<sub>H</sub>17 (*Li et al.*, 2007).

D'autres facteurs permettent l'inhibition de la formation des LT<sub>H</sub>17 comme l'IFN- $\gamma$  et l'IL-4 sécrétés respectivement par les LT<sub>H</sub>1 et les LT<sub>H</sub>2, ou encore l'IL-12 et l'IL-27 produites également par les mêmes populations cellulaires. De plus, l'IL-2 est également un inhibiteur des LT<sub>H</sub>17 (*Laurence et al.*, 2007), mais cette cytokine est requise lors de la différenciation des LTreg, tout comme l'acide rétinoïque qui se fixe à son récepteur afin d'induire l'expression de FoxP3 (*Elias et al.*, 2008, *Mucida et al.*, 2007). En parallèle de son effet activateur de la différenciation des LT<sub>H</sub>17, l'IL-6 est un inhibiteur de la différenciation des LTreg.



**Figure 11: Différenciation des lymphocytes T<sub>H</sub>17 chez la souris.** Adapté de *Boschetti et al.*, 2012. Les cellules TCD4 naïves peuvent se différencier en lymphocytes T<sub>H</sub>17 en présence de TGF-β1 (provenant probablement de LTreg) et d'IL-6 (provenant de cellules dendritiques). L'IL-6 permet la production d'IL-21 et de l'IL-23R qui permettront le maintien des cellules. Le développement des LT<sub>H</sub>17 peut être inhibé par des cytokines sécrétées par les sous-populations T<sub>H</sub>1 (IFN-γ et IL-12), ou T<sub>H</sub>2 (IL-4 et IL-27), mais ce développement peut aussi être inhibé par l'IL-2 ou l'acide rétinolique qui activeront la différenciation en LTreg.

En 2010, *Ghoreschi et al.* montrent que les LT<sub>H</sub>17 peuvent se différencier de manière TGF-β indépendante. En effet, en présence d'IL-1β, d'IL-6 et d'IL-23, des LTCD4 naïfs peuvent sécréter de l'IL-17. Cette différenciation est toujours dépendante de l'expression du FT RORγt, permettant un remodelage de la chromatine au niveau des gènes impliqués lors de la différenciation en LT<sub>H</sub>17, comme *Il17a* ou *Il21*. Néanmoins, les LT<sub>H</sub>17 différenciés en présence d'IL-1β, d'IL-6 et d'IL-23 expriment *Tbx21* permettant la sécrétion d'IFN-γ, mais ces cellules n'expriment plus d'IL-10 (*Chalmin et al.*, 2010), montrant une signature pro-inflammatoire plus importante que les LT<sub>H</sub>17 décrit précédemment (**Figure 12b**). De plus, lorsque ces cellules sont transférées dans une souris, elles peuvent entraîner des maladies auto-immunes, alors que les LT<sub>H</sub>17 obtenus en présence de TGF-β1 et d'IL-6 ne le peuvent pas (*Ghoreschi et al.*, 2010). De ce fait, les LT<sub>H</sub>17 obtenus en absence de TGF-β1 et exprimant de l'IFN-γ semblent être des cellules pathogéniques, au contraire de celles obtenues en présence de cette cytokine, et exprimant de l'IL-10.



**Figure 12: Expression cytokinique des lymphocytes  $T_H17$  en fonction des cytokines utilisées lors de la différenciation.** Adapté de *Martin et al.*, 2012. Les lymphocytes  $T_H17$  murins sécrétant de l'IL-17A et exprimant les facteurs de transcriptions STAT3 et ROR $\gamma$ t peuvent être induits à partir de lymphocytes TCD4-naïfs en utilisant TGF- $\beta$ 1 + IL-6 (a), ou en utilisant IL-1 $\beta$  + IL-6 + IL-23 (b). (a) Les  $LT_H17$  générés en présence de TGF- $\beta$ 1 + IL-6 sécrètent de l'IL-10 mais ne sécrètent pas d'IFN- $\gamma$ . Ces cellules ont un niveau réduit d'expression du FT Gfi1, permettant l'expression des ectonucléotidases CD39 et CD73 qui convertissent l'ATP en adénosine afin d'inhiber l'effet pro-inflammatoire des  $LT_H17$ . (b) Les  $LT_H17$  générés en absence de TGF- $\beta$ 1 expriment le FT spécifique des  $LT_H17$ , *Tbx21*, permettant l'expression d'IFN- $\gamma$  mais pas d'IL-10. Ces cellules expriment également Gfi1, mais pas les ectonucléotidases CD39 et CD73.

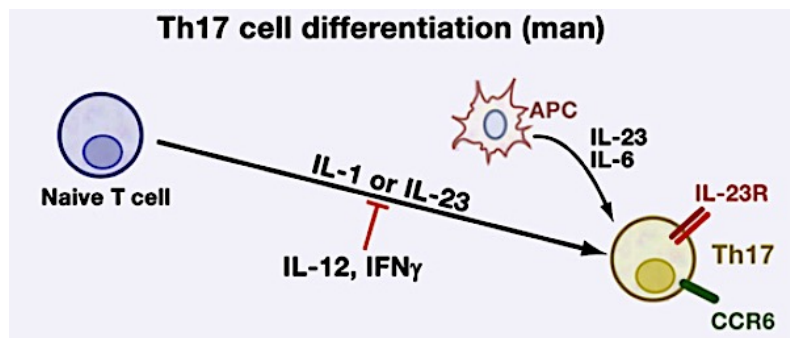
### 3.2.3 Différenciation des lymphocytes $T_H17$ humains

La différenciation chez l'homme des  $LT_H17$  est moins claire et moins détaillée que chez la souris. En effet, plusieurs études ont montré que la différenciation n'est pas dépendante de TGF- $\beta$ 1 + IL-6 comme cela peut être le cas chez la souris (*Acosta-Rodriguez et al.*, 2007a, *Chen et al.*, 2007, *van Beelen et al.*, 2007, *Wilson et al.*, 2007). Au contraire, la présence de TGF- $\beta$ 1 dans la culture inhibe la production d'IL-17. Malgré le fait que ces études aillent dans le même sens, elles n'ont pas mis en évidence un mix de cytokines nécessaires à la différenciation des  $LT_H17$ . En effet, le travail de *Chen et al.* montre que l'IL-23 permet la différenciation en cellules  $T_H17$ , alors que le travail de *Wilson et al.* montre que l'IL-23 comme l'IL-1 permettent chacun la différenciation en  $LT_H17$ . De plus, cette dernière étude a montré que la présence des deux cytokines en même temps ne permettait pas d'obtenir plus de cellules différenciées, au contraire de l'effet obtenu chez la souris en présence d'IL-6. Au contraire, le travail de *Acosta-Rodriguez et al.* montre que l'IL-1 permet la différenciation des  $LT_H17$  humains en culture, et que son effet est augmenté en présence d'IL-23 et d'IL-6 (Figure 13).

Néanmoins, si la différenciation nécessite des cytokines différentes entre souris et homme, le phénotype obtenu reste le même. En effet, les cellules  $T_H17$  obtenues expriment IL-17A, IL-17F et IL-22 après activation de RORC2 (Facteur remplaçant  $ROR\gamma_t$  chez l'homme) (Annunziato *et al.*, 2007, Wilson *et al.*, 2007). Les cellules humaines expriment également l'IL-23R, ainsi que le récepteur CCR6 (Chemokine Receptor 6), ce qui est aussi le cas chez la souris. Ce dernier est essentiel dans le recrutement des lymphocytes T durant l'inflammation et au cours des réponses immunitaires.

Il apparaît que les cellules  $T_H17$  exprimant l'IFN- $\gamma$  et l'IL-17 peuvent être définies comme une population  $CCR6^+ CXCR3^-$  (CXC Chemokine Receptor 3), alors que les cellules n'exprimant que l'IL-17 sont définies par l'expression de CCR6 et CCR4 (Acosta-Rodriguez *et al.*, 2007b).

Enfin, au contraire des  $LT_H17$  murins qui expriment du TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor) et de l'IL-6 (Langrish *et al.*, 2005), les  $LT_H17$  humains expriment de l'IL-26 (Wilson *et al.*, 2007) qui permet une réponse contre les bactéries extracellulaires.



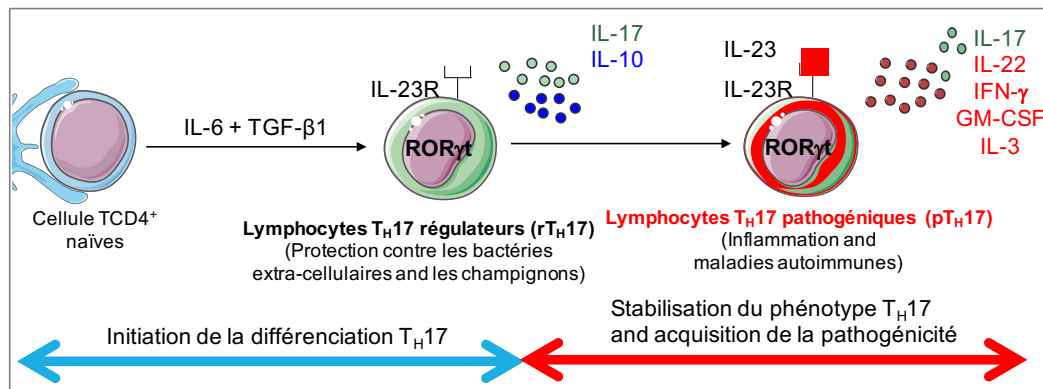
**Figure 13: Différenciation des lymphocytes  $T_H17$  chez l'homme.** Adapté de McGeachy and Cua, 2008. Les cellules TCD4-naïves peuvent se différencier en présence d'IL-1 ou d'IL-23. Les cellules différenciées expriment l'IL-23R, ainsi que CCR6 (Chemokine Receptor 6 augmentant le recrutement des cellules durant l'inflammation). L'effet de l'IL-1 pourra être augmenté en présence d'IL-6 et d'IL-23. Cette différenciation peut être inhibée par l'IL-12 et l'IFN- $\gamma$  (sécrétées par la sous-population  $T_H1$ ).

### 3.3 Le modèle régulateur versus pathogénique

Depuis la découverte des lymphocytes  $T_H17$  et de leur facteur de transcription régulateur,  $ROR\gamma_t$  (Ivanov *et al.*, 2006), de nombreuses recherches ont mis en évidence les cytokines nécessaires à leur différenciation (décrit en 3.2) chez la souris et chez l'homme. Cependant, une étude de Lee *et al.* publiée en 2012 a changé la vision faite du rôle de l'IL-23 sur les  $LT_H17$ . En effet, jusqu'à présent, l'IL-23 était connue comme étant une cytokine permettant le maintien des  $LT_H17$  chez la souris, et que ces cellules étaient obtenues à partir de TGF- $\beta$ 1 + IL-6, ou d'IL-1 $\beta$  + IL-6 + IL-23. Dans cette étude, grâce à des expériences de transcriptome, Lee *et al.*

ont montré que les  $LT_{H17}$  pouvaient être obtenus à partir d'un autre mix de cytokines, et surtout, que les cellules obtenues à partir de ces différents mix ne possédaient pas la même signature génique. A partir de ces données, ils ont défini deux populations : les lymphocytes  $T_{H17}$  régulateurs ( $LT_{H17r}$ ) et les lymphocytes  $T_{H17}$  pathogéniques ( $LT_{H17p}$ ).

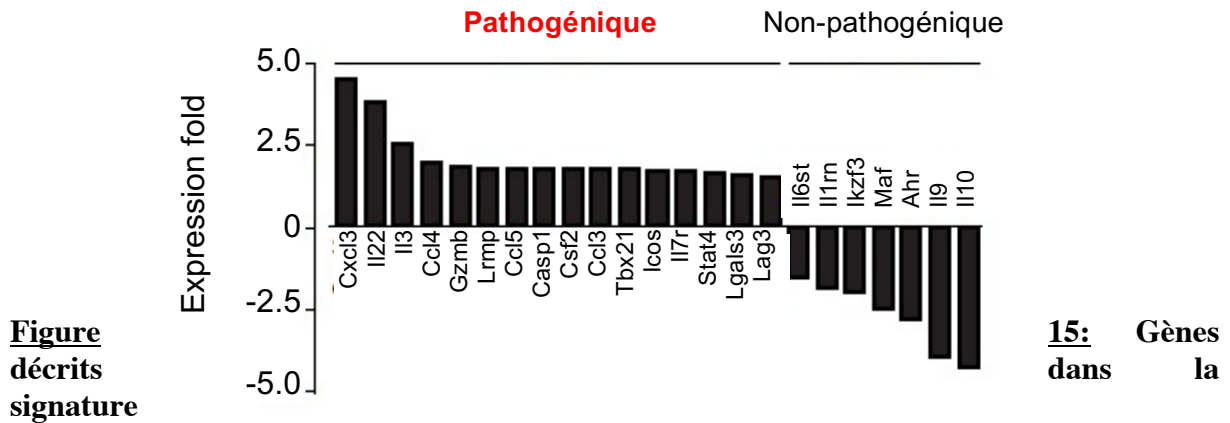
Le premier point discuté dans cette publication est le rôle de l'IL-23. En effet, son rôle serait de permettre une transition des  $LT_{H17r}$  vers les  $LT_{H17p}$  grâce à l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme IL-3, ou GM-CSF (**Figure 14**). Néanmoins, l'initiation de la différenciation s'effectue toujours à partir de TGF- $\beta$ 1 + IL-6 et via l'activation du facteur de transcription ROR $\gamma$ t. La différence notable est le rôle de chaque sous-population dans la réponse immunitaire. Si les  $LT_{H17r}$  sont importants lors de la protection contre les bactéries extracellulaires (principalement contre les bactéries filamenteuses segmentées (*Ivanov et al.*, 2009)), ainsi que contre les champignons, les  $LT_{H17p}$  seraient impliqués dans l'inflammation et induiraient des maladies auto-immunes (*Lee et al.*, 2012).



**Figure 14: Schéma de différenciation des lymphocytes  $T_{H17}$  selon Lee et al., 2012.** Les lymphocytes  $T_{H17}$  naïfs se différencient en lymphocytes  $T_{H17}$  régulateurs en présence de TGF- $\beta$ 1 et d'IL-6, et après activation du facteur de transcription ROR $\gamma$ t. Ces cellules expriment IL-17, mais aussi IL-10 permettant une régulation de la réponse immunitaire. Elles sont impliquées dans la réponse immunitaire contre les bactéries extracellulaires et les champignons. En présence d'IL-23, les  $LT_{H17r}$  opèrent une transition pour devenir des lymphocytes  $T_{H17}$  pathogéniques, et expriment des cytokines pro-inflammatoires comme GM-CSF, IL-3 ou IFN- $\gamma$ . Ces cellules sont impliquées lors de l'inflammation et lors de maladies auto-immunes.

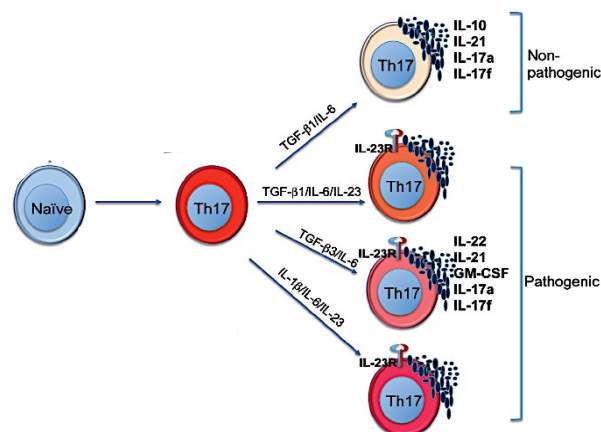
Le deuxième point abordé dans la publication sont les différents mix de cytokines utilisés pour obtenir des lymphocytes  $T_{H17}$ . En plus des mix déjà connus et utilisés, il a été montré que le TGF- $\beta$ 3 en présence d'IL-6 permettait aussi d'obtenir des  $LT_{H17p}$ . Le TGF- $\beta$ 3 agirait de façon autocrine sur les  $LT_{H17}$  et serait sécrété après fixation de l'IL-23 sur son récepteur. Par une étude de transcriptome, un pool de gènes dits « pathogéniques » a été mis en avant. Ce pool de gènes contient notamment *Csf2*, codant pour GM-CSF, *Tbx21*, codant pour T-bet, ou encore *Il3* (**Figure 15**). A l'inverse, des gènes comme *Il10*, ou *Il1rn* (codant pour un

antagoniste du récepteur de l'IL-1) font partie d'une signature dite « non-pathogénique » (Figure 15).



« pathogénique » ou « non-pathogénique » selon *Lee et al., 2012*. La signature pathogénique contient de nombreux gènes codant pour des facteurs pro-inflammatoires comme *Csf2*, *Il3* ou *Tbx21*. Au contraire, la signature non-pathogénique contient des gènes codant des facteurs anti-inflammatoires comme *Il10* ou *Il1rn*.

Un nouveau schéma de différenciation des lymphocytes  $T_H17$  se crée à partir de cette étude (Figure 16). Celui-ci montre que seule la différenciation en présence de TGF- $\beta$ 1 et d'IL-6 permet d'obtenir une population non-pathogénique, sécrétant entre autres IL-17, mais aussi IL-10. Toutes les autres combinaisons de cytokines aboutissent à la formation d'une population pathogénique sécrétant de l'IFN- $\gamma$ , de l'IL-3 et du GM-CSF en plus d'IL-17 (dans une moindre mesure qu'en conditions régulatrices).



**Figure 16: Schéma de différenciation des lymphocytes  $T_H17$  selon *Lee and Kuchroo, 2015*.** Les lymphocytes TCD4-naïfs se différencient en lymphocytes  $T_H17r$  en présence de TGF- $\beta$ 1 et d'IL-6, ou en lymphocytes  $T_H17p$  en présence de TGF- $\beta$ 1/IL-6/IL-23 ou TGF- $\beta$ 3/IL-6 ou IL-1 $\beta$ /IL-6/IL-23. Les gènes activés et les cytokines sécrétés ne seront pas les mêmes entre ces deux sous-groupes.



### 3.4 La plasticité des lymphocytes T<sub>H</sub>17

Comme présenté en 3.2.1, le facteur de transcription ROR $\gamma$ t nécessite une activation continue par STAT3 afin de maintenir le phénotype en LT<sub>H</sub>17. Si l'environnement cytokinique se modifie, il permet une conversion des LT<sub>H</sub>17 vers une autre sous-population de lymphocytes T auxiliaires. Il existe deux types de plasticité en fonction du devenir des lymphocytes : la plasticité non-pathogénique permet d'obtenir des cellules impliquées dans la régulation de la réponse immunitaire, alors que la plasticité pathogénique aboutit à une activité inflammatoire, voir pathogène des cellules (**Figure 17**).

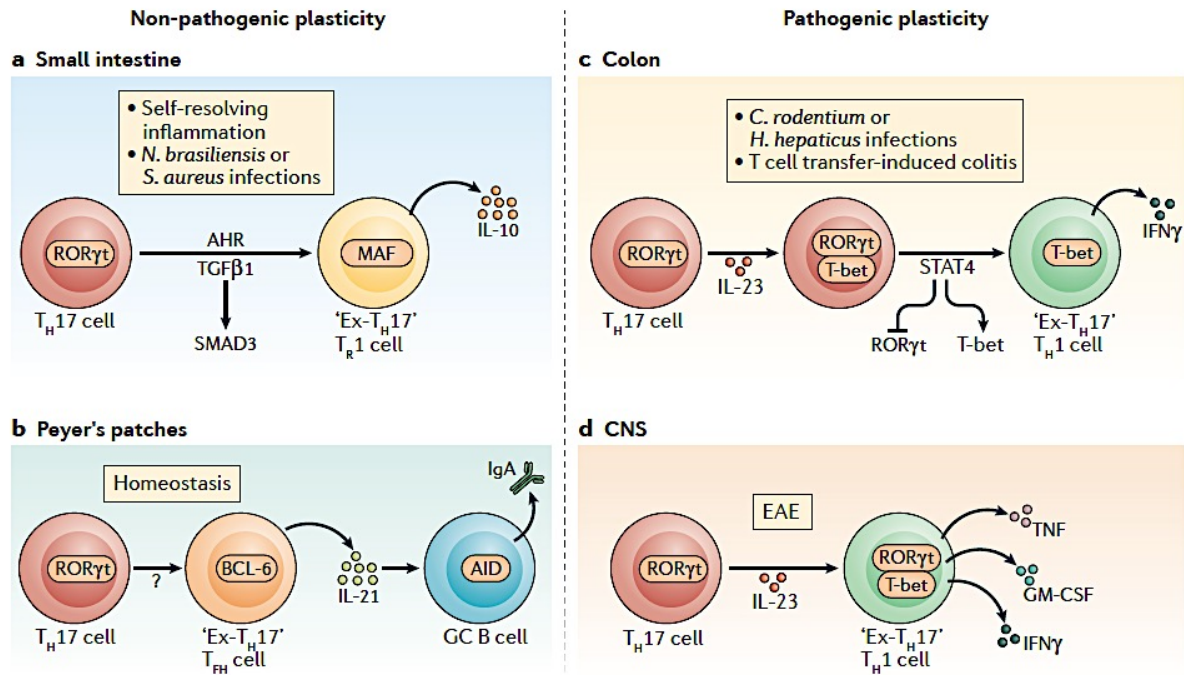
Les LT<sub>H</sub>17 peuvent être convertis en cellules T régulatrices appelées Tr1 au niveau du petit intestin en présence de *S. aureus* ou après une inflammation. Ces cellules expriment de l'IL-10 permettant une régulation de la réponse immune (*Gagliani et al., 2015*) sous l'influence de TGF- $\beta$ 1 via les facteurs AHR (Aryl Hydrocarbon Receptor) et SMAD3 (SMAD family member 3).

Les LT<sub>H</sub>17 peuvent être convertis en cellules T folliculaires auxiliaires ou T<sub>H</sub> au niveau des plaques de Peyer (*Hirota et al., 2013*). Ces cellules n'expriment plus ROR $\gamma$ t, ni IL-17, mais expriment fortement l'IL-21 et BCL-6 (B-Cell Lymphoma 6). Cette conversion permet d'augmenter la production d'immunoglobulines A par les LB des centres germinatifs, entraînant une protection immunitaire intestinale.

Au niveau du colon, les LT<sub>H</sub>17 peuvent donner des cellules T<sub>H</sub>1 dites ex-T<sub>H</sub>17 (*Hirota et al., 2011*). Durant une infection par *H. hepaticus* par exemple, les cellules T<sub>H</sub>17 vont d'abord exprimer de l'IL-17A et de l'IFN- $\gamma$  avant de se convertir en cellules « ex-T<sub>H</sub>17 » T<sub>H</sub>1, n'exprimant plus que l'IFN- $\gamma$ . Cette conversion dépend de l'expression des facteurs STAT4 et T-bet dans les cellules et de l'IL-23 qui va initier cette conversion.

Dans le système nerveux, la conversion des LT<sub>H</sub>17 sera également dépendante de l'IL-23. Durant l'EAE (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis ; modèle murin de la sclérose en plaque humaine), les cellules « ex-T<sub>H</sub>17 » T<sub>H</sub>1 produiront des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , GM-CSF ou encore l'IFN- $\gamma$  (*Krausgruber et al., 2016*).

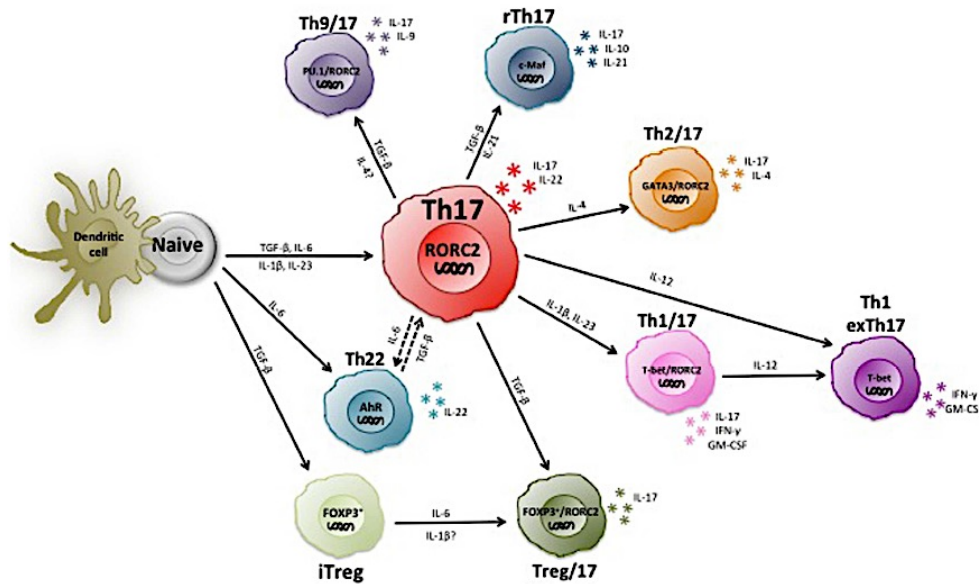
Les études menées sur la plasticité pathogénique des LT<sub>H</sub>17 ont montré que l'IL-23 est une cytokine clé dans la pathogénicité (*Langrish et al., 2005*). En effet, cette cytokine induit l'expression de BLIMP1 (B lymphocyte-induced maturation protein 1) qui active les fonctions pro-inflammatoires des cellules T<sub>H</sub>17. Ce facteur activera l'expression des gènes *Il23r*, *Il17a* et *Csf2* par co-localisation avec les facteurs ROR $\gamma$ t, STAT3 et p300 au niveau des loci.



**Figure 17: La plasticité des lymphocytes  $T_H17$ .** Adapté de *Stockinger and Omenetti, 2017*. La plasticité des lymphocytes  $T_H17$  ainsi que les effets bénéfiques (gauche) ou néfastes (droite) sur l'immunité de l'hôte dépendent de l'infection rencontrée. a) La limitation de l'inflammation ou l'infection du petit intestin par des bactéries comme *S. aureus* convertit les cellules  $T_H17$  en cellules « ex- $T_H17$  » produisant de l'IL-10 et appelées cellules  $T_{R1}$ . Ces cellules sont dépendantes de TGF- $\beta$ 1 et de l'activation des facteurs AHR et SMAD3. b) Dans les plaques de Peyer, les  $LT_H17$  acquièrent un phénotype de cellules T folliculaires auxiliaires ( $T_{RH}$ ). Ces cellules n'expriment plus ROR $\gamma$ t, ni IL-17, mais expriment fortement l'IL-21 et BCL-6. Les cellules « ex- $T_H17$  »  $T_{RH}$  induisent la production d'immunoglobulines A par les LB présents dans les centres germinatifs permettant une protection intestinale. c) Durant une infection par *H. hepaticus*, les cellules  $T_H17$  vont d'abord exprimer de l'IL-17A et de l'IFN- $\gamma$  avant de se convertir en cellules « ex- $T_H17$  »  $T_{H1}$ , n'exprimant plus que l'IFN- $\gamma$ . Cette conversion dépend de l'expression des facteurs STAT4 et T-bet dans les cellules et de l'IL-23 qui va initier cette conversion. d) Dans le système nerveux central, la conversion des  $LT_H17$  sera également dépendante de l'IL-23. Durant l'EAE (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis), les cellules « ex- $T_H17$  »  $T_{H1}$  produiront des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , GM-CSF ou encore l'IFN- $\gamma$ . AID – Activation Induced Cytidine Deaminase.

Cette représentation schématique de la plasticité des  $LT_H17$  est cependant dépendante du contexte et de l'organe dans lequel elle se produit. De manière plus générale, les  $LT_H17$  possèdent une plasticité vers la sous-population Treg. En effet, les deux populations partagent le TGF- $\beta$ 1 comme cytokine commune, et cette dernière entraîne une régulation de la balance existante entre les  $LT_H17$  et les LTreg. A l'inverse, des LTreg différenciés en présence d'IL-6 peuvent donner lieu à des  $LT_H17$  exprimant le marqueur FoxP3 (**Figure 18**). Les  $LT_H17$  peuvent également se différencier en cellules  $T_H2/T_H17$  en présence d'IL-4, mais actuellement la réciproque n'a pas été montré. Enfin, les  $LT_H17$  posséderaient également une plasticité vers les

sous-populations  $T_H9/T_H17$ , ainsi que  $T_H22/T_H17$  en fonction de l'environnement en cytokines (Figure 18).



**Figure 18: Hétérogénéité et plasticité des lymphocytes  $T_H17$ .** Adapté de *Geginat et al.*, 2014. De manière générale, les  $LT_H17$  peuvent aboutir à plusieurs sous-populations différentes de  $LT$  auxiliaires en fonction des cytokines présentes dans le milieu. Les cytokines nécessaires à la différenciation cellulaire sont notées sur les flèches. Les cytokines sécrétées par chaque population sont représentées à côté des cellules. iTreg – induced T regulator, rTh17 – regulatory Th17.

### 3.5 Les autres types cellulaires produisant de l'IL-17

L'IL-17A, bien que fortement sécrétée par les  $LT_H17$ , n'est pas uniquement exprimée dans ces cellules. D'autres populations peuvent également sécréter cette cytokine : les cellules  $TCD8^+IL-17A^+$  ( $Tc17$ ), les cellules  $NKT17$ , les cellules  $ILC3$ , et les  $LTCD4^+ \gamma\delta$ .

#### 3.5.1 Les lymphocytes $TCD8^+IL-17A^+$

Les lymphocytes  $TCD8^+$  ( $LTCD8^+$ ) sont un sous-type de lymphocytes T impliqués dans la protection contre les virus et contre les cellules cancéreuses. Il existe plusieurs populations dont les  $LTc17$ , avec « c » correspondant à cytotoxicité. Des études chez la souris ont mis en évidence que ces  $LTc17$  peuvent être obtenus à partir de  $LTCD8^+$  naïfs en présence de  $TGF-\beta 1$  et d'IL-6 (*Huber et al.*, 2009). Ces cellules expriment de l'IL-17A, mais aussi de l'IL-21 et de l'IL-22. De plus, en présence d'IL-23, ou lors d'une culture avec  $TGF-\beta 1$ , IL-6, IL-1 $\beta$  et IL-23, ces  $LTc17$  expriment en plus de l'IL-17, de l'IL-21 et de l'IL-22, d'autres cytokines pro-inflammatoires comme GM-CSF, IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$  (*Yen et al.*, 2009).

La différenciation de ces cellules dépend également du FT ROR $\gamma$ t, comme pour les LT<sub>H</sub>17, ainsi que de STAT3 et IRF4. Tout comme les LT<sub>H</sub>17, ces cellules expriment à leur surface CCR6 et le récepteur de l'IL-23 (Huber *et al.*, 2009, Yen *et al.*, 2009).

### 3.5.2 Les cellules NKT17

Les cellules NKT17 sont des cellules NK exprimant un récepteur des cellules T spécifique à un CMH exprimant la chaîne CD1d. Ces cellules se différencient dans le thymus à partir d'un progéniteur T exprimant les marqueurs CD4 et CD8. Les cellules NKT perdent ces marqueurs à la fin de leur maturation, et expriment à l'inverse le marqueur NK1.1 (Benlagha *et al.*, 2002, Benlagha *et al.*, 2005). Les cellules NKT17 expriment l'IL-17A au cours d'une infection par *S. aureus* (Coquet *et al.*, 2008), et elles requièrent aussi l'expression du facteur de transcription ROR $\gamma$ t pour se différencier (Michel *et al.*, 2008). Durant leur développement dans le thymus, les cellules NKT17 ont besoin de TGF- $\beta$ 1 pour survivre (Havenar-Daughton *et al.*, 2012). Elles expriment fortement les récepteurs TGF $\beta$ RII, et montrent une phosphorylation plus importante de SMAD2/3, allant dans le sens d'une implication de TGF- $\beta$ 1 lors de leur différenciation.

### 3.5.3 Les cellules ILC3

Les ILC3 dérivent du progéniteur commun lymphoïde et sont les cellules découvertes le plus récemment. Chez la souris, ces cellules se divisent en deux populations distinctes en fonction de l'expression du marqueur extracellulaire CCR6 (Sawa *et al.*, 2010, Klose *et al.*, 2013). Les cellules CCR6<sup>+</sup> sécrètent également de l'IL-17A et requièrent l'expression de ROR $\gamma$ t (Eberl *et al.*, 2004, Gladiator *et al.*, 2013). Au contraire, les cellules CCR6<sup>-</sup> expriment le facteur de transcription T-bet induisant une diminution de l'expression de ROR $\gamma$ t, et permettant l'expression d'IFN- $\gamma$  et de GM-CSF (Klose *et al.*, 2013, Cella *et al.*, 2009).

### 3.5.4 Les lymphocytes TCD4<sup>+</sup> $\gamma\delta$

Les LTCD4<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  dérivent du progéniteur commun aux LTCD4<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  et aux ILC. Ces cellules vont maturer dans le thymus et en sortir pré-activées. Elles ont besoin d'IL-1 $\beta$  et d'IL-23 pour exprimer le FT ROR $\gamma$ t et l'IL-17A (Papotto *et al.*, 2017). Ces cellules répondront avant les LT<sub>H</sub>17, et produiront de l'IL-21 et de l'IL-22 entre autres, permettant par la suite d'activer les LT<sub>H</sub>17 au niveau du site infecté (Papotto *et al.*, 2017).

## 4. Le facteur de transcription IKAROS

La famille des facteurs de transcription IKAROS contient cinq membres : Ikaros (*Ikzf1*), Helios (*Ikzf2*), Aiolos (*Ikzf3*), Eos (*Ikzf4*) et Pegasus (*Ikzf5*). Cette famille de FT est très importante au cours de l'hématopoïèse, car cette étape de maturation doit être finement régulée tout au long de la vie. Ikaros, ainsi que les autres membres, sont des facteurs de transcription à doigts de zinc et homologues au niveau de leurs séquences. Ma thèse ayant pour but d'étudier le rôle d'Ikaros dans les lymphocytes T<sub>H</sub>17, je me concentrerai plus spécifiquement sur ce facteur dans les LTCD4<sup>+</sup>.

### 4.1 Découverte du facteur de transcription Ikaros

Ikaros a été découvert sous le nom de LyF-1 par l'équipe de Stephen Smale (*Lo et al.*, 1991). Cette protéine a été initialement décrite comme spécifique des LB et des LT, car elle pouvait se fixer sur les promoteurs de *Lck*, ou  $V_{preB}$ . L'année suivante, le facteur Ikaros a été décrit comme étant un régulateur du promoteur de CD3 $\delta$  par Katia Georgopoulos (*Georgopoulos et al.*, 1992). Quelques années après, une étude a montré que LyF-1 et Ikaros étaient la même protéine (*Hahm et al.*, 1994). Cependant, c'est le nom Ikaros qui est resté et qui est utilisé à l'heure actuelle.

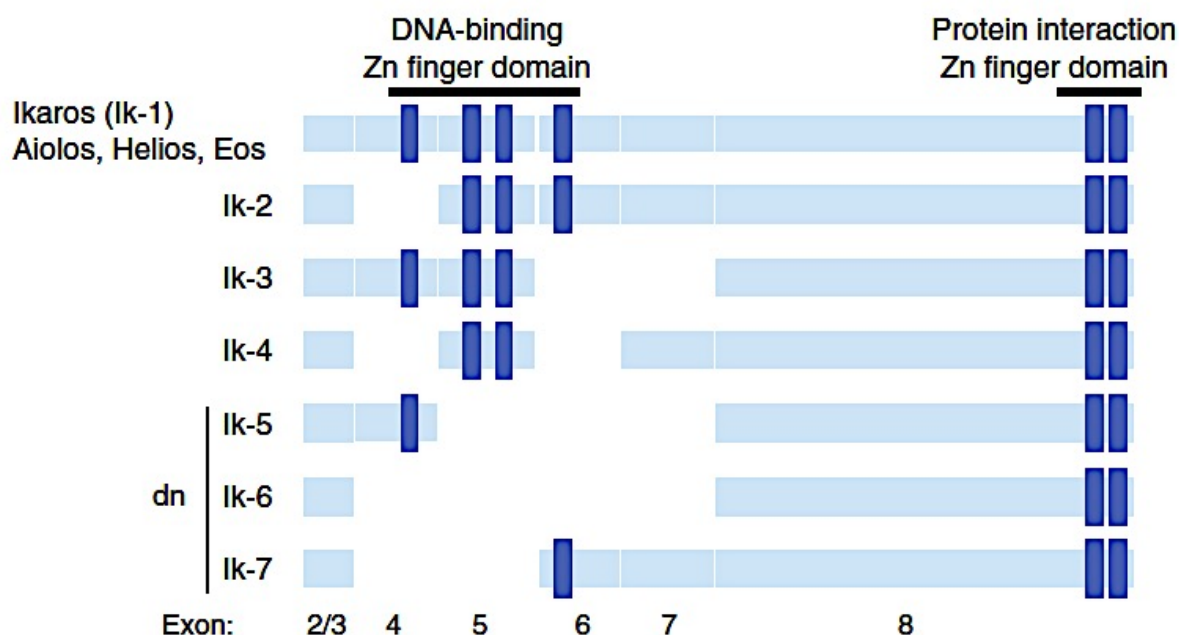
Ikaros est un facteur de transcription se liant à l'ADN sur des séquences spécifiques contenant -GGGAA- dans les promoteurs des gènes. Cette séquence a été décrite comme étant la séquence principale de fixation (*Molnar and Georgopoulos*, 1994). Ce facteur est un orthologue de la protéine Hunchback chez la drosophile (*Tautz et al.*, 1987).

### 4.2 Structure du facteur de transcription Ikaros

Le gène *Ikzf1* est composé de 8 exons (**Figure 19**) et peut donner lieu à différentes protéines suite à un épissage alternatif (*Hahm et al.*, 1994). L'exon 1 du gène n'est pas codant, et seuls les exons 2 à 8 permettent la formation des différentes isoformes. La protéine Ikaros formée contient des doigts de zinc de type C2H2, permettant à un atome de zinc de former des interactions non covalentes.

Ik-1 est la forme majeure retrouvée dans les lymphocytes. Elle possède un domaine de liaison à l'ADN du côté N-terminal contenant quatre doigts de zinc, et un domaine de dimérisation du côté C-terminal constitué de deux doigts de zinc. Les autres isoformes d'Ikaros diffèrent du côté N-terminal et peuvent parfois donner lieu à des dominants négatifs inhibant l'activité de l'isoforme Ik-1 par interaction du côté C-terminal (*Sun et al.*, 1996). Il a été montré

que les isoformes Ik-1 à Ik-4 se situent dans le noyau, alors que les autres isoformes se situent dans le cytoplasme. Cette localisation des isoformes dominantes négatives explique l'effet inhibiteur induit sur Ik-1 qui ne peut donc plus se fixer sur les promoteurs des gènes cibles.



**Figure 19: Structure de la protéine Ikaros et des différentes isoformes.** Adapté de *Yoshida and Georgopoulos, 2014*. La composition des exons contenant des doigts de zinc impliqués dans la fixation à l'ADN ou dans l'interaction protéine-protéine est présenté pour les différentes isoformes d'Ikaros et des autres membres de la famille Ikaros. Les exons sont représentés par les rectangles horizontaux bleu clair, alors que les doigts de zinc sont représentés par les rectangles verticaux bleu foncé. dn – dominant négatif.

### 4.3 Expression du facteur de transcription Ikaros

#### 4.3.1 Ikaros et le système hématopoïétique

L'expression d'Ikaros est en grande partie spécifique au système hématopoïétique (*Georgopoulos et al., 1994*). Les souris déficientes pour Ikaros n'ont pas, ou peu de cellules de la lignée lymphoïde, impliquant une divergence des CSH vers les lignées érythroïde et myéloïde.

L'expression d'Ikaros dans le système hématopoïétique débute lors de l'embryogenèse, et plus particulièrement dans le sac vitellin (*Georgopoulos et al., 1992*). Le sac vitellin est le siège de l'hématopoïèse primitive, et il est remplacé par le foie fœtal qui est le siège de l'hématopoïèse définitive. L'ARNm (Acide RiboNucléique messenger) d'Ikaros, surtout des isoformes Ik-1 et Ik-2, est d'abord détecté dans le foie fœtal à 9,5j de gestation, puis dans le thymus et enfin dans la rate à 19j de gestation. Ce retard dans la rate est dû à la colonisation du thymus par les LT en premier, puis ces derniers iront en périphérie coloniser les autres organes.

Chez l'adulte, Ikaros est présent dans de nombreuses cellules hématopoïétiques comme les LT, ou encore les LB (*Kirstetter et al.*, 2002). Ce sont surtout les isoformes Ik-1 et Ik-2 qui sont présentes. En effet, l'ARNm de l'isoforme Ik-4 est absent dans la rate des souris adultes. Il en est de même pour l'isoforme Ik-3, néanmoins, l'isoforme Ik-5 est présente dans les lymphocytes mais en moindre quantité que Ik-1 et Ik-2 (*Molnar and Georgopoulos*, 1994).

### 4.3.2 Autres localisations d'Ikaros

Ikaros, et plus particulièrement l'isoforme Ik-1 est retrouvée dans le cerveau des souris à la naissance (*Molnar and Georgopoulos*, 1994). Elle est aussi retrouvée dans le striatum avec l'isoforme Ik-2 (*Agoston et al.*, 2007). Ikaros est également exprimé dans la glande pituitaire, où il régule l'expression d'hormones, comme la prolactine, mais il est aussi un régulateur neuroendocrinien dans cette même glande (*Ezzat et al.*, 2006).

## 4.4 Régulation du facteur Ikaros

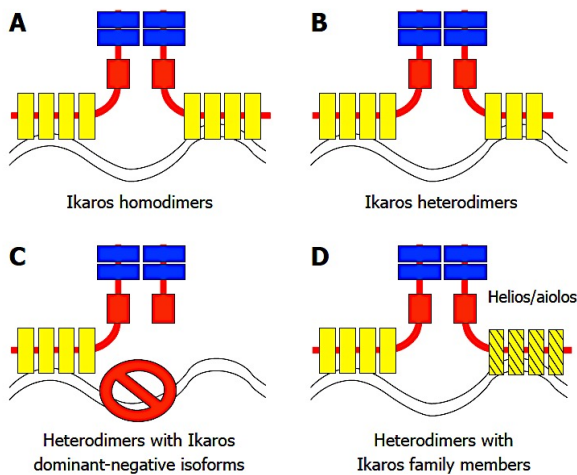
### 4.4.1 Régulation transcriptionnelle

Peu de choses sont connues concernant cette régulation. Néanmoins, une étude a été menée sur le gène *Ikzf1* en utilisant des expériences de cartographie, et elle a mis en évidence deux promoteurs alternatifs, ainsi que plusieurs éléments de régulation pour le gène *Ikzf1* (*Kaufmann et al.*, 2003). De plus, une autre étude a montré que Ikaros régule sa propre expression en se fixant sur son promoteur au cours de la maturation des LT (*Perotti et al.*, 2015).

### 4.4.2 Régulation traductionnelle

Comme abordé en 4.2, le gène *Ikzf1* peut donner plusieurs protéines différentes dû à un mécanisme d'épissage alternatif. Leur principale différence est la composition en doigts de zinc impliqués dans la fixation à l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) (**Figure 20**). Les isoformes dominantes négatives, et dépourvues de doigts de zinc du côté N-terminal, peuvent toujours former des homo- ou des hétéro-dimères avec d'autres isoformes se liant à l'ADN. Ceci abouti à une protéine Ikaros ne pouvant pas fixer l'ADN et restant dans le cytoplasme (**Figure 20**).

L'isoforme Ik-1 est exprimée fortement dans la lignée lymphoïde (*Payne et al.*, 2003), montrant que l'épissage alternatif de la protéine peut être régulé. Cette régulation s'effectue tout d'abord au niveau du type cellulaire permettant des associations d'isoformes différentes, mais aussi au niveau cellulaire, car les isoformes dominantes négatives empêcheront le fonctionnement des isoformes actives.



**Figure 20: Association des isoformes d'Ikaros entre elles, ainsi que des différents membres.** Adapté de *Li et al.*, 2011. Les différents types de complexe pouvant être formé par Ikaros et les autres membres de la famille sont représentés. **A)** Ikaros peut former un homo-dimère afin de se fixer à l'ADN. **B)** Ikaros peut former un hétéro-dimère avec une autre isoforme pouvant se fixer également à l'ADN. **C)** Hétéro-dimère entre l'isoforme Ik-1 et une isoforme dominante négative ne pouvant pas se fixer à l'ADN. **D)** L'isoforme Ik-1 peut également se fixer à l'ADN via un hétéro-dimère avec un autre membre de la famille Ikaros.

#### 4.4.3 Régulation post-traductionnelle

Ikaros est régulé de manière post-traductionnelle soit par phosphorylation, soit par SUMOylation. La SUMOylation d'Ikaros inhibe son action de répresseur au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique via le complexe HDAC (*Gómez del-Arco et al.*, 2005, *Apostolov et al.*, 2016), alors que la phosphorylation d'Ikaros empêche son action de répresseur de la transcription du gène *TdT* dans les thymocytes (*Gurel et al.*, 2008).

La phosphorylation dépend de la protéine CK2 (Caséine kinase II), alors que la déphosphorylation est due à la phosphatase PP1 (Protéine phosphatase 1). Ces deux protéines permettent un équilibre dans la phosphorylation d'Ikaros sur de nombreux sites localisés au niveau de la région N-terminale (entre les doigts de zinc), ainsi qu'au niveau de la région C-terminale. D'autres sites de phosphorylation dans des domaines PEST initient la dégradation d'Ikaros via le protéasome. Cette dégradation passe par l'ubiquitination d'Ikaros après sa phosphorylation par la protéine CK2. Au contraire, la protéine PP1 permet la déphosphorylation d'Ikaros empêchant son ubiquitinylation et sa dégradation (*Dovat et al.*, 2011). De plus, *Gomez-del Arco et al.* ont montré en 2004 que la phosphorylation d'Ikaros était importante lors du cycle cellulaire, et plus particulièrement lors de la transition G1-S (*Gomez-del Arco et al.*, 2004). La phosphorylation s'opérant au niveau de l'exon 8 empêche la fixation d'Ikaros sur l'hétérochromatine péricentromérique (HCPC) permettant le passage en phase S. De plus, *Gurel et al.* ont également montré que la phosphorylation sur des résidus d'Ikaros inhibe sa fixation sur le promoteur de *TdT* (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase) (*Gurel et al.*, 2004).

La SUMOylation d'Ikaros a été décrite dans les lymphocytes (*Gomez-del Arco et al.*, 2005, *Apostolov et al.*, 2016). La forme SUMOylée est toujours présente au niveau de l'HCPC,



cependant, la fonction répressive d'Ikaros est inhibée, alors que la fonction activatrice est toujours efficace.

## 4.5 Ikaros : activateur et répresseur de la transcription

### 4.5.1 Ikaros est un activateur de la transcription

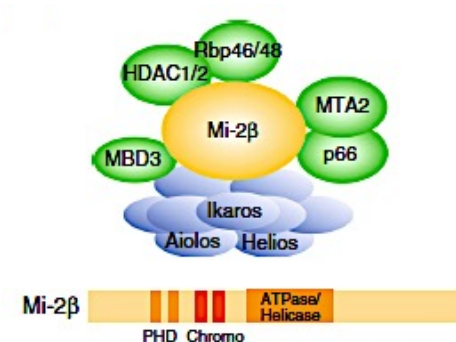
Afin que la transcription soit activée, il faut que la chromatine soit ouverte, et donc acétylée, au niveau des régions promotrices des gènes. Le complexe SWI/SNF (Switch / Sucre Non Fermentable) permet l'ouverture de ces régions par déplacement des nucléosomes le long de l'ADN, initiant ainsi la liaison des FT sur ces régions (*Roberts and Orkin, 2004*). Il a été montré que Ikaros peut se fixer à l'ATPase BRG1 (Brahma-Related Gene 1) contenue dans le complexe SWI/SNF des LT (*Kim et al., 1999*), ainsi que dans celui formé au niveau des érythrocytes.

De manière intéressante, une étude de *Bottardi et al.* publiée en 2013 a montré que Ikaros peut interagir avec les FT GATA (3 membres composent cette famille : GATA-1 à 3), mais aussi avec CDK9 (Cyclin Dependent Kinase 9), activant la transcription de gènes tels que *Gzmb* (Granzyme b : montré comme gène impliqué dans la pathogénicité des LT<sub>H</sub>17) (*Bottardi et al., 2013*).

Enfin, Ikaros a également été décrit comme régulant de manière positive des super-enhancers au cours de la différenciation des cellules pre-B empêchant l'initiation de leucémies aigües lymphoblastiques (*Hu et al., 2016*).

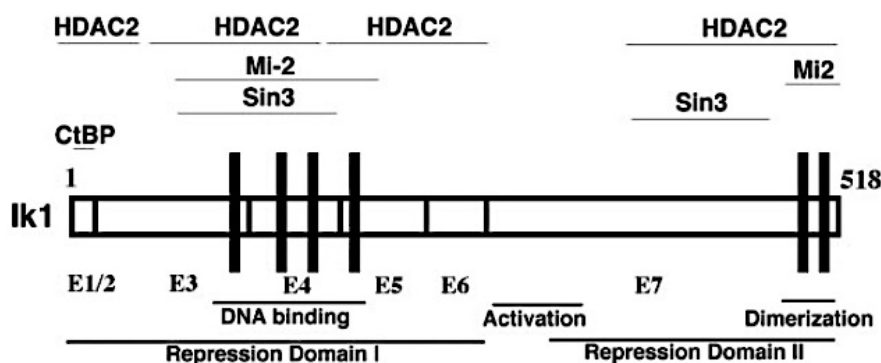
### 4.5.2 Ikaros est un répresseur de la transcription

Ikaros est un FT capable d'inhiber la transcription par liaison directe avec le complexe NuRD (Nucleosome Remodelling and Histone Deacetylase). Plusieurs études ont montré que le complexe NuRD contient les Histone DeAcetylase HDAC 1 et 2, et que Ikaros peut interagir avec ce complexe via une liaison à l'ATPase Mi-2 $\beta$  (*Kim et al., 1999, Koipally and Georgopoulos, 2002, Liang et al., 2017*) (**Figure 21**).



**Figure 21: Structure du complexe Ikaros-NuRD ainsi que de Mi-2 $\beta$ .** Adapté de *Yoshida and Georgopoulos, 2014*. Le complexe NuRD contient des histones déacétylases de classe I (HDAC 1 et 2), mais aussi un remodeleur de la chromatine ATP-dépendant (Mi-2 $\beta$ ). PHD – Plant homeodomain, Chromo – Chromodomain.

Cependant, Ikaros peut aussi être un répresseur de la transcription de manière indépendante des histones déacétylases. En effet, il peut interagir avec CtBP (C-terminal Binding Protein) qui est un répresseur se fixant sur les TBP (TATA box Binding Protein) (Koipally and Georgopoulos, 2002). La figure 22 répertorie les différents sites de fixation des répresseurs de la transcription décrit précédemment avec Ikaros.



**Figure 22: Domaines de liaison d'Ikaros avec les répresseurs.** Adapté de Koipally and Georgopoulos, 2002. Deux domaines distincts sur Ikaros situés du côté N-Terminal et C-Terminal montrent une interaction différente avec les répresseurs. Les exons sont représentés par les rectangles horizontaux blancs, et la numérotation appliquée est l'ancienne (exon 1 non codant découvert ultérieurement). Les doigts de zinc sont représentés par les rectangles verticaux noirs.

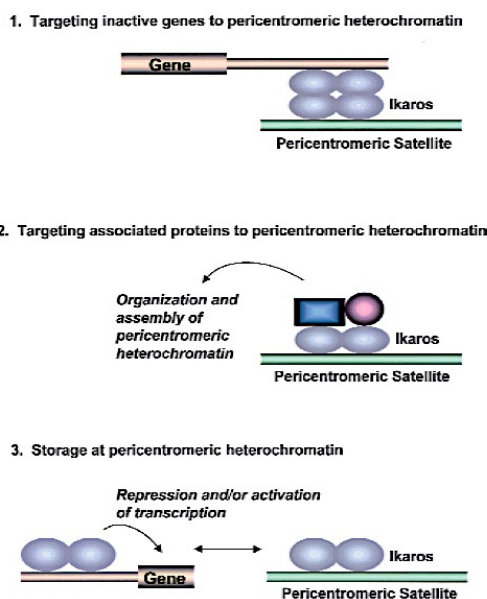
Néanmoins, le rôle de répresseur de la transcription qu'opère Ikaros avec le complexe NuRD est discuté. En effet, en présence, ou en absence d'Ikaros, le complexe NuRD peut être également un activateur de la transcription (Koipally et al., 2002a+b). Au niveau des gènes de la lignée lymphoïde, la présence d'Ikaros et du complexe NuRD permet l'activation de la transcription, alors qu'en absence d'Ikaros, ces mêmes gènes sont réprimés par le complexe NuRD. Plus récemment, il a été montré que Ikaros peut réprimer la transcription de gènes dans les thymocytes CD4 CD8 en se fixant au complexe répresseur Polycomb (PRC2) (Oravec et al., 2015). En l'absence d'Ikaros, ces gènes sont activés de manière ectopique aboutissant à des leucémies. Cette répression s'effectue indépendamment du complexe NuRD, et suggère que Ikaros est un régulateur essentiel de la fonction du complexe PRC2 dans les lymphocytes T en développement.

#### 4.5.3 Ikaros et son activité au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique

La chromatine est divisée en deux parties : (1) l'euchromatine, décondensée, qui permet la transcription des gènes par les polymérase ; (2) L'hétérochromatine, condensée, qui ne permet pas cette liaison, et les gènes ne sont donc pas transcrits. Une première étude a mis en évidence l'interaction d'Ikaros avec l'HC-PC dans des LB (Brown et al., 1997), et ainsi, son interaction

avec des gènes non transcrits. La même équipe a montré que cette localisation n'est pas restreinte aux LB, et qu'elle peut également s'appliquer aux LT. Lorsque les lymphocytes T s'activent, Ikaros recrute le complexe NuRD dans l'HC-PC, et dans le même temps, BRG1, l'un des composants du complexe SWI/SNF décrit précédemment, n'est pas présent (Kim *et al.*, 1999), suggérant que l'effet d'Ikaros au niveau de l'HC-PC est un effet répresseur.

L'affinité d'Ikaros pour ces gènes est dépendant de son état de phosphorylation. Comme décrit en 4.4.3, Ikaros est régulé par CK2 et PP1, et sa phosphorylation permet une fixation aux séquences  $\gamma$ -satellites présentes dans l'HC-PC (Cobb *et al.*, 2000). De plus, cette phosphorylation est dépendante du cycle cellulaire, et de la cellule. Ainsi, un modèle du fonctionnement d'Ikaros a été proposé par Cobb *et al.* (Figure 23).



**Figure 23: Modèle de fonctionnement d'Ikaros.**

Adapté de Cobb *et al.*, 2000. **1)** Ikaros peut adopter une structure multimérique afin d'amener les gènes cibles dans l'HC-PC. Certaines sous-unités seront fixées aux gènes, alors que les autres seront fixées aux séquences  $\gamma$ -satellites de l'HC-PC. **2)** Au niveau de l'HC-PC, Ikaros recrute des facteurs, comme le complexe NuRD permettant ainsi l'organisation de celle-ci. **3)** L'HC-PC pourrait également servir de site de stockage à Ikaros permettant une libération plus rapide dans le noyau.

## 4.6 Modèles murins déficients pour Ikaros et les conséquences liées

L'utilisation de différents modèles murins a permis d'étudier le rôle d'Ikaros dans le développement du système hématopoïétique. En fonction des modèles présentés dans le table 1, la mutation est plus ou moins ciblée et a permis une étude précise.

### 4.6.1 La mutation dominante négative Ik<sup>DN</sup>

Cette mutation a été effectuée en premier afin d'étudier l'impact d'Ikaros sur la maturation des cellules (Georgopoulos *et al.*, 1994). Elle permet d'obtenir une dimérisation des protéines, cependant, les homodimères formés ne peuvent pas se fixer à l'ADN. Les protéines formées restent en phase, mais les exons 4 et 5 qui codent pour le domaine de liaison à l'ADN sont

perdus. Cette mutation aboutie à une perte de la lignée lymphoïde, alors que la mutation hétérozygote aboutie à la formation de lymphomes thymiques.

#### 4.6.2 La mutation nulle $\text{Ik}^{-/-}$

Lors de cette mutation, l'exon 8, essentiel pour la dimérisation d'Ikaros est enlevé. La protéine n'est plus stable et est de ce fait dégradée (Wang *et al.*, 1996). Cette mutation affecte spécifiquement Ikaros, et non les autres membres de la famille comme cela peut être le cas dans la mutation  $\text{Ik}^{\text{DN}}$ . Dans ces souris, aucun LB n'est présent, et le développement des LT est perturbé.

#### 4.6.3 La mutation plastic $\text{Ik}^{\text{Pstc}}$

Cette mutation correspond à une substitution du nucléotide  $\text{A}_{572}$  en  $\text{G}_{572}$  affectant la structure du troisième doigt de zinc se situant dans le domaine de liaison à l'ADN (Papathanasiou *et al.*, 2003). Elle a été obtenue par mutagénèse en utilisant un agent mutagène appelé ENU (EthylNitrosoUrée), et permet l'obtention d'une protéine dominante négative, avec des effets plus sévères que dans le modèle  $\text{Ik}^{\text{DN}}$ . Seules les souris hétérozygotes survivent assez longtemps pour naître. Cependant, ces souris naissent avec un stade pré-leucémique dû à une prolifération des LT.

#### 4.6.4 La mutation hypomorphe $\text{Ik}^{\text{L/L}}$

Cette mutation a été obtenue dans mon laboratoire d'accueil par insertion du gène de la  $\beta$ -galactosidase (*Lacz*, d'où la nomenclature  $\text{Ik}^{\text{L/L}}$ ) dans l'exon 2 (Kirstetter *et al.*, 2002). Ces souris ne sont pas nulles pour l'expression d'Ikaros (comme ce qui était attendu), mais elles expriment encore 10% de protéines résiduelles et fonctionnelles dû à un épissage alternatif se produisant entre les exons 2 et 4. Il est possible de détecter des LB dans ces souris, car les cellules se développent à partir d'un petit groupe de précurseurs. Cependant, les LB sont en partie bloqués au stade pro-B, et présentent un seuil d'activation plus bas que dans des souris WT. Ces souris meurent d'une leucémie T, comme la plupart des autres modèles murins décrits précédemment.

#### 4.6.5 La mutation des doigts de zinc $\text{Ik}^{\Delta}$

Cette mutation permet d'éliminer le doigt de zinc 1 ou 4 par délétion de l'exon 4 ou 6 respectivement (Schjerven *et al.*, 2013). Les doigts de zinc 2 et 3 permettent la fixation à la séquence consensus GGGAA et sont suffisants pour cela, alors qu'au contraire, les doigts de

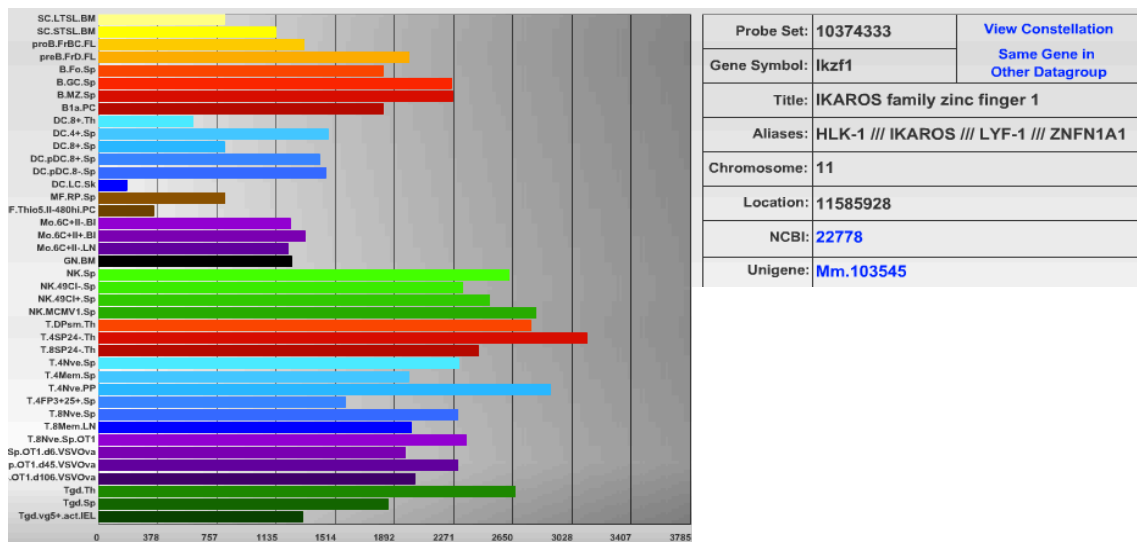
zinc 1 et 4 modulent la fixation sur des sites spécifiques. Ces souris présentent plus de cellules myéloïdes comparé aux souris WT, mais moins de cellules B matures, ainsi que de cellules dendritiques et de cellules NK. Les deux types de mutations aboutissent à une diminution du nombre de LT, avec un effet plus drastique dans la lignée  $Ik^{\Delta_{F4}/\Delta_{F4}}$ , ainsi qu'une perte des ganglions inguinaux pour cette lignée comparé aux souris WT et  $Ik^{\Delta_{F1}/\Delta_{F1}}$ .

#### 4.6.6 La mutation ciblée $Ik^{off}$

Cette mutation a été obtenue en insérant deux sites loxP flanquants l'exon 8. Elle permet une délétion de cet exon du gène *Ikzf1* lors de la mise en commun avec un modèle murin exprimant la recombinaison Cre. Les souris  $Ik^{off}$  ne présentent pas de phénotype particulier, mais lorsqu'elles sont croisées avec des souris exprimant la recombinaison Cre, elles développeront un phénotype plus ou moins sévère. La délétion peut être spécifique d'un type cellulaire, comme dans le modèle CD4-Cre  $Ik^{off}$ , ou non spécifique comme dans le modèle Rosa-Cre  $Ik^{off}$ , où la délétion s'effectue dans toutes les cellules après injection de tamoxifène.

### 4.7 Les fonctions d'Ikaros dans le système hématopoïétique

Ikaros, tout comme les autres membres de la famille, sont des facteurs de transcription impliqués dans l'hématopoïèse à différents niveaux. Je vais me limiter au facteur Ikaros dans ce chapitre, et à son expression au niveau de l'hématopoïèse (**Figure 24**).



**Figure 24: Expression d'Ikaros dans l'hématopoïèse.** Capture d'écran effectuée sur le site Immunological Genome pour le gène *Ikzf1*. L'expression d'Ikaros dans chaque population cellulaire est représentée par les barres de couleurs. Plus l'expression est élevée et plus la barre de représentation est grande. Les populations cellulaires sont représentées à gauche, ainsi que l'organe dans lequel a été effectué l'étude.

Modèle murin	Mutation	Génotype	Phénotype	Références
--------------	----------	----------	-----------	------------

Ik <sup>DN</sup> (Dominant négatif)	Délétion des exons 4 et 5 correspondant au domaine de liaison à l'ADN.	DN/DN	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Abs de la lignée lymphoïde.</li> <li>- Abs de défauts dans les autres lignées.</li> <li>- Abs de ganglions lymphatiques.</li> <li>- Peu d'activité des CSH&gt;100x.</li> <li>- 95% de souris mortes dans les 4 premières semaines.</li> </ul>	<i>Georgopoulos et al., 1994, Winandy et al., 1995, Boggs et al., 1998, Nichogiannopoulou et al., 1999.</i>
		+ /DN	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Développement normal des LT.</li> <li>- + de prolifération après stimulation du TCR.</li> <li>- Hémopathie lymphoïde.</li> <li>- + de prolifération des LT en présence d'IL-2.</li> <li>- Mort entre 3 et 6 mois de leucémies T</li> </ul>	
Ik <sup>-</sup> (Knock-Out)	Délétion de l'exon 8 correspondant au domaine de dimérisation.	-/-	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Peu d'activité des CSH&gt;100x.</li> <li>- + de cellules myéloïdes.</li> <li>- - de LT<math>\gamma\delta</math>.</li> <li>- + de LT SP CD4<sup>+</sup>.</li> <li>- Mort à 4 mois de leucémies T.</li> </ul>	<i>Wang et al., 1996, Wu et al., 1997, Boggs et al., 1998.</i>
		+/-	<ul style="list-style-type: none"> <li>- - de cellules B.</li> <li>- + de prolifération après stimulation du TCR.</li> <li>- + de prolifération des LT après stimulation avec l'IL-2.</li> <li>- + de LT en phase S.</li> </ul>	
Ik <sup>Plstc/Plstc</sup> (Plastic)	Mutation ponctuelle empêchant la liaison à l'ADN (le 3 <sup>ème</sup> doigt de zinc est altéré)	Plstc/Plstc	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Anémies (défaut dans la différenciation des granulocytes et des érythrocytes).</li> <li>- Abs de LT et de LB.</li> <li>- Létalité embryonnaire.</li> </ul>	<i>Papathanasiou et al., 2003.</i>
		+ /Plstc	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Blocage de la différenciation des LB au stade pro-B.</li> <li>- Abs des cellules érythroïdes.</li> <li>- Abs des LT et des LB.</li> <li>- Mort à 3-4 mois de leucémies T.</li> </ul>	
Ik <sup>L/L</sup> (Hypomorphe)	Délétion de l'exon 3 par insertion du gène de la $\beta$ -Gal.	L/L	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Abs LB fœtaux et matures (chez l'adulte).</li> <li>- Abs de pDC en périphérie.</li> <li>- Abs de ganglions.</li> <li>- + de prolifération des lymphocytes.</li> <li>- Mort à 4 mois de leucémies T.</li> </ul>	<i>Allman et al., 2006, Dumortier et al., 2006, Kirstetter et al., 2002, Sellars et al., 2009.</i>
		+ /L	<ul style="list-style-type: none"> <li>- + de prolifération des thymocytes.</li> </ul>	

**Table 1: Caractéristiques des lignées murines déficientes en Ikaros.** LT – Lymphocytes T, LB – Lymphocytes B, CSH – Cellules Souches Hématopoïétiques, TCR – Récepteur des cellules T, IL-2 – Interleukine 2, Abs – Absence, LT SP CD4<sup>+</sup> – Lymphocytes T Simples Positifs CD4<sup>+</sup>, pDC – Cellules Dendritiques plasmacytoïdes. .../...

Modèle murin	Mutation	Génotype	Phénotype	Références
--------------	----------	----------	-----------	------------

$Ik^{\Delta F}$ (Délétion du doigt de zinc)	Délétion de l'exon 4 ou de l'exon 6 correspondants aux doigts de zinc 1 et 4 resp.	$\Delta F/\Delta F$	- + de cellules myéloïdes. - Peu de cellules B matures, de cellules T, de DC et de NK. - Abs de ganglions dans la lignée $Ik^{\Delta F/\Delta F}$ .	<i>Schjerven et al., 2013</i>
$Ik^{cr}$ (Délétion ciblée)	Délétion de l'exon 8 correspondant au domaine de dimérisation.	f/f	- Abs de phénotype délétère sans croisement avec une lignée exprimant la recombinase Cre	<i>Geimer Le Lay et al., 2014.</i>

**Table 1 suite: Caractéristiques des lignées murines déficientes en Ikaros.** LT – Lymphocytes T, LB – Lymphocytes B, CSH – Cellules Souches Hématopoïétiques, TCR – Récepteur des cellules T, IL-2 – Interleukine 2, Abs – Absence, LT SP CD4<sup>+</sup> - Lymphocytes T Simples Positifs CD4<sup>+</sup>, pDC – Cellules Dendritiques plasmacytoïdes.

#### 4.7.1 Ikaros dans les progéniteurs pluripotents

Ikaros est un facteur favorisant le programme de différenciation lymphoïde dans les CSH. Il induit l'expression des gènes *Flt3* et *Notch1* par exemple et continue cette action dans les progéniteurs pluripotents (LMPP). D'un autre côté, Ikaros réprime les programmes érythroïde et myéloïde. Sans Ikaros, les programmes transcriptionnels se désorganisent empêchant la différenciation en lymphocytes, par manque de CLP et d'ETP (*Yoshida et al., 2010, Ng et al., 2009*).

#### 4.7.2 Ikaros dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes

Mon équipe d'accueil a montré que des souris déficientes pour Ikaros (étude menée dans des souris  $Ik^{ul}$ ) ne possèdent plus de pDC en périphérie comparé à des souris WT, mais possèdent encore des pDC au niveau de la moelle osseuse bloquées à un stade précoce de différenciation. De plus, ces dernières surexpriment des gènes spécifiques de la lignée lymphoïde (*Allman et al., 2006*). Ikaros est donc un régulateur essentiel des pDC, car son absence est délétère pour cette lignée.

#### 4.7.3 Ikaros dans les lymphocytes B

Notre équipe a montré qu'Ikaros est requis lors de la commutation isotypique, permettant d'obtenir d'autres classes d'immunoglobulines (*Sellars et al., 2009*). Ikaros inhibe la commutation de classe de IgG2a et IgG2b. En périphérie, Ikaros fixe le seuil d'activation des LB lors de la rencontre avec un antigène, mais il régule aussi la co-stimulation des LT,

empêchant une hyper-prolifération des LB activés (*Sellars et al.*, 2009). De plus, Ikaros est important lors de la différenciation des cellules pre-B, car il permet d'atténuer le signal IL-7. Sans ce FT, les cellules pre-B restent bloquées à un stade précoce (*Heizmann et al.*, 2013).

#### **4.7.4 Ikaros dans les lymphocytes T**

Ikaros est important dans les LT, car il régule les gènes de la voie Notch et joue le rôle de suppresseur de tumeur. Notre équipe a montré qu'en l'absence d'Ikaros, la voie Notch reste activée induisant des lymphomes T (*Dumortier et al.*, 2006). De plus, mon équipe d'accueil a montré que Ikaros est fortement exprimé au stade de différenciation thymocytaire DN4, ce qui permet de réprimer la voie Notch, essentielle pour des stades plus précoces (*Kleinmann et al.*, 2008, *Geimer Le Lay et al.*, 2014), mais il permet aussi l'extinction du programme des cellules souches (*Oravec et al.*, 2015).

Plusieurs études ont également impliqué Ikaros dans la régulation de la différenciation des lymphocytes T. Comme dans les LB, Ikaros régule le seuil d'activation des LT. En effet, en absence d'Ikaros, le TCR requiert un signal moins important pour être activé, et les cellules répondent également mieux à l'IL-2 aboutissant à une prolifération plus importante (*Avitahl et al.*, 1999).

Dans les LTCD8<sup>+</sup>, Ikaros est important pour réguler l'expression autocrine d'IL-2 (*O'Brien et al.*, 2014). Il est également important pour réguler la réponse à l'IL-12. En exprimant une isoforme dominante négative d'Ikaros dans des LTCD8<sup>+</sup>, la réponse à cette cytokine est 100 fois plus importante et aboutit à une prolifération et une survie accrues des cellules comparé aux cellules WT (*Clambey et al.*, 2013).

Ikaros est aussi important dans la différenciation des LTCD4<sup>+</sup>. En condition de différenciation vers la voie T<sub>H</sub>2, Ikaros inhibe l'expression de gènes impliqués dans la voie T<sub>H</sub>1 dont le facteur de transcription *T-bet*, ainsi que le gène *Ifng* (*Thomas et al.*, 2010). En parallèle, Ikaros permet l'expression d'IL-4, d'IL-13 et d'IL-5. En son absence, les cellules acquièrent un phénotype T<sub>H</sub>1 par diminution de l'expression de ces cytokines, ainsi que de GATA3 et cMaf, et expriment T-bet et STAT1 (*Quirion et al.*, 2009). Ikaros régule aussi l'expression d'IL-10 dans les LTCD4<sup>+</sup>. En son absence, les cellules expriment peu cette cytokine caractéristique des LTreg (*Umetsu et al.*, 2009). De plus, les LTreg avec un défaut d'expression d'Ikaros n'exercent plus leur rôle de régulation de la réponse immunitaire médiée par le facteur NFAT1 (*Shin et al.*, 2014). Récemment, Ikaros a été décrit comme un régulateur de l'expression du gène *Bcl-6* au cours de la différenciation en LT<sub>H</sub> (*Read et al.*, 2017). En effet, Ikaros se fixe sur le



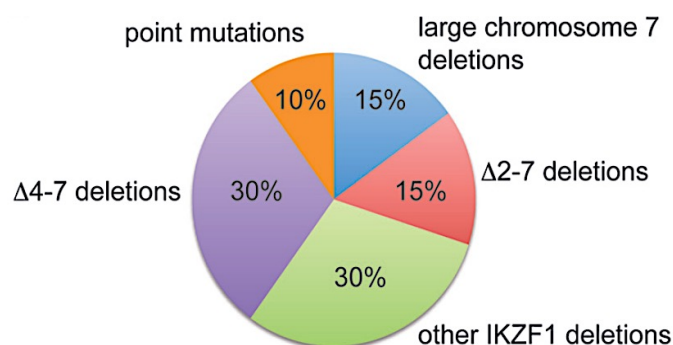
promoteur de ce gène pour activer sa transcription. De plus, les auteurs ont montré que Aiolos est également impliqué dans l'activation de la transcription de ce gène, et que Aiolos se fixe sur le promoteur complexé à STAT3. Enfin, Ikaros est également important au cours de la différenciation en LT<sub>H</sub>17. Il régule l'expression des gènes *Ahr*, *Rorc*, *Il17a*, et *Il22* et inhibe l'expression de gènes impliqués dans la différenciation T<sub>H</sub>1, comme *Tbx21*, ou Treg, comme *FoxP3* (Wong *et al.*, 2013). Ikaros régule également l'expression d'IL-22, car en son absence, les cellules expriment plus fortement cette cytokine, comparé aux cellules WT (Heller *et al.*, 2014). En 2012, Aiolos, un autre facteur de la famille Ikaros, a été décrit comme important au cours de la différenciation en LT<sub>H</sub>17. Il est exprimé grâce à STAT3 et AhR, et inhibe la production d'IL-2 permettant une différenciation efficace en LT<sub>H</sub>17 (Quintana *et al.*, 2012).

### 4.8 Ikaros et les pathologies humaines

Ikaros, ainsi que les autres membres de la famille sont des facteurs de transcription importants dans de nombreuses cellules hématopoïétiques. Ikaros est un suppresseur de tumeur, car tous les modèles murins déficients pour Ikaros développent des leucémies T. Dans ce sens, de nombreuses études ont montré qu'Ikaros est affecté au cours des leucémies aigües lymphoblastiques (LAL) de type T et B. Néanmoins, Ikaros, ainsi que les autres membres de la famille sont également impliqués dans d'autres pathologies.

#### 4.8.1 Ikaros et les leucémies de type B

De nombreuses études ont été menées sur les LAL-B adultes et pédiatriques. L'expression de l'isoforme Ik6 est souvent en cause et montre un impact des isoformes dominantes négatives exprimées au cours de l'hématopoïèse. Chez les enfants, d'autres études ont montré que les délétions dans le gène *Ikaros* sont présentes dans 15 à 20% des cas (**Figure 25**). Comme présenté dans la figure 25, d'autres mutations peuvent intervenir dans ces LAL-B. Entre autres, les délétions sur le chromosome 7 (contenant le gène *Ikaros*), ou des mutations ponctuelles, ou encore des délétions dans le locus contenant Ikaros, et aboutissant à une protéine privée du domaine de dimérisation, entraînent des leucémies (**Figure 25**).



**Figure 25: Représentation des différents types de mutations touchant Ikaros et entraînant une LAL-B.** Adapté de *Kastner et al.*, 2013. Distribution des défauts génétiques touchant Ikaros dans les différents cas de LAL-B. Les pourcentages représentés dérivent de données compilées provenant de plusieurs études (*Mullighan et al.*, 2009, *Dupuis et al.*, 2013).

#### 4.8.2 Ikaros et les leucémies de type T

Les mutations d'Ikaros chez l'homme sont très souvent associées à des leucémies de type B comme présenté précédemment. Cependant, tous les modèles murins utilisés présentent des leucémies de type T. Cette contradiction a d'abord poussé à peu étudier les leucémies T chez l'homme. Néanmoins, à l'heure actuelle, des études suggèrent que Ikaros serait impliqué dans une faible proportion de LAL-T (**Table 2**).

Study	No. of patients	Methods used	Cases with Ikaros abnormalities
Sun <i>et al.</i> <sup>[50]</sup>	18 (pediatric)	WB, EMSA, IF, RT-PCR	18/18
Nakase <i>et al.</i> <sup>[50]</sup>	5 (adult)	RT-PCR	0/5
Ruiz <i>et al.</i> <sup>[51]</sup>	9 (pediatric)	RT-PCR, WB	0/9
Maser <i>et al.</i> <sup>[52]</sup>	24 (16 cell lines and 8 primary leukemias)	CGH-array	2/24
Kuiper <i>et al.</i> <sup>[53]</sup>	7 (unknown origin)	CGH-array	0/7
Meleshko <i>et al.</i> <sup>[54]</sup>	14 (pediatric)	RT-PCR	1/14 (expression of dn Ik6 isoform)
Mullighan <i>et al.</i> <sup>[6]</sup>	50 (unknown origin)	CGH-array	2/50
Marçais <i>et al.</i> <sup>[31]</sup>	25 (adult, pediatric)	CGH-array, RT-PCR, WB, IF, cDNA sequencing	1/25

WB: Western blotting; EMSA: Electrophoretic mobility shift assay; IF: Immunofluorescence; RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction.

**Table 2: Etudes évaluant le statut d'Ikaros dans les LAL-T.** Adapté de *Kastner and Chan*, 2011.

Les études chez la souris ont montré que la déficience en Ikaros aboutie à l'activation continue de la voie Notch (*Dumortier et al.*, 2006). Ceci n'a pas encore été montré chez l'homme. Mis à part la première étude présentée dans la table 2 (présentant un biais car tous les patients ont une mutation d'Ikaros), la plupart des autres montrent que 15% des cas de LAL-T humaines sont dues à un défaut en Ikaros. Chez la souris, les études, dont une publiée par mon laboratoire d'accueil dans la souris *Ik<sup>Lt</sup>*, suggèrent que dans les LAL-T le promoteur normal du gène *Notch1* est délété très fréquemment (*Jeannet et al.*, 2010, *Marçais et al.*, 2010). Si le promoteur normal est muté, l'activation du gène *Notch1* se fait grâce à un promoteur cryptique se situant à l'intérieur du gène, aboutissant à une protéine tronquée. Cette dernière est constitutivement active, aboutissant à des leucémies de type T.

### 4.8.3 Ikaros dans d'autres pathologies

Ikaros est également impliqué dans d'autres pathologies comme le syndrome d'immunodéficience commune variable (CIVD), aboutissant à une perte de la production d'anticorps. Deux études ont montré que cette pathologie est due à des mutations hétérozygotes dans le gène *Ikzf1*, codant pour Ikaros (Hoshino et al., 2017, Kuehn et al., 2016). Les patients possèdent moins de LB et leur différenciation en plasmocytes lors d'une infection n'est plus effective entraînant une hypogammaglobulinémie. Certains patients possédant ces mutations ont également été montré comme possédant une MAI de type lupus érythémateux disséminé (Hoshino et al., 2017). En plus de ces pathologies, Ikaros, ainsi que les autres membres de la famille sont aussi étudiés pour leurs rôles dans d'autres pathologies humaines (**Table 3**). Cependant, ces études restent à confirmer, et ne sont pas aussi bien détaillées que celles effectuées dans les leucémies. Les relations entre Ikaros, les lymphocytes T<sub>H</sub>17 et certaines de ces pathologies seront abordées dans le chapitre suivant.

Maladie	IKZF1 (Ikaros)	IKZF2 (Helios)	IKZF3 (Aiolos)	IKZF4 (Eos)
Self reported allergy	x			
Crohn's disease	x			
Inflammatory bowel's disease	x		x	
Systemic lupus erythematosus	x	x	x	
Asthma		x	x	x
Primary biliary cirrhosis			x	
Systemic sclerosis			x	
Autoantibody positivity in type I diabetes			x	x
Psoriasis			x	
Vitiligo				x
Alopecia areata				x

**Table 3: Représentation de différentes pathologies humaines impliquant les facteurs de la famille Ikaros.** Compilation des données publiées obtenues à partir d'études par GWAS (Genome Wide Association Studies) pour chaque maladie représentée. Liste non-exhaustive des publications utilisées : Gateva et al., 2009 ; Barrett et al., 2008 ; Jostins et al., 2012 ; Swafford et al., 2011 ; Gudbjartsson et al., 2009 ; Bentham et al., 2015 ; Marenholz et al., 2015 ; Jin et al., 2012.

## **5. La famille Ikaros et les lymphocytes T<sub>H</sub>17 dans les pathologies humaines**

Jusqu'à la découverte des LT<sub>H</sub>17 et de l'IL-17A, les immunologistes s'accordaient sur le fait que les LT<sub>H</sub>1 étaient responsables de l'induction des MAI, telle que la sclérose en plaques (SEP). Néanmoins, plusieurs études ont montré récemment que ce sont les LT<sub>H</sub>17 qui sont impliqués principalement dans ces pathologies. De plus, plusieurs études par GWAS (Genome-Wide Association Studies) ont montré que les facteurs de transcription de la famille Ikaros étaient également impliqués dans les maladies auto-immunes.

### **5.1 La famille Ikaros et les maladies auto-immunes**

Comme décrit précédemment en 4.8.3, les facteurs de la famille Ikaros sont impliqués dans de nombreuses MAI. Ces études ont été menées par GWAS afin d'identifier de nouveaux loci impliqués dans ces maladies.

#### **5.1.1 Implication du facteur de transcription Ikaros**

Ikaros est codé par le gène *Ikzf1* présent sur le chromosome 7 chez l'homme. Les études menées par GWAS sur les patients ont permis d'associer des polymorphismes du gène *Ikzf1* et leurs maladies. Entre autres, les études de GWAS menées sur des patients atteints de lupus érythémateux disséminé (LED) ont montré que le locus de *Ikzf1* possède de nombreux polymorphismes (*Gateva et al.*, 2009).

Le gène *Ikzf1* est également décrit dans les maladies inflammatoires de l'intestin. Ces dernières regroupent la maladie de Crohn (*Barrett et al.*, 2008), mais également la colite ulcéreuse (*Jostins et al.*, 2012). De manière intéressante, dans la liste de gènes apparaissent également les gènes codant pour le récepteur de l'IL-23, ainsi que pour STAT3 et ROR $\gamma$ t. Ces trois protéines sont importantes lors de la différenciation et lors du maintien du phénotype des LT<sub>H</sub>17. Ainsi, le polymorphisme touchant le gène *Ikzf1* semble en synergie avec une dérégulation des facteurs impliqués lors de la différenciation en LT<sub>H</sub>17 au cours des MAI.

Enfin, Ikaros semble également impliqué dans le diabète de type 1 (*Swafford et al.*, 2011). Le fait de trouver un polymorphisme nucléotidique pour ce gène montre que cette maladie qui est une maladie auto-immune peut avoir une origine génétique en plus du facteur environnemental.

### 5.1.2 Le facteur de transcription Helios dans les MAI

Helios, codé par le gène *Ikzf2*, est également touché par un polymorphisme dans certaines MAI. Les polymorphismes de ce gène sont associés à l'asthme, ainsi qu'à l'infarctus du myocarde (*Gudbjartsson et al.*, 2009). Helios est également associé au LED tout comme le facteur Ikaros (**Table 4**).

Associated SNP	Chr.	Gene within 200 kb of SNP	Gene within same LD block as SNP <sup>a</sup>	Immune phenotype in mouse model <sup>b</sup>	Coding variant	cis eQTL with SNP	Functional and/or fine-mapping studies		Likely causal gene <sup>c</sup>
							Gene	Refs.	
rs3768792	2	<i>IKZF2</i>	<i>IKZF2</i>	<i>IKZF2</i>			<i>IKZF2</i>	42	<i>IKZF2</i>
rs9311676	3	<i>ABHD6, RPP14, PXX, PDHB, KCTD6, ACOX2, FAM107A, FAM3D</i>	<i>PXX, PDHB</i>			<i>ABHD6, PXX</i>	<i>ABHD6, PXX</i>	43 44	<i>ABHD6, PXX</i>
rs564799	3	<i>SCHIP1, IL12A</i>	<i>IL12A</i>	<i>IL12A</i>		<i>IL12A</i>			<i>IL12A</i>
rs10028805	4	<i>BANK1</i>	<i>BANK1</i>	<i>BANK1</i>		<i>BANK1</i>	<i>BANK1</i>	45	<i>BANK1</i>
rs7726414	5	<i>C5orf15, VDACL1, TCF7, SKP1</i>	<i>TCF7, SKP1</i>	<i>TCF7</i>		<i>SKP1</i>			<i>TCF7, SKP1</i>
rs10036748	5	<i>IRGM, ZNF300, GPX3, TNIP1, ANXA6, CCDC69, GM2A, SLC36A3</i>	<i>TNIP1</i>	<i>TNIP1, ANXA6</i>			<i>TNIP1</i>	46	<i>TNIP1</i>
rs2431697	5	<i>C1QTNF2, C5orf54, SLU7, PTTG1, MIR146A, 3142</i>	Intergenic	<i>PTTG1</i>			<i>MIR146A</i>	47	<i>MIR146A</i>
rs1270942	6	<i>MHC<sup>d</sup></i>							
rs9462027	6	<i>C6orf106, SNRPC, UHRF1BP1, TAF11, ANKS1A</i>	<i>UHRF1BP1</i>			<i>UHRF1BP1, ANKS1A, C6orf106</i>	<i>UHRF1BP1</i>	48	<i>UHRF1BP1</i>
rs6568431	6	<i>PRDM1, ATG5</i>	Intergenic	<i>PRDM1, ATG5</i>			<i>PRDM1, ATG5</i>	49, 50	<i>PRDM1, ATG5</i>
rs6932056	6	<i>TNFAIP3, PERP</i>	<i>TNFAIP3</i>	<i>TNFAIP3, PERP</i>	<i>TNFAIP3</i>		<i>TNFAIP3</i>	51	<i>TNFAIP3</i>
rs849142	7	<i>JAZF1, CREB3</i>	<i>JAZF1</i>			<i>JAZF1</i>			<i>JAZF1</i>
rs4917014	7	<i>ZPBP, C7orf72, IKZF1</i>	<i>IKZF1</i>	<i>IKZF1</i>			<i>IKZF1</i>	52	<i>IKZF1</i>
rs10488681	7	<i>CALU, SPN13W, SODS10C, FLNC, ATP6V1F, IRF5, TNPO3, TSPAN33</i>	<i>IRF5, TNPO3</i>	<i>IRF5</i>		<i>IRF5, TNPO3</i>	<i>IRF5</i>	53	<i>IRF5</i>

**Table 4: Gènes associés avec le lupus érythémateux disséminé.** Adapté de *Bentham et al.*, 2015. Liste de gènes candidats retenus pour induire le phénotype de LED. Le gène *Ikzf2*, ainsi que le gène *Ikzf1* sont encadrés en rouge.

### 5.1.3 Aiolos dans les pathologies humaines

Aiolos est codé par le gène *Ikzf3*. Les études de GWAS effectuées sur les patients ont révélé que ce gène est impliqué dans les maladies inflammatoires de l'intestin, mais aussi dans le diabète de type 1, ou encore dans le psoriasis. C'est également un gène candidat dans le LED (*Bentham et al.*, 2015). Aiolos serait également impliqué dans les allergies de la peau, ainsi que dans les rhinites allergiques et dans l'asthme (*Marenholz et al.*, 2015). La dérégulation de *Ikzf3* dans ces pathologies est parallèle à celle d'*Il4* (codant pour IL-4 qui est une cytokine importante pour les LT<sub>H</sub>2).

### 5.1.4 Eos dans les pathologies humaines

Eos, codé par le gène *Ikzf4*, est impliqué dans le diabète de type 1, mais également dans le vitiligo qui est une maladie de peau entraînant la destruction des mélanocytes (*Jin et al.*, 2012). Enfin, Eos est aussi impliqué dans les maladies asthmatiques, tout comme Helios et Aiolos, mais dans une moindre mesure que ces derniers.

## 5.2 Les lymphocytes T<sub>H</sub>17 dans les pathologies auto-immunes

L'émergence de cette sous-population de lymphocytes TCD4<sup>+</sup> a remis en question le fait que les pathologies soient T<sub>H</sub>1-dépendantes. A l'heure actuelle, la plupart des pathologies sont décrites comme étant T<sub>H</sub>17-dépendantes, dont la SEP qui est la plus étudiée.

### 5.2.1 Les lymphocytes T<sub>H</sub>17 et le Lupus Erythémateux Disséminé

Le LED est une maladie auto-immune chronique dépendante des LT<sub>H</sub>17. Ces derniers sont présents en plus grand nombre chez les patients, et sécrètent plus d'IL-17 dans les organes inflammés (*Henriques et al.*, 2010, *Shah et al.*, 2010). De plus, ces études ont montré que la sévérité de la maladie est reliée à la concentration d'IL-17 circulante (*Shah et al.*, 2010), ainsi qu'à la concentration en TNF, en IL-2 et en IFN- $\gamma$ . Une étude de *Du et al.* a mis en évidence en 2014 que l'atteinte rénale est dépendante de la concentration en IL-23 circulante (*Du et al.*, 2014a). En 2010, il avait déjà été observé qu'une déficience en IL-23R prévenait le développement de cette atteinte rénale chez les patients atteints de LED (*Kyttaris et al.*, 2010).

### 5.2.2 Les lymphocytes T<sub>H</sub>17 dans la polyarthrite rhumatoïde

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est caractérisée par l'inflammation des membranes synoviales. L'IL-17 produite dans les articulations induit l'inflammation chez les patients atteints de PR. De plus, les cytokines présentes dans le milieu induisent une plasticité des LT<sub>H</sub>17 présents vers la sous-population LT<sub>H</sub>17/LT<sub>H</sub>1, car l'IL-12 est présente en forte quantité alors que peu de TGF- $\beta$ 1 est présent, permettant l'expression de RORC2 et T-bet permettant d'accentuer la pathogénicité des cellules T<sub>H</sub>17 (*Nistala et al.*, 2010). Il a été également montré dans cette pathologie, que le taux d'IL-17 circulante est plus important que chez les sujets sains (*Liu et al.*, 2012). Enfin, le recrutement des LT<sub>H</sub>17 vers le lieu de l'inflammation est dépendant d'une interaction entre CCR6 exprimé par les lymphocytes et CCL20 exprimé par les synoviocytes (*Hirota et al.*, 2007).

Cependant, dans cette pathologie, les rôles du TNF et de l'IL-22 sont encore discutés. En effet, des résultats contradictoires obtenus par deux équipes indépendantes impliquent que les LT<sub>H</sub>17 fonctionnent de manière TNF-indépendante dans la PR. En effet, en utilisant un anticorps pour bloquer l'activité du TNF, *Notley et al.* augmentent la production d'IL-17 et l'expansion des LT<sub>H</sub>17 dans les ganglions (*Notley et al.*, 2008). Cependant, le nombre de LT<sub>H</sub>17 est moins important dans les articulations infiltrées aboutissant à une diminution de la pathologie. *Park et al.* quant à eux, montrent que la production d'IL-17 est augmentée dans les articulations de

manière TNF-dépendante (*Park et al.*, 2012). Le rôle de l'IL-22 est aussi discuté. En effet, *Zhang et al.* montrent que l'augmentation d'IL-17 est corrélée à une augmentation d'IL-22 et que ces paramètres régulent l'activité de la maladie (*Zhang et al.*, 2012). D'un autre côté, *van Hamburg et al.* ont montré que l'inflammation synoviale médiée par les LT<sub>H</sub>17 et l'IL-17 est indépendante de l'IL-22 et des cellules T<sub>H</sub>22 (*van Hamburg et al.*, 2013).

### 5.2.3 Les lymphocytes T<sub>H</sub>17 et l'arthrite juvénile idiopathique

L'arthrite juvénile idiopathique (AJI) représente l'ensemble des atteintes inflammatoires articulaires sans cause reconnue, et débutant avant l'âge de 16 ans. Comme dans la PR, les cytokines présentes dans le milieu induisent la différenciation en LT<sub>H</sub>17. Une étude a montré que les patients atteints d'AJI ont plus de cellules T<sub>H</sub>17/T<sub>H</sub>1 produisant de l'IL-17 et de l'IFN- $\gamma$  (*Cosmi et al.*, 2011). De plus, ils ont montré que les cellules CD4<sup>+</sup> CD161<sup>+</sup> et produisant seulement de l'IL-17A, peuvent facilement devenir des cellules produisant de l'IL-17A et de l'IFN- $\gamma$ , ou seulement de l'IFN- $\gamma$ . Dans cette pathologie également, l'expression de CCR6 et de CCL20 permet le recrutement des LT<sub>H</sub>17.

### 5.2.4 Les lymphocytes T<sub>H</sub>17 dans le diabète de type 1

Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune due à la destruction des cellules productrices d'insuline par les LTc. Cette destruction entraîne la dépendance à vie d'injections d'insuline par le patient. Les LT<sub>H</sub>17 ont été décrits comme impliqués dans cette maladie. En effet, le nombre de cellules dans les ganglions, ainsi que ceux circulants, est beaucoup plus élevé chez les patients souffrants de diabète (*Ferraro et al.*, 2011, *Honkanen et al.*, 2010). Comme dans les maladies précédemment citées, la dérégulation de la balance entre LT<sub>H</sub>17 et LTreg entraîne une réponse auto-immune, car la réponse inflammatoire médiée par les LT<sub>H</sub>17 n'est plus régulée.

### 5.2.5 Les lymphocytes T<sub>H</sub>17 et la sclérose en plaque

La sclérose en plaque est une maladie chronique inflammatoire entraînant la destruction de la myéline entourant les neurones du système nerveux central (SNC). La première étape est la destruction de la barrière hémato-encéphalique qui protège le SNC du système immunitaire, par des LT<sub>H</sub>17 autoréactifs qui sécrètent de l'IL-17 et de l'IL-22 (*Kebir et al.*, 2007). Le nombre de LT<sub>H</sub>17 est plus important chez les patients affectés, que chez ceux en rémission, et ces lymphocytes expriment des marqueurs d'activations à leurs surfaces, impliqués dans l'adhésion

(Schirmer *et al.*, 2013). De plus, il a été montré que chez les patients avec une pathologie plus sévère, le nombre de cellules CD4<sup>+</sup>IL-23R<sup>+</sup> est plus important (Christensen *et al.*, 2013) et corrèle avec une étude précédente montrant que les patients atteints de SEP possèdent plus de cellules CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> (Wang *et al.*, 2011).

Chez la souris, le modèle d'EAE utilisé, et mimant la sclérose en plaque chez l'homme, a également mis en évidence que les cellules T<sub>H</sub>17 sont à l'origine de l'EAE au contraire des cellules T<sub>H</sub>1 (Jäger *et al.*, 2009). En effet, après transfert des cellules, seules les souris ayant reçues des LT<sub>H</sub>17 contractent la maladie, au contraire de celles ayant reçues des LT<sub>H</sub>1.

### 5.2.6 Les lymphocytes T<sub>H</sub>17 dans les maladies inflammatoires de l'intestin

La maladie de Crohn et la colite ulcéreuse sont des maladies chroniques dues à une réponse inflammatoire du système immunitaire contre la flore intestinale. L'expression d'IL-17, ainsi que le pourcentage de cellules T<sub>H</sub>17 et T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>17 sont plus importants chez les patients (Fujino *et al.*, 2003, Rovedatti *et al.*, 2009) surtout situées au niveau de la lamina propria du petit intestin. L'IL-21 joue également un rôle dans la maladie, car en bloquant cette cytokine chez la souris, Fina *et al.* ont pu observer une protection contre la colite ulcéreuse, ainsi qu'une incapacité à augmenter le nombre de LT<sub>H</sub>17 (Fina *et al.*, 2008).

### 5.2.7 Les lymphocytes T<sub>H</sub>17 et le psoriasis

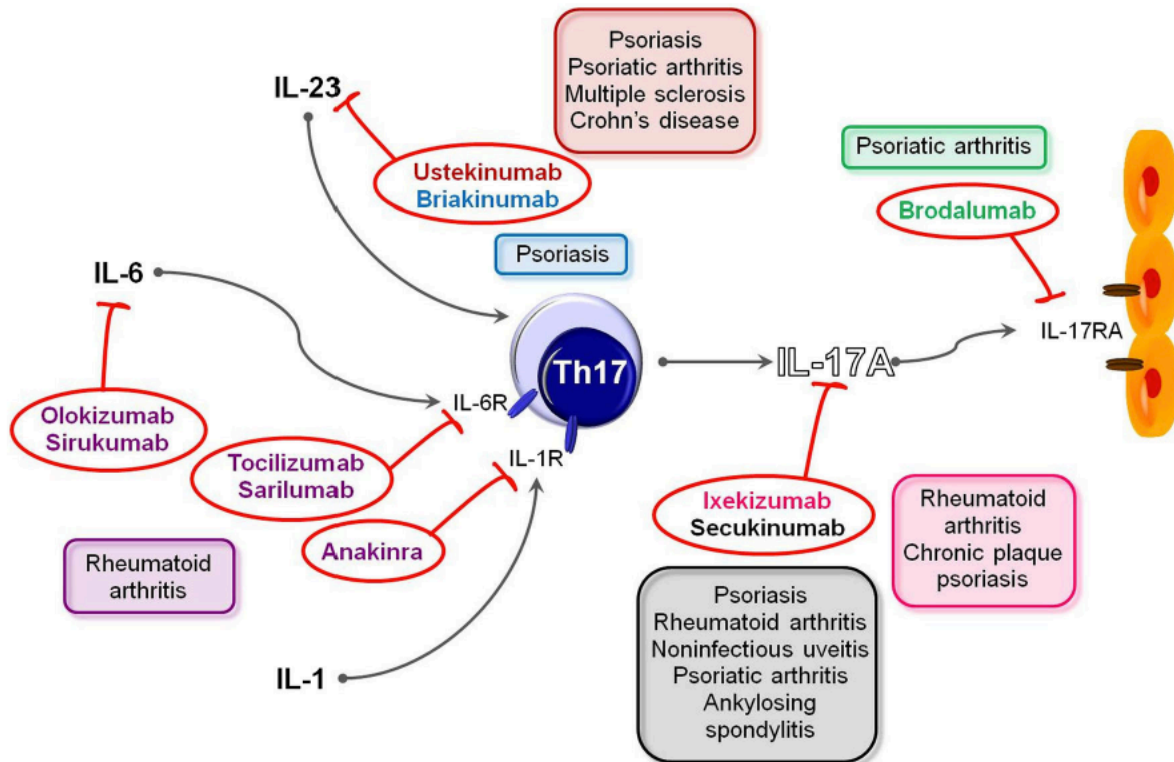
Le psoriasis est une maladie inflammatoire de la peau entraînant une augmentation du nombre de LT<sub>H</sub>17 au niveau des lésions de la peau ainsi que dans le sang (Kagami *et al.*, 2010). Cependant, l'implication de l'IL-17A dans cette pathologie est sujet à débat. En effet, Arican *et al.* ont montré que la concentration est la même entre les patients et les sujets sains, alors que Coimbra *et al.* ont montré que la concentration était moins forte chez les patients comparé à des sujets sains (Arican *et al.*, 2005, Coimbra *et al.*, 2010). De plus, la sévérité de la maladie dépend également de l'expression d'IL-1 $\beta$ , d'IL-22, d'IL-21 et d'une réduction du nombre de LTreg.

### 5.2.8 Traitements ciblant les lymphocytes T<sub>H</sub>17

Les études menées jusqu'à présent sur les différentes pathologies ont permis de cibler des compartiments de la voie des LT<sub>H</sub>17, et de tester des traitements pour diminuer la sévérité des symptômes. La plupart des médicaments utilisés et présentés ci-dessous (**Figure 26**) sont en phase d'essai (phase 2 ou 3), sauf le Tocilizumab<sup>®</sup> et l'Anakinra<sup>®</sup> qui ont été approuvés comme



traitements dans la PR. Le premier est un anticorps monoclonal humanisé qui bloque l'action des récepteurs de l'IL-6 et possède une action immunosuppressive. Le deuxième est un antagoniste des récepteurs de l'IL-1 et possède également une action immunosuppressive.



**Figure 26: Médicaments ciblant la voie  $T_H17$  et leur utilisation dans les pathologies humaines.** Adapté de *Tabarkiewicz et al.*, 2015. Les pathologies dans lesquelles sont utilisés les médicaments sont représentées de la même couleur que ceux-ci. Les flèches grises représentent une action activatrice de la part des molécules, alors que les traits rouges représentent une action inhibitrice de la part des molécules.

### 5.3 Les lymphocytes $T_H17$ dans le cancer

Le rôle des  $LT_H17$  dans le cancer est à l'heure actuelle discuté. En effet, si des études montrent le rôle anti-tumoral de ces cellules dans le cancer, d'autres mettent en avant l'effet pro-tumoral. Je vais passer en revue dans ce chapitre les données connues et les différents rôles des  $LT_H17$  dans le cancer.

#### 5.3.1 Rôle pro-tumoral des lymphocytes $T_H17$

Les  $LT_H17$  peuvent être considérés comme pro-tumoraux à plusieurs titres. Tout d'abord, leur capacité à se différencier en d'autres sous-populations leur permet de sécréter d'autres cytokines mis à part l'IL-17, l'IL-21 ou encore l'IL-22. Le fait que les  $LT_H17$  puissent dériver en  $LTreg$  permet l'expression d'IL-10, induisant une fonction immuno-suppressive sur les

cellules TCD8<sup>+</sup>. Ces cellules T<sub>H</sub>17/Treg sont très stables et expriment à la fois FoxP3 et ROR $\gamma$ t (Ye *et al.*, 2013). Cependant, une étude montre que ces cellules T<sub>H</sub>17/Treg dériveraient plutôt de LTreg pouvant exprimer les facteurs spécifiques des LT<sub>H</sub>17 (Du *et al.*, 2014b). En plus de cette conversion, les LT<sub>H</sub>17 peuvent exercer leur rôle immuno-suppresseur grâce à l'expression d'ectonucleotidases à leur surface. CD39 et CD73 sont importantes pour la conversion de l'ATP en adénosine permettant l'inhibition de la prolifération et de la sécrétion de cytokines par les LT (Dwyer *et al.*, 2007 ; Deaglio *et al.*, 2007). Ces cellules T<sub>H</sub>17 n'expriment pas le FT FoxP3 au contraire des cellules T<sub>H</sub>17/Treg, néanmoins, elles possèdent une activité immuno-suppressive sur les LTc ainsi que sur les LT<sub>H</sub>1. Enfin, l'IL-17 sécrétée par les LT<sub>H</sub>17 est importante lors de l'angiogenèse (vascularisation de la tumeur) et pour l'expression du facteur VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) dans la tumeur (Numasaki *et al.*, 2003, Numasaki *et al.*, 2005). En plus d'induire l'expression de VEGF par les cellules tumorales et les fibroblastes, l'IL-17 induit également l'expression d'IL-6 par les cellules tumorales activant ainsi l'expression des gènes STAT3-dépendant (Wang *et al.*, 2009). L'IL-17 active aussi le recrutement des cellules MDSC (Myeloid-Derived Suppressor Cells) dans la tumeur (He *et al.*, 2010), ainsi que leur développement et leur fonction suppressive.

Néanmoins, les LT<sub>H</sub>17 ne semblent pas être les cellules essentiellement à l'origine de la production d'IL-17. En effet, plusieurs études ont montré que les LT<sub>H</sub>17 représentaient un faible pourcentage des cellules sécrétant de l'IL-17 dans l'environnement tumoral, et que ce sont d'autres cellules qui sont impliquées dans ce mécanisme. Entre autres, un sous-type de macrophages, les neutrophiles, les cellules MDSC, les cellules endothéliales, ainsi que les cellules tumorales peuvent produire de l'IL-17A (Punt *et al.*, 2015). Néanmoins, en fonction de la tumeur et du contexte inflammatoire, les LT<sub>H</sub>17 jouent un rôle différent dans la maladie (**Figure 27**).

### 5.3.2 Rôle anti-tumoral des lymphocytes T<sub>H</sub>17

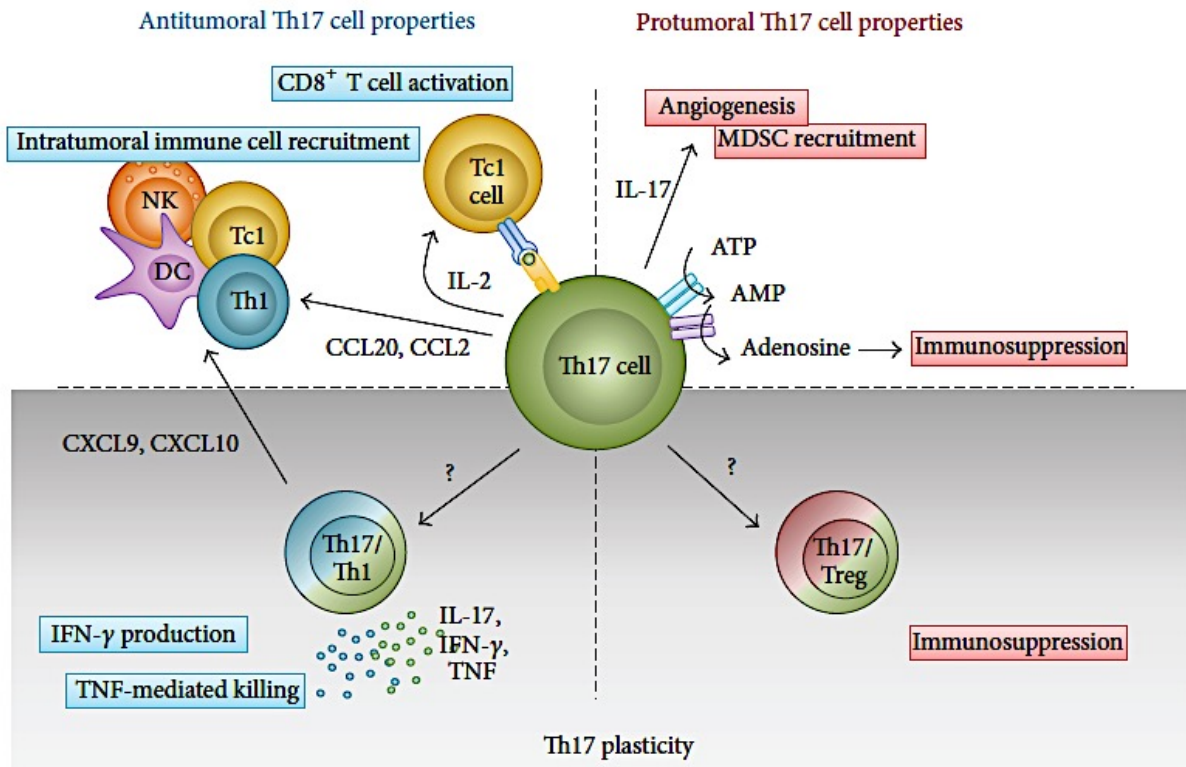
Les LT<sub>H</sub>17 sont décrits dans plusieurs études comme des cellules possédant un effet anti-tumoral. En effet, dans des souris déficientes pour IL-17 ou ROR $\gamma$ t, les tumeurs grossissent beaucoup plus comparé aux souris proficientes pour ces facteurs. De plus, dans les souris IL-17<sup>-/-</sup>, le grossissement de la tumeur est dû à un déficit des cellules NK et T exprimant l'IFN- $\gamma$  au niveau du ganglion drainant, ainsi que dans la tumeur (Kryczek *et al.*, 2009). L'effet des LT<sub>H</sub>17 dans la résorption de la tumeur est indirect. Les cellules permettent le recrutement et l'activation des LTCD8<sup>+</sup> dans la tumeur par une action sur les cellules dendritiques. Les LT<sub>H</sub>17 dans la

tumeur activent l'expression de CCL20 permettant le recrutement des DC dans la tumeur. Une fois chargé en peptide, les DC migrent vers le ganglion drainant où elles activeront les LTCD8<sup>+</sup> (*Martin-Orozco et al.*, 2009). D'autres études ont montré qu'en plus de cet effet indirect, les LT<sub>H</sub>17 pourraient également avoir un effet direct sur les LTCD8<sup>+</sup> via les DC et la sécrétion d'IL-2. Enfin, les LT<sub>H</sub>17 induiraient le recrutement des LTc via l'expression de CCL20 et de CCL2 permettant la résorption de la tumeur (*Guery et al.*, 2014).

La plasticité des LT<sub>H</sub>17 est également un facteur impliqué dans la résorption de la tumeur. En effet, les cellules T<sub>H</sub>17/T<sub>H</sub>1 sécrétant de l'IL-17 et de l'IFN- $\gamma$  expriment CXCR4, CCR6, CD161 et sécrètent également IL-2 et le TNF. Tous ces facteurs permettront l'expression de CXCL-9 (Chemokine ligand) et CXCL-10 par les cellules tumorales permettant le recrutement des LTCD8<sup>+</sup> dans la tumeur (*Kryczek et al.*, 2009). Les LT<sub>H</sub>17 n'exprimant par l'IFN- $\gamma$  perdent cette capacité, car ce dernier est important pour l'activation des fonctions cytotoxiques des LTCD8<sup>+</sup>, et des cellules NK. L'IFN- $\gamma$  est aussi impliqué dans la fonction anti-angiogénique au niveau de la tumeur et exerce aussi le rôle de facteur anti-prolifératif.

Néanmoins, comme lors de l'effet pro-tumoral, la plasticité des LT<sub>H</sub>17 n'est pas bien comprise. Est-ce que l'environnement en cytokines présent dans la tumeur permet une différenciation vers le phénotype T<sub>H</sub>1, ou est-ce que ce sont des cellules T<sub>H</sub>17/T<sub>H</sub>1 qui sont directement recrutées au niveau de la tumeur ? Le fait que l'expression soit faible, voire nulle, dans les tumeurs ne favorise pas cette conversion. De plus, le TGF- $\beta$ , inhibiteur de cette différenciation, est fortement exprimé au niveau des tumeurs (*Shurin et al.*, 2006).

Les effets pro- en anti-tumoraux décrits précédemment sont résumés dans la figure 27. Dans ce schéma est mis en avant la plasticité des LT<sub>H</sub>17, importante pour la régulation de l'effet tumoral ou anti-tumoral médié par ces cellules.



**Figure 27: Rôle des cellules T<sub>H</sub>17 dans l'immunité tumorale.** Adapté de *Guery and Hugues, 2015*. Dépendant de leur plasticité, les LT<sub>H</sub>17 exercent un rôle pro- ou anti-tumoral. La production d'IL-17 peut contribuer à l'angiogenèse, ainsi qu'au recrutement des cellules MDSC. De plus, l'expression de TGF- $\beta$  peut également induire l'immuno-suppression médiée par les LT<sub>H</sub>17 en induisant l'expression d'ectonucléotidases. A l'inverse, les LT<sub>H</sub>17 peuvent exercer un rôle anti-tumoral en induisant le recrutement de cellules effectrices immunitaires dans la tumeur, ainsi que l'activation des LTC8-cytotoxiques spécifiques de la tumeur. La plasticité des LT<sub>H</sub>17 (représenté dans le panneau gris) peut également conférer des fonctions supplémentaires à ces cellules. Les cellules T<sub>H</sub>17/Treg expriment IL-17 et FoxP3, et acquièrent des propriétés immuno-suppressives. D'un autre côté, les cellules T<sub>H</sub>17/T<sub>H</sub>1 produisent de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-17 leur conférant une activité anti-tumorale par recrutement de cellules immunitaires.

## **1. Souris**

### **1.1 Souris Ik<sup>L/L</sup>**

Ces souris ont été générées dans mon laboratoire d'accueil et décrites (*Kirstetter et al.*, 2002). Elles possèdent une mutation qui a été obtenue par insertion du gène de la  $\beta$ -galactosidase (*Lacz*, d'où la nomenclature Ik<sup>L/L</sup>) dans l'exon 3. Ces souris ne sont pas nulles pour l'expression d'Ikaros et expriment encore 10% de protéines résiduelles et fonctionnelles dû à un épissage alternatif se produisant entre les exons 2 et 4. Les souris ont un fond C57/BL6 et sont maintenues en atmosphère spécifique dit SPF (Specific Pathogen Free).

### **1.2 Souris CD4-Cre Ik<sup>Cre</sup>**

Les souris Ikaros floxées possèdent 2 sites LoxP autour de l'exon 8 (codant pour le domaine de dimérisation). Cette construction a été décrite dans la littérature (*Wang et al.*, 1996), et a permis la génération de souris transgéniques par insertion de la construction dans les cellules ES. Ces souris ont été croisées avec des souris CD4-Cre<sup>TR</sup> (*Geimer Le Lay et al.*, 2014) générant des souris appelées ICC (Ikaros CD4-Cre), et sont déficientes pour Ikaros spécifiquement dans les cellules T, si elles expriment la Cre. Les souris ont un fond C57/BL6 et sont maintenues en atmosphère SPF.

### **1.3 Souris Rosa-Cre Ik<sup>Cre</sup>**

Les souris Ikf/f ont été croisées avec des souris Rosa-Cre<sup>ERT2</sup> (*Badea et al.*, 2003). Ces souris sont déficientes pour Ikaros après injection de tamoxifène de manière intra-péritonéale. Le tamoxifène sous forme de poudre a été resuspendu dans de l'huile de colza, sous agitation et dans le noir pendant 48h à une concentration de 20mg/mL, aliquoté, puis conservé à -20°C. Avant injection, les souris ont été pesées afin de déterminer le volume utile, puis 3 injections à 2j d'écart ont été effectuées. Elles ont été sacrifiées 1 semaine après la première injection de tamoxifène. Les souris ont un fond C57/BL6 et sont maintenues en atmosphère SPF.

### **1.4 Souris CD45.1**

Les souris C57/BL6<sup>CD45.1</sup> (Ly5.1) sont utilisées dans les expériences de co-culture afin de les différencier des cellules provenant des autres lignées C57/BL6<sup>CD45.2</sup> (Ly5.2). Ces souris sont maintenues en atmosphère SPF et ont un fond C57/BL6 comme les autres lignées utilisées dans cette étude.

## **2. Cellules et culture cellulaire**

### **2.1 Milieux de culture, réactifs et plaques pour culture**

#### **Pour les cellules ILC87 et les expériences sur les LPL :**

- RPMI1640 + 25mM HEPES + 10% sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur (#805) + 1mM de pyruvate de sodium + 2mM de L-Glutamine (ajoutée extemporanément ; Life technologies) + 1% pénicilline/streptomycine + 50µg/mL gentamicine.

#### **Pour le transcriptome et le ChIP-seq :**

- IMDM + 10% sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur (#805) + 2mM de L-Glutamine (ajoutée extemporanément ; Life technologies) + 50µM β-mercaptoéthanol + 1% pénicilline/streptomycine + 50µg/mL gentamicine.

- Plaques multipuits 48 puits BD Falcon fond plat avec couvercle, Cat n°353078.

#### **Pour les autres expériences :**

- IMDM avec GLUTAMAX-I + 10mM HEPES + 10% sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur (#96) + Acides Aminés Non-Essentiels + 1mM de pyruvate de sodium + 50µM β-mercaptoéthanol + 1% pénicilline/streptomycine.

- Plaques multipuits 96 puits Nunc fond plat Maxisorp, Cat n°442404 + Couvercles Nunc, Cat n°264122.

#### **Réactifs :**

- LEAF (Low Endotoxin, Azide Free) Purified anti-mouse CD3ε, Biolegend, Clone: 145-2C11, Concentration stock: 1mg/mL

- LEAF Purified anti-mouse CD28, Biolegend, Clone: 37-51, Concentration stock: 1mg/mL

- LEAF Purified anti-mouse IFN-γ, Biolegend, Clone: XMG1.2, Concentration stock: 1mg/mL

- BD Pharmingen purified NA/LE rat anti-mouse IL4, Concentration stock: 1mg/mL

- Goat Affinity Purified Antibody to Hamster IgG (whole molecule), MP Biomedicals, Cat n°56984, Concentration stock: 1mg/mL.

- rmIL-6: Peprotech, Cat n°216-16, Concentration stock: 10µg/mL

- rhTGF-β1: Peprotech, Cat n°100-21C, Concentration stock: 5µg/mL

- rh rhTGF-β3: Miltenyi, Cat n°130-094-007, Concentration stock: 5µg/mL

### **2.2 Culture cellulaire**

Les cellules ILC87 (Ikaros Lck-Cre) sont dérivées d'un lymphome thymique, provenant d'une souris Lck-Cre<sup>+</sup> Ik<sup>fl</sup>. Cette lignée a été transduite avec le rétrovirus MIG1-Ik1-ER, codant

pour une protéine de fusion entre Ikaros et le domaine de liaison du ligand du récepteur des oestrogènes muté pour ne répondre qu'au 4-OHT, de même que pour la GFP, qui sont produit par un transcrit bi-cistronique contenant une séquence IRES. Les cellules GFP<sup>+</sup> ont été purifiées par tri cellulaire et amplifiées pour conduire à la lignée ILC87-Ik1-ER. La translocation d'Ikaros dans le noyau, et la régulation des gènes cibles d'Ikaros, est induite par l'ajout de 4-OHT (4-hydroxytamoxifen, H7904, Sigma-Aldrich) dans du milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute). Le 4-OHT est préparé dans de l'éthanol à une concentration finale de 100mM. Les cellules sont comptées et placées à une concentration de  $1.10^6$ /mL, puis elles sont traitées pendant 24h avec 100nM de 4-OHT ou d'éthanol.

Pour les expériences de transcriptome et de ChIP-sequencing, les LTCD4<sup>+</sup> naïfs (CD4<sup>+</sup> CD44<sup>low</sup> CD25<sup>-</sup> CD62L<sup>+</sup>) ont été triés, puis mis en culture en plaques Falcon à 500.000 cellules par puit dans du milieu IMDM (Iscove's Modified Dulbecco Medium) (FCS#805) pendant 3j contenant de l'anti-CD3 (0,25µg/mL), de l'anti-CD28 (1µg/mL), de l'anti-IL4 et de l'anti-IFN- $\gamma$  (2µg/mL), de l'IL-6 (20ng/mL) et du TGF- $\beta$ 1 (1ng/mL). Au préalable, les plaques ont été recouvertes avec un anticorps de chèvre pendant la nuit (55µg/mL) dans du PBS 1X à 4°C. Au jour 3, les cellules sont récupérées et stimulées pendant 4h en présence de milieu IMDM contenant du PMA (Phorbol 12-myristate-13-acetate) (50ng/mL), de l'ionomycine (500ng/mL) et du GolgiPlug (BD Biosciences) dilué au 1/1000<sup>smc</sup> avant analyse.

Pour les autres expériences, les LTCD4<sup>+</sup> naïfs (CD4<sup>+</sup> CD44<sup>low</sup> CD25<sup>-</sup> NK1.1<sup>-</sup> TCR $\gamma\delta$ ) ont été triés et mis en culture en plaque Nunc à 40.000 cellules par puit dans du milieu IMDM (FCS#96) pendant 3j contenant de l'IL-6 (10ng/mL), du TGF- $\beta$ 1 ou du TGF- $\beta$ 3 à des concentrations croissantes, et de l'anti-IL4 et de l'anti-IFN- $\gamma$  (10µg/mL) ou non. Au préalable, les plaques ont été recouvertes avec de l'anti-CD3 et de l'anti-CD28 (2µg/mL) pendant la nuit dans du PBS 1X à 4°C. Pour les expériences de mort cellulaire, les cellules ont été placées en plus en présence de Q-VD-Oph hydrate (ApexBio, Cat n°A1901, 20µM) ou de DMSO. Au jour 3, les cellules sont récupérées et stimulées pendant 2h avec du milieu contenant du PMA et de l'ionomycine (500ng/mL) et du GolgiPlug dilué au 1/1000<sup>smc</sup>. Pour les expériences de prolifération cellulaire, le CFSE (eBioscience SAS, Cat n°65-0850-84, solution stock :10mM) a été préalablement dilué 100 fois dans du milieu de culture.  $10^6$  cellules naïves ont été resuspendues dans 900µL de milieu, puis les 100µL de CFSE ont été ajoutés pour obtenir un volume final de 1mL. Le tout a été placé à 37°C pendant 10 minutes, puis lavé 3 fois avec 5mL de milieu. Les cellules ont ensuite été resuspendues et mises en culture pendant 3j. Pour le marquage, le kit Cytofix/Cytoperm de BD Biosciences a été utilisé afin de ne pas perdre le

signal émis par le CFSE. Dans le marquage, seuls le GM-CSF et l'IL-17A ont été utilisés, car le kit BD ne permet pas de perméabiliser le noyau, et ainsi de marquer les FT.

Pour les expériences de co-culture, les cellules exprimant le marqueur CD45.1 ou le marqueur CD45.2 ont été placées de manière égale dans les puits afin d'obtenir 40.000 cellules par condition. Ces cellules ont été récupérées à jour 3 et stimulées comme décrit dans le paragraphe précédent.

Pour les expériences de LPL, les cellules ont été placées en culture pendant 2h à 37°C et 5% CO<sub>2</sub> dans des plaques 6 puits, à une concentration de 2.10<sup>6</sup>/mL avec du milieu IMDM contenant du PMA et de l'ionomycine (500ng/mL chacun) et du GolgiPlug dilué au 1/1000<sup>smc</sup>.

### **3. Cytométrie de flux**

#### **3.1 Réactifs**

- DAPI : 4'6-diamidino-2-phenylindole, Invitrogen, Cat n°D-1306, Concentration stock: 0,1mg/mL, utiliser 1µL pour 1mL de culture avant tri
- Iodure de propidium : Sigma-Aldrich, Cat n°P4864, Concentration stock 1mg/mL, Concentration finale : 1µg/mL
- Tampon annexin V 10X : HEPES/NaOH 0,1M pH7,4 + NaCl 1500mM + CaCl<sub>2</sub> 25mM
- FoxP3 staining kit : eBiosciences, Cat n°71-5775-40

#### **3.2 Suspension cellulaire**

Les études de cytométrie de flux ont été effectuées sur des échantillons provenant de la rate, des ganglions lymphatiques, ou de la lamina propria (LPL) de petit intestin de souris.

Les ganglions et la rate ont été broyés dans un filtre de 70 microns avec un piston de seringue dans du PBS/5%FCS. Les cellules ont ensuite été lavées et centrifugées à 4°C à 1200rpm pendant 5 minutes. La suspension de rate a subi un traitement au NH<sub>4</sub>Cl afin de lyser les globules rouges. Pour cela, après centrifugation, les cellules ont été resuspendues dans 500µL de NH<sub>4</sub>Cl 0,83% et incubées pendant 5 minutes à température ambiante. Elles ont été ensuite lavées dans un volume final de 5mL. Les suspensions cellulaires ont finalement été comptées au bleu Trypan.

Pour les LPL, le petit intestin a été récupéré dans du milieu RPMI (à température ambiante). Le gras résiduel, ainsi que les plaques de Peyer ont été enlevés, puis l'intestin a été ouvert longitudinalement afin d'enlever le bol fécal et les bulles d'air présents. L'intestin a



ensuite été coupé en pièces de 1cm, puis placé dans 30mL de HBSS (à température ambiante) contenant 5% de sérum de veau fœtal, de l'EDTA (500µM), de l'HEPES (100mM), et du DTT (1mM, ajouté extemporanément). Le tout a été placé à 37°C pendant 20 minutes sous agitation à 250rpm avec un aimant. La suspension est ensuite filtrée sur un filtre 100 microns, puis le tissu restant est placé à nouveau dans 20mL de milieu RPMI (à température ambiante) contenant de la collagénase V (Sigma-Aldrich, 100µg/mL) à 37°C pendant 25 minutes sous agitation à 250rpm avec un aimant. Après digestion, le lysat est resuspendu afin de casser les résidus d'intestin et le tout est filtré sur un filtre 100 microns. Les cellules sont centrifugées à 1200rpm pendant 10 minutes, puis lavées avec 20mL de milieu RPMI et à nouveau centrifugées. Les cellules sont ensuite placées dans du Percoll 35% (GE Healthcare Life Sciences) et centrifugées à 1600rpm pendant 10 minutes à température ambiante sans accélération, ni frein. Le culot cellulaire est ensuite lavé dans 15mL de milieu RPMI, puis les cellules sont resuspendues dans du Percoll 40%. Par la suite, du Percoll 70% est ajouté permettant de récupérer les lymphocytes à l'interface des deux phases. Pour cela, les cellules sont centrifugées à 2200rpm pendant 20 minutes à température ambiante sans accélération et sans frein. Enfin, deux lavages sont effectués avec du milieu RPMI, puis les cellules sont comptées en bleu Trypan et placées en milieu IMDM pour être stimulées.

### **3.3 Anticorps**

Les anticorps utilisés pour les marquages et pour les tris sont directement couplés à un fluorochrome et proviennent de chez Biolegend, eBiosciences ou BD Pharmingen. La liste des anticorps commerciaux, ainsi que le clone pour chacun sont listés dans la table ci-dessous.

<b>Anticorps</b>	<b>Clone</b>	<b>Anticorps</b>	<b>Clone</b>
<b>CD4</b>	RM 4-5	<b>TCRγδ</b>	GL3
<b>CD8</b>	53-6.7	<b>Annexin V</b>	/
<b>CD25</b>	PC61.5	<b>CD16/32</b>	93
<b>CD44</b>	IM7	<b>NK1.1</b>	PK136
<b>CD45.1</b>	A20	<b>RORγt</b>	AFKJS-9
<b>CD45.2</b>	104.2	<b>IL-17A</b>	eBio 17B7
<b>CD62L</b>	MEL-14	<b>FoxP3</b>	FJK-16S
<b>CD126</b>	D7715A7	<b>GM-CSF</b>	MP1-22E9

**3.4 Marquages extra-cellulaires et intra-cellulaires**

Les marquages ont été effectués dans des plaques 96 puits à fond rond dans du PBS/5%FCS. Après stimulation, les cellules sont centrifugées 3 minutes à 1200rpm, puis lavées deux fois. Les mix d'anticorps sont préparés en parallèle pour un volume final par puit de 20µL. Les cellules sont d'abord marquées sur glace avec l'anticorps CD16/32 pendant 10 minutes, ce qui permet de bloquer le récepteur Fc présent à la surface. Les cellules sont ensuite lavées deux fois et centrifugées 3 minutes à 1200rpm. Le surnageant est enlevé par retournement rapide de la plaque et séchage sur un papier absorbant. Par la suite, le mix d'anticorps est ajouté aux cellules sur glace et à l'abri de la lumière pendant 15 minutes et lavées deux fois. Le marquage avec l'annexin V requiert des conditions spéciales. Le marquage est effectué dans un buffer annexin V 1X dans un volume de 100µL pendant 15 minutes à température ambiante. 100µL sont ensuite ajoutés ainsi que 2µL d'iodure de propidium (2µg/mL). Par la suite, les échantillons sont analysés avec le cytomètre en flux BD LSR II ou triés sur un trieur BD FACS ARIA II ou BD FACS ARIA III Fusion.

Anticorps	Fluorochrome	Dilution	Temps d'incubation
CD16/32	/	1/100	10 minutes
<b>Lavage deux fois</b>			
CD4	AF700	1/100	15 minutes
CD8	PerCP-Cy5.5		
<b>Lavage deux fois</b>			
IL-17A	eF660	1/100	30 minutes
GM-CSF	BV421		
ROR $\gamma$ t	PE		
FoxP3	FITC		
<b>Lavage deux fois</b>			

## Matériel et méthodes

Anticorps	Fluorochrome	Dilution	Temps d'incubation
CD16/32	/	1/100	10 minutes
<b>Lavage deux fois</b>			
CD4	AF700	1/100	15 minutes
CD8	PerCP-Cy5.5		
CD45.1	PE		
CD45.2	FITC		
<b>Lavage deux fois</b>			
IL-17A	eF660	1/100	30 minutes
GM-CSF	BV421		
<b>Lavage deux fois</b>			

Anticorps	Fluorochrome	Dilution	Temps d'incubation
CD16/32	/	1/100	10 minutes
<b>Lavage deux fois</b>			
CD4	AF700	1/100	15 minutes
CD8	PerCP-Cy5.5		
CD126	PE-Cy7		
CD44	PE-CF-594		
CD25	PE		
<b>Lavage deux fois</b>			

Anticorps	Fluorochrome	Dilution	Temps d'incubation
CD16/32	/	1/100	10 minutes
<b>Lavage deux fois</b>			
CD4	AF700	1/100	15 minutes
CD8	PerCP-Cy5.5		
CD25	PE		
CD62L	FITC		
CD44	PE-Cy7	1/500	
<b>Lavage deux fois</b>			

Anticorps	Fluorochrome	Dilution	Temps d'incubation
CD16/32	/	1/100	10 minutes
<b>Lavage deux fois</b>			
CD4	AF700	1/100	15 minutes
CD8	PerCP-Cy5.5		
CD25	PE		
NK1.1	PE		
TCR $\gamma\delta$	PE		
CD44	PE-Cy7	1/500	
<b>Lavage deux fois</b>			

Les marquages intra-cellulaires sont effectués avec le kit FoxP3 staining kit de chez eBiosciences. Après marquage extra-cellulaire des cellules, elles sont fixées et perméabilisées dans 100 $\mu$ L de buffer Fixation/permeabilization pendant 30 minutes à l'abri de la lumière et sur glace. Elles sont ensuite lavées deux fois avec du permeabilization buffer 1X (5min/1200rpm/4°C) et incubées avec le mix d'anticorps désiré pendant 30 minutes minimum. Enfin, les cellules sont lavées deux fois avant analyse.

### **3.5 Tri cellulaire**

Les cellules totales de rate, ou de ganglions ont été marquées dans un tube Falcon de 50mL directement après préparation de la suspension cellulaire. Le marquage a été effectué dans un volume total de 100 $\mu$ L par échantillon dû au nombre important de cellules. Après 15 minutes d'incubation dans le noir et sur glace, les cellules ont été lavées deux fois, puis filtrées dans un filtre de 70 microns et transférées dans un tube de 5mL (tube FACS). Les cellules sont triées à une concentration de 50.10<sup>6</sup>/mL et récupérées dans des tubes FACS dont l'intérieur a été recouvert sur la nuit de PBS. Avant le tri, du DAPI est ajouté à la préparation permettant de discriminer les cellules mortes et les cellules vivantes. Les lymphocytes TCD4<sup>+</sup> naïfs sont récupérés ainsi : CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> CD25<sup>-</sup> CD62L<sup>+</sup> CD44<sup>-low</sup> ou CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> CD44<sup>-low</sup> CD25/NK1.1/TCR $\gamma\delta$

## **4. Préparation d'ADN et d'ARN**

### **4.1 Extraction d'ADN**

Afin de génotyper les souris utilisées pour ce projet, de l'ADN génomique a été extrait de morceaux de queues des souris numérotées au préalable. Les queues sont digérées dans 400µL d'un tampon contenant de la protéinase K à une concentration de 0,1mg/mL (4µL d'une solution stock à une concentration de 10mg/mL dans 400µL, Sigma-Aldrich, Cat n°P6556) pendant la nuit dans un four à 55°C. Le tampon de digestion contient 50mM Tris (pH 8), 100mM NaCl, 100mM EDTA, 1% SDS et de l'eau qsp 100mL. L'ADN récupéré des souris CD4-Cre *Ik<sup>fl</sup>* est directement utilisé et dilué au 1/25<sup>ème</sup> avant préparation du mix de PCR. L'ADN récupéré des souris Rosa-Cre<sup>ERT2</sup> *Ik<sup>fl</sup>* est précipité avant utilisation. Pour cela, 120µL de NaCl 5M est ajouté à l'ADN digéré, puis le mix est centrifugé à 13.000rpm pendant 5 minutes à température ambiante. Le surnageant est récupéré dans un nouveau tube et 1 volume d'isopropanol y est ajouté. Les échantillons sont mixés et centrifugés à nouveau à 13.000rpm pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant est jeté et 800µL d'éthanol à 70% sont ajoutés. Les échantillons sont centrifugés à 13.000rpm pendant 5 minutes à 4°C, le surnageant est jeté et les culots sont laissés à l'air libre afin de les faire sécher et de permettre aux résidus d'éthanol de s'évaporer. Enfin, les culots sont resuspendus dans 100µL d'eau.

### **4.2 Extraction d'ARN**

Les échantillons utilisés pour l'extraction d'ARN ont été obtenus à partir de cellules qui ont été culotées et placées à -80°C. L'ARN a été extrait avec le kit RNeasy Mini kit ou Micro kit en fonction du nombre de cellules obtenues et suivant le protocole décrit par le fabricant. Le tampon RLT utilisé lors de la première étape a été supplémenté avec du β-mercaptoéthanol selon les recommandations fournies. Au cours de l'extraction, l'étape supplémentaire de digestion à la DNase sur la colonne a été effectuée, et l'ARN obtenu a été mesuré avec un NanoDrop 2000.

## 5. Réaction en chaîne par polymérase

### 5.1 Génotypage

Le génotypage a été effectué à partir de l'ADN extrait en 4.1 et dilué ou non. Puis, une réaction en chaîne par polymérase (PCR) a été lancée dans un volume total de 25 $\mu$ L et suivant le protocole décrit ci-dessous.

Réactif	Volume utile pour une réaction (CD4-Cre)
ADN	2 $\mu$ L
Tampon de PCR 10X avec MgCl <sub>2</sub> (Roche)	2,5 $\mu$ L
Mix dNTP (10mM chacun, Thermo Scientific)	0,5 $\mu$ L
2 à 4 primers (100 $\mu$ M, Sigma-Aldrich)	0,1 $\mu$ L chacun
Polymérase TAQ (home-made)	0,5 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	qsp

Réactif	Volume utile pour une réaction (Rosa-Cre)
ADN	1 $\mu$ L
Tampon de PCR 10X avec MgCl <sub>2</sub> (Roche)	2,5 $\mu$ L
Mix dNTP (10mM chacun, Thermo Scientific)	0,5 $\mu$ L
3 primers (5 $\mu$ M, Sigma-Aldrich)	3 $\mu$ L F - 0,75 $\mu$ L R1 - 1,5 $\mu$ L R2
Polymérase TAQ (home-made)	0,6 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	qsp

Pour le génotypage de la lignée Rosa-Cre, trois primers différents sont utilisés pour définir l'insertion de la Cre-recombinase (F : forward, R1 : reverse 1, R2 : reverse 2). Les PCR de génotypages ont été effectuées dans les conditions suivantes (les différences entre les lignées CD4-Cre et Rosa-Cre sont définies entre parenthèses).

Étape	Température	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	94°C	5 minutes	1
Dénaturation	94°C	15 sec (CD4-Cre) 30 sec (Rosa-Cre)	40 (CD4-Cre) 35 (Rosa-Cre)
Amplification	60°C	30 sec	
Elongation	72°C	30 sec (CD4-Cre) 45 sec (Rosa-Cre)	
Elongation finale	72°C	5 minutes	1

Pour géotyper les souris CD4-Cre  $I\kappa^{fl}$ , quatre couples de primers ont été utilisés : BBO 106 + BBO 107 pour vérifier l'insertion des sites LoxP, BBO 107 + BDD 40 pour vérifier qu'il n'y a pas de délétion génomique, BAD 496 + BAD 497 pour l'insertion de la Cre-recombinase et ADC 253 + ADC 254 qui permettent d'amplifier le gène Tec permettant de vérifier que de l'ADN a bien été amplifié dans chaque puit.

Primer	Séquence 5' -> 3'
BBO 106	GAGGACCAGATATAAGGCAGCTGGG
BBO 107	GGCCATCAACGGCATGGAAACGATAA
BDD 40	AGCACAGGTTGGACAATACCTGAAA
BAD 496	GTTCGCAAGAACCTGATGGACA
BAD 497	CTAGAGCCTGTTTTGCACGTTT
ADC 253	GGGAGCTGAGATTTAGCATGTG
ADC 254	GCATAATATGGCGGTTTGTGG

Pour géotyper les souris Rosa-Cre  $I\kappa^{fl}$ , un triplet de primers a été utilisé pour caractériser la Cre-recombinase : RosaF, RosaR1, RosaR2, deux autres couples de primers ont été utilisés pour caractériser l'insertion des sites LoxP (décrit précédemment) et pour caractériser une potentielle délétion (décrit précédemment). Le tableau qui suit regroupe les séquences des primers utilisés pour géotyper la Cre-recombinase (les autres ayant été décrit pour les CD4-Cre).

Primer	Séquence 5' -> 3'
RosaF	CTTCCCTCGTGATCTGCAACTC
RosaR1	AAACTCGGGTGAGCATGTCTTT
RosaR2	GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT

## 5.2 RT-PCR

La réverse transcription PCR (RT-PCR) a été effectuée grâce à la Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Cat n°18064-014) dans un volume final de 20 $\mu$ L. Pour cela, deux mix différents ont été utilisés.

Réactifs (mix1)	Vol/échantillon	Réactifs (mix2)	Vol/échantillon
OligodT (0,5 $\mu$ g/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L	5X buffer	4 $\mu$ L
dNTP (10mM chacun)	1 $\mu$ L	0,1M DTT	2 $\mu$ L
ARN (1-500ng)	X $\mu$ L	RNase OUT (40U/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	Qsp 12 $\mu$ L	Reverse transcriptase	1 $\mu$ L

2µL du mix1 ont été ajoutés à 500ng maximum d'ARN et le tout a été incubé 5 minutes à 65°C. Les tubes de PCR ont ensuite été placés sur glace afin d'ajouter 7µL du mix2, et le tout a été placé 2 minutes à 42°C. Enfin, 1µL de reverse transcriptase a été ajouté et le tout a été placé 50 minutes à 42°C. La réaction est stoppée par chauffage à 70°C pendant 15 minutes.

### 5.3 RT-qPCR

L'ADN complémentaire utilisé pour la PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR) a été préparé comme décrit en 5.2. Les réactions ont été effectuées dans un volume de 10µL en utilisant le mix SYBR Green I MasterMix (Roche, Cat n°04707516001) dans un Lightcycler 480 (Roche). La préparation pour un puit contient 5µL de SYBR Green, 3,4µL d'eau, 0,6µL de mix de primers (50µL de primer forward et 50µL de primer reverse dilués dans 400µL d'eau au préalable) et 1µL d'ADNc. Le programme utilisé, ainsi que les séquences des primers utilisés sont présentés à la suite. Seule la quantification pour *Ror gamma t* est différente, car elle s'effectue à 65°C au lieu de 60°C. Les primers pour ce gène ont été pris dans les exons 2-3 afin d'amplifier spécifiquement la partie du gène *Rorc* codant pour la protéine RORγt.

Programme pour Lightcycler utilisé.

Program Name	Program						
Cycles	1	Analysis Mode	None				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:05:00	4.40		0	0	0

Program Name	Program						
Cycles	40	Analysis Mode	Quantification				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:15	4.40		0	0	0
60	None	00:00:30	2.20		0	0	0
72	Single	00:00:15	4.40		0	0	0

Program Name	Program						
Cycles	1	Analysis Mode	Melting Curves				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:05	4.40		0	0	0
60	None	00:00:05	2.20		0	0	0
95	Continuous		0.11	5	0	0	0

Program Name	Program						
Cycles	1	Analysis Mode	None				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
42	None	00:00:02	2.20		0	0	0



Amorces utilisées pour les gènes. L32 correspond au gène de normalisation, car son expression est considérée stable dans les différentes conditions testées.

Gene	Séquence forward	Séquence réverse
<i>L32</i>	5'-TTAAGCGAAACTGGCGGAACC-3'	5'-TTGTTGCTCCCATACCCGATG-3'
<i>Il17a</i>	5'-ATCCCTCAAAGCTCAGCGTGTC-3'	5'-GGGTCTTCATTGCGGTGGAGAG-3'
<i>ROR gamma t</i>	5'-TCACCTGTGAGGGGTGCAAG-3'	5'-GTTTCGGTCAATGGGGCAGTT-3'
<i>Il23r</i>	5'-CCCAGACAGTTTCCCAGGTTA-3'	5'-ACCATTCCTCCGACAAAAGTCCA-3'
<i>Csf2</i>	5'-TCGTCTCTAACGAGTTCTCCTT-3'	5'-CGTAGACCCTGCTCGAATATCT-3'
<i>Il6ra</i>	5'-TCAACGCCATCTGTGAGTGG-3'	5'-TCCCGTTGGTGGTGTGATTT-3'
<i>Tbx21</i>	5'-AGGGGGCTTCCAACAATG-3'	5'-AGACGTGTGTGTTAGAAGCACTG-3'
<i>Ifng</i>	5'-CGGCACAGTCATTGAAAGCC-3'	5'-TGTCACCATCCTTTTGCCAGT-3'
<i>Il22</i>	5'-CAGCTCAGCTCCTGTACAT-3'	5'-CAGGTCCAGTTCCTCAATCG-3'
<i>Il3</i>	5'-ATAGGGAAGCTCCCAGAACCT-3'	5'-GGATCCACTTCTCCTTGGCT-3'
<i>Il6st</i>	5'-CCTCAAACAAGCCGCTCCTG-3'	5'-GCGTGTACTCCGTGTGAGAA-3'
<i>Il23a</i>	5'-GCAGCTCTCTCGGAATCTCT-3'	5'-ATCCTTTGCAAGCAGAAGTGG-3'
<i>Eomes</i>	5'-ACCGGCACCAAACCTGAGA-3'	5'-AAGCTCAAGAAAGGAAACATGC-3'
<i>Tgfb3</i>	5'-GATCACCACAACCCACACCT-3'	5'-CCAGGTTGCGGAAGCAGTAA-3'
<i>Ahr</i>	5'-ACACAGAGTTAGACCGCCTG-3'	5'-GGGTGGACTTTAATGCAACATC-3'
<i>Batf</i>	5'-CCCTGGCAAACAGGACTCATC-3'	5'-GGTGTCCGCTTTCTGTGTCT-3'
<i>FoxP3</i>	5'-GGCCCTTCTCCAGGACAGA-3'	5'-GCTGATCATGGCTGGGTTGT-3'
<i>Ikzf1</i>	5'-GCAAGCAATGTCGCCAAACGTAAGA-3'	5'-CATAGGGCATGTCTGACAGGCAC-3'
<i>Ikzf2</i>	5'-GCTGGAAATGCAGAGTGATG-3'	5'-CCTCGCTGCTCTCAATTAGG-3'
<i>Ikzf3</i>	5'-ACTGGAACGGGCGTTTCGC-3'	5'-ACAGCAGACCAACCGGTGGGAA-3'
<i>Ccr6</i>	5'-CATTTCTGGGACTTGCTTCC-3'	5'-TCTGTGGAATTCATTCAGAAGTGTG-3'
<i>Il10</i>	5'-CAGTACAGCCGGAAGACAA-3'	5'-TGGCAACCCAAGTAACCCTTA-3'

## 6. Puces à oligonucléotides Affymetrix

L'ARN utilisé pour le transcriptome a été obtenu à partir de cellules TCD4<sup>+</sup> naïves qui ont été placées en culture pendant 24h en conditions de différenciation T<sub>H</sub>17 (contenant de l'IL-6 + TGF-β1). L'ARN a été extrait avec le kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) comme décrit en 4.2. La comparaison des cellules proficientes et déficientes pour Ikaros s'est faite avec une puce **GeneChip® Mouse Gene 2.0 ST arrays** (Affymetrix) couvrant 35240 transcrits et environ 2000 ARNlnc (ARN long non-codant). Les données brutes ont été analysées avec le logiciel de console d'analyse d'expression Affymetrix version 1.4.1 afin de calculer les intensités de signal de l'ensemble des sondes utilisées. Les résultats ont été normalisés en utilisant la méthode RMA en utilisant des réglages par défaut. Le fichier Excel (Microsoft) reçu a ensuite été découpé en clusters avec le programme Cluster 3.0 et visualisé sur le programme Java TreeView version 1.1.6r4. Seuls les gènes fortement dérégulés ont été conservés au cours de l'analyse en accord avec nos critères. Pour les gènes plus fortement exprimés : (moyenne KO1 : KO3) – (moyenne WT1 : WT3) ≥ 1,4. Pour les gènes moins fortement exprimés : (moyenne KO1 : KO3) – (moyenne WT1 : WT3) ≤ -1,4. Ces analyses ont été effectuées entre le WT et le KO pour les

jours 0, 1 et 2. Elles ont été également effectuées entre les jours 0 et 1, 1 et 2, et 0 et 2 chez le WT et le KO.

## **7. Immunoprécipitation de chromatine et séquençage (ChIP-seq)**

25.10<sup>6</sup> LTCD4<sup>+</sup> naïfs et 25.10<sup>6</sup> LTCD4<sup>+</sup> naïfs différenciés en LT<sub>H</sub>17 pendant 24h en condition T<sub>H</sub>17 (IL-6 + TGF- $\beta$ 1) ont été lavés avec du PBS 1X et fixés à 37°C pendant 10 minutes dans 5mL PBS/0,5% BSA/ 1% ultra pure formaldéhyde (Electron Microscopy Sciences). Le protocole d'immunoprécipitation a été adapté de celui fourni par Millipore dans son kit Millipore ChIP Assay Kit (17-295). La fixation a été arrêtée avec 125mM glycine en présence de PBS 1X froid (contenant un cocktail inhibiteur de protéase 1X (PIC), Roche) et suivie par une lyse des cellules dans 5mL de Triton X-100 1%, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM Tris-HCl pH 7.1, 11% sucrose, PIC 1X pendant 10 minutes sur glace. Les noyaux ont ensuite été culotés et lysés dans 500 $\mu$ L de SDS 1%, 50mM Tris-HCl, 10mM EDTA, PIC 1X. La chromatine a été soumise à des ultrasons pour obtenir des fragments de 300-500pb grâce à un Bioruptor 200 (Diagenode). La chromatine fragmentée diluée 4 fois avec 0.01% SDS, 1.1% triton X-100, 1.2mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl pH 8.1, 167mM NaCl, PIC 1X a été pré-lavée avec 100 $\mu$ L de protéine A sépharose ou avec 50 $\mu$ L de billes magnétiques ChIP Protein A (Millipore) préalablement bloquées avec 0.5% BSA. Le tout a été incubé sur la nuit avec 5 $\mu$ g d'anticorps anti-Ikaros (Home-made) ou avec 5 $\mu$ g d'anticorps IgG contrôle. Les complexes protéines-ADN ont ensuite été liés à 75 $\mu$ L de protéine A sépharose ou à 30 $\mu$ L de billes magnétiques de protéine A pendant 5-6h à 4°C et lavés une fois avec un tampon faible en sels (20mM Tris-HCl pH 8.1, 150mM NaCl, 2mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS), avec un tampon fort en sels (20mM Tris-HCl pH 8.1, 500mM NaCl, 2mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS), avec un tampon LiCl (10mM Tris-HCl pH 8.1, 1mM EDTA, 1% déoxycholate, 1% NP40, 0.25M LiCl) et avec un tampon Tris-EDTA (10mM Tris-HCl pH 8.1, 1mM EDTA). Les échantillons ont ensuite été élués et la fixation a été réversée. La purification de l'ADN a été faite avec le kit iPure Kit (Diagenode). Les bibliothèques ont été préparées par la plateforme de Biopuces et Séquençage de l'IGBMC, en accord avec les protocoles standards fournis par Illumina, et ont été validées avec un analyseur Agilent Bioanalyzer. Le séquençage a également été effectué par la plateforme en utilisant des séquences lues de 50pb sur un HiSeq2000. Les lectures ont été alignées sur le génome murin mm9, puis étendues à 200pb. Enfin, les données ont été visualisées sur le UCSC genome browser.

## **8. Western-Blot**

Les LTCD4 naïfs triés ( $3.10^6$ ) ont été traités, ou non, directement pendant différents temps à 37°C avec de l'IL-6 (5ng/mL), ou avec de l'anti-CD3 (5µg/mL) ou de l'anti-CD28 (5µg/mL) ou de l'anti-CD3 + anti-CD28 (5µg/mL chacun) en présence de goat anti-syrian hamster IgG (20µg/mL, Pierce, Cat n°31115). La réaction est bloquée avec 900µL de PBS 1X froid, puis les cellules sont centrifugées à 3000rpm pendant 5 minutes. Le surnageant est enlevé, puis les cellules sont à nouveau centrifugées à 3000rpm pendant 5 minutes pour enlever le surnageant résiduel et les cellules sont directement lysées dans 20µL de tampon contenant du STOP buffer 1X (20mM Tris-HCl pH7.5, 150mM NaCl, 5mM EDTA pH8, 5mM NaPiP, 1mM NaVO<sub>3</sub>, 20mM NaPO<sub>4</sub> pH7.6, 3mM β-glycérophosphate, 10mM NaF), Triton X-100 1%, 1X C25X. 0,1% de SDS est ajouté par la suite, ainsi que 0,5µL de Benzonase (Sigma-Aldrich, Cat n°E1014). Le tout est laissé 15 minutes sur glace, puis centrifugé 10 minutes à 13.000rpm. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube, puis 5µL de tampon de charge pré-chauffé et contenant du DTT est ajouté. Le mix est laissé à 95°C pendant 5 minutes pour dénaturer les protéines, et les échantillons sont déposés sur gel pour effectuer le Western-Blot. Après migration sur un gel de SDS-polyacrylamide 10% et transfert sur une membrane de PVDF, cette dernière est bloquée dans un tampon de blocage contenant du lait pendant 1h à température ambiante, puis incubée sur la nuit avec un anticorps primaire au 1 : 1000 ; anti-Ikaros (home-made), ou rabbit anti-phospho STAT3 (#9131, Cell Signaling), ou anti-STAT3 (#4904, Cell Signaling), ou mouse-monoclonal anti-β-actin (A1978, Sigma-Aldrich, 1 :10.000), ou rabbit mAb anti-phospho Erk1/2 (#4377, Cell Signaling), ou anti-Erk1/2 (#9102, Cell Signaling), ou anti-phospho(S473)-Akt (#9271, Cell Signaling), ou anti-Akt (#9272, Cell Signaling). Les membranes ont été lavées dans du PBS/0,1% Tween 20, puis incubées 1h à température ambiante avec un anticorps secondaire conjugué à la HRP au 1 : 10.000 ; goat-anti-rabbit HRP (sc-2004, Santa Cruz) ou rat-anti-mouse HRP (H139-52.1, Abcam) et à nouveau lavées trois fois avant d'être visualisées à l'aide d'un système chimiluminescent.

## **9. GSEA (Gene Set Enrichment Analysis)**

Afin de représenter un enrichissement de gènes, le logiciel GSEA a été utilisé. Il se base sur l'algorithme DAVID pour effectuer l'analyse. Une première liste ordonnée est téléchargée, ainsi qu'une deuxième qui va être comparée à la première. A chaque fois qu'un gène est de la deuxième liste correspond à un gène de la première liste, l'algorithme attribue un score

d'enrichissement et met une barre noire sur le graphique. Le score d'enrichissement est calculé comme tel : à chaque position, le logiciel attribue une valeur pour un gène donné s'il est présent dans la liste ou non. Puis, le logiciel exécute une permutation au hasard entre les gènes de la liste et réattribue une valeur pour le gène en question. Si la valeur est aussi élevée que la permutation précédente, le score est incrémenté, sinon il est diminué. Le score d'enrichissement augmente donc quand le fait de trouver le même gène à une position donnée n'est pas dû au hasard. Le logiciel a exécuté 1000 permutations, selon les critères que nous avons fixés, pour chaque analyse réalisée. Au final, le graphique représente les gènes ordonnés, et l'enrichissement est visible au niveau de la partie noire, ainsi qu'au niveau de la courbe.

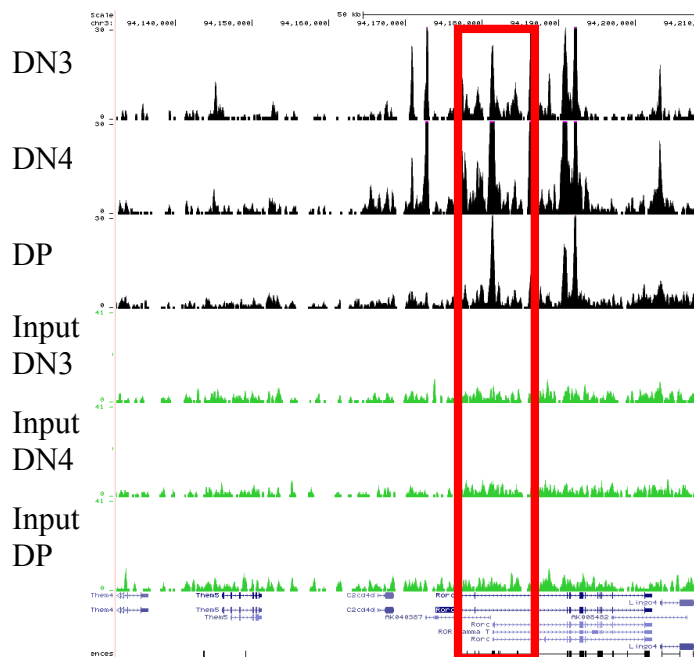
## **10. Analyses statistiques**

Les analyses statistiques sont les moyennes de plusieurs expériences  $\pm$  la déviation standard (barres d'erreurs). Les p-values ont été générées en utilisant un test de Student (T-test) considéré comme significatif lorsque  $\leq 0.05$  \*,  $\leq 0.01$  \*\*,  $\leq 0.001$  \*\*\* et  $\leq 0.0001$  \*\*\*\*. N indique le nombre d'expériences indépendantes réalisées pour obtenir les statistiques.

En préambule de cette partie, je vais m'attacher à résumer les résultats que nous avons obtenus, ainsi que les conclusions que nous avons pu en tirer. Ce travail s'est basé sur des résultats préliminaires obtenus avant mon arrivée. En effet, une analyse de transcriptome menée sur des cellules ILC87 ré-exprimant Ikaros fusionné au récepteur aux œstrogènes, a mis en évidence que le gène *Rorc* (codant pour ROR $\gamma$ t) est le plus fortement exprimé comparé aux cellules contrôle. De plus, les résultats obtenus au cours d'une expérience de ChIP-sequencing dans des thymocytes ont suggéré que Ikaros se fixe sur le promoteur du gène codant pour ROR $\gamma$ t. Ce dernier étant essentiel pour la différenciation des LT $_{H17}$ , nous avons voulu étudier l'impact de la délétion d'Ikaros au niveau moléculaire, au cours de la différenciation de ces cellules. Pour cela, nous avons trié et cultivé des LTCD4 $^{+}$  naïfs provenant de souris proficientes et déficientes en Ikaros, et étudié l'expression de ROR $\gamma$ t, d'IL-17A, et de FoxP3. Nous avons mis en évidence *in vitro* que les cellules KO expriment faiblement le FT ROR $\gamma$ t, et n'expriment pas ou peu IL-17A. Ce défaut d'expression n'est pas dû à un défaut de signalisation de la voie IL-6, cependant, mes résultats suggèrent que c'est une réponse accrue à l'IL-6 qui permet l'expression de GM-CSF. De plus, le défaut d'expression d'IL-17A n'est pas dû à un biais de différenciation vers une autre sous-population de LT auxiliaires, T $_{H1}$ , T $_{H2}$  ou iTreg. Au cours de l'analyse de notre expérience de transcriptome, nous avons mis en évidence qu'un groupe de gènes pathogéniques (comprenant *Il3*, *Csf2*, *Ifng*, *Stat4*...) est exprimé fortement et spécifiquement dans les cellules KO. Nous avons montré par une expérience de ChIP-sequencing que la régulation de la transcription de la plupart des gènes de cette signature, est effectuée de manière indirecte par Ikaros. Nous avons confirmé au niveau protéique que la cytokine GM-CSF, critique dans de nombreuses MAI, et codée par *Csf2*, est fortement exprimé par les cellules KO. De plus, nous avons montré par des co-cultures que le phénotype adopté par les cellules KO est dû à un facteur intrinsèque. Enfin, les résultats préliminaires que nous avons obtenu de manière *in vivo* ne nous ont pas permis d'observer à l'état basal une différence d'expression de ROR $\gamma$ t, IL-17A, et GM-CSF entre les souris proficientes et déficientes en Ikaros. Néanmoins, nous avons pu constater un pourcentage plus élevé de cellules FoxP3 $^{-}$  dans les souris déficientes en Ikaros. Ces cellules expriment *Nrp1* (résultat non montré), ce qui suggère qu'il s'agit des LTreg naturels (nTreg) provenant du thymus.

En conclusion, au cours de ma thèse, j'ai mis en évidence qu'Ikaros est un répresseur indirect de la transcription des gènes pathogéniques dans les LTCD4 $^{+}$  naïfs, cultivés pour induire une polarisation vers le phénotype T $_{H17}$  régulateur.

Plusieurs résultats obtenus précédemment dans le laboratoire ont suggéré un effet d'Ikaros sur l'expression de ROR $\gamma$ t. En effet, une analyse de transcriptome menée sur des cellules ILC87 ré-exprimant Ikaros fusionné au récepteur aux oestrogènes, et stimulées pendant 24h en présence de 4-OHT, a mis en évidence que le gène *Rorc* (codant pour ROR $\gamma$ t) est le plus fortement exprimé comparé aux cellules stimulées avec de l'éthanol. De plus, une autre étude de ChIP-seq menée dans le laboratoire sur des thymocytes a montré que, Ikaros se fixe sur le promoteur du gène *ROR gamma t*, et peut potentiellement réguler l'expression de ce gène (Figure 28).



**Figure 28: Ikaros se fixe sur le promoteur de *ROR gamma t* dans des thymocytes WT.** Analyse de l'expérience de ChIP-sequencing réalisée sur des thymocytes WT. Le stade de différenciation est représenté à gauche de la figure. Les contrôles pour chaque stade de différenciation testé sont représentés en vert. La partie encadrée représente le promoteur du gène *ROR gamma T*. L'analyse a été effectuée en utilisant le génome murin mm9. DN3 – Double négative stade 3 ; DN4 – Double négative stade 4 ; DP – Double positive.

De plus, l'observation du phénotype des souris Ik<sup>LL</sup> a étayé l'hypothèse que Ikaros peut agir en synergie avec ROR $\gamma$ t également dans d'autres cellules. En effet, le phénotype se rapproche de celui observé lors d'une étude publiée en 2004, et qui a montré qu'en absence de ROR $\gamma$ t, les souris ne possédaient pas de ganglions inguinaux, ni de plaques de Peyer (Eberl *et al.*, 2004). Les souris Ik<sup>LL</sup> disponibles dans le laboratoire ne possèdent pas non plus de plaques de Peyer, ni de ganglions inguinaux (Figure 29).



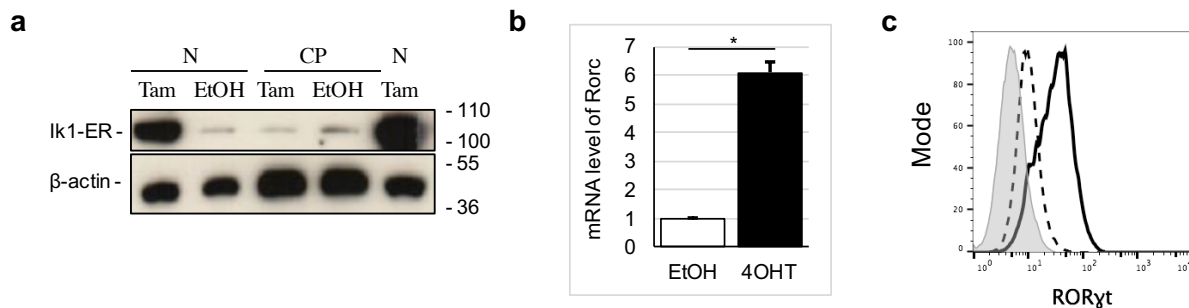
**Figure 29: Les souris Ik<sup>LL</sup> présentent un phénotype déficitaire pour la formation des ganglions.** Photographie de ganglions inguinaux provenant de souris proficientes (WT) ou hypomorphes (Ik<sup>LL</sup>) pour l'expression d'Ikaros.

Mon sujet de thèse a donc été de déterminer par quels mécanismes Ikaros régule la différenciation en LT<sub>H</sub>17, comme ces derniers requièrent l'expression de ROR $\gamma$ t.

## 1. Ikaros augmente l'expression de ROR $\gamma$ t *in vitro*

### 1.1 L'expression de ROR $\gamma$ t est augmentée par Ikaros dans les ILC87

Nous avons commencé par étudier l'effet de la translocation dans le noyau d'Ikaros sur l'expression de ROR $\gamma$ t *in vitro*. Pour cela, nous avons utilisé des cellules ILC87 dérivant d'un thymome d'une souris Lck-Cre Ikaros. Ikaros est exprimé dans ces cellules, fusionné au récepteur des œstrogènes muté pour ne répondre qu'au 4-OHT. La translocation d'Ikaros dans le noyau est induite par le 4-OHT, qui est ajouté pendant 24h à la culture. La translocation d'Ikaros dans le noyau après ajout de 4-OHT a été confirmée par Western-Blot (**Figure 30a**). L'expression de ROR $\gamma$ t a été vérifiée au niveau ARN par RT-qPCR (**Figure 30b**) et au niveau protéique par cytométrie de flux avec un anticorps spécifique (**Figure 30c**).



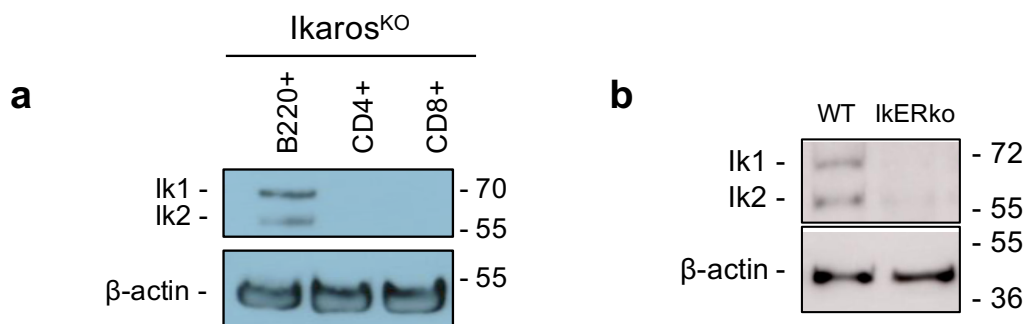
**Figure 30: Ikaros augmente l'expression de ROR $\gamma$ t après translocation dans le noyau.** Des cellules ILC87-Ik1-ER ont été induites pendant 24h en présence de 4-OHT (100nM) ou d'éthanol. L'analyse de la translocation d'Ikaros a été effectuée par Western-Blot (**a**), alors que l'expression de ROR $\gamma$ t a été mesurée par RT-qPCR pour l'ARN (**b**) et par cytométrie de flux pour la protéine (**c**). (**a**)  $5 \cdot 10^6$  cellules ont été stimulées en présence de 4-OHT ou d'éthanol, puis un extrait cytoplasmique et nucléaire ont été préparés et migrés sur gel pour marquer spécifiquement Ikaros. Le poids moléculaire (kDa) est représenté sur la droite des blots, et à gauche sont notés les protéines étudiées. Le  $\beta$ -actin sert de contrôle de charge dans les expériences. N : noyau ; CP : cytoplasme ; Tam : 4-OHT ; EtOH : Ethanol (**b**) Les cellules ont été stimulées comme en (a), puis l'ARN a été extrait, rétrotranscrit en ADNc et amplifié par RT-qPCR. (**c**) Les cellules ont été stimulées comme en (a), puis marquées de manière intracellulaire pour suivre l'expression de la protéine ROR $\gamma$ t. Les cellules stimulées avec le 4-OHT sont représentées en trait noir continu, alors que celles en présence d'éthanol sont représentées en trait continu, et l'isotype contrôle est représenté en gris. L'expression indiquée en (**b**) est relative à celle de GAPDH. Les barres d'erreurs représentent la déviation standard. n=3 expériences indépendantes. p-value  $\leq 0.05$  \*,  $\leq 0.01$  \*\*,  $\leq 0.001$  \*\*\* et  $\leq 0.0001$  \*\*\*\*.

Nous avons observé que la translocation d'Ikaros dans les cellules stimulées avec du 4-OHT permet d'augmenter la transcription de *Rorc* de 6 fois, ainsi qu'une forte expression de la protéine ROR $\gamma$ t (**Figure 30 b-c**). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus précédemment, et montrent que Ikaros est un régulateur important de l'expression de ROR $\gamma$ t.

## 1.2 La délétion d'Ikaros diminue l'expression de ROR $\gamma$ t dans les lymphocytes TCD4 $^+$

Dans la continuité des résultats obtenus *in vitro*, l'implication d'Ikaros au cours de la différenciation en lymphocytes T $_{H17}$  a été étudiée *ex vivo* dans 2 modèles murins différents : (1) un modèle de délétion conditionnelle a été utilisé correspondant aux souris CD4-Cre Ikaros $^{fl/fl}$ , (2) un modèle de délétion inductible correspondant aux souris Rosa-Cre Ikaros $^{fl/fl}$ .

Le modèle CD4-Cre Ikaros $^{fl/fl}$  a été décrit (Geimer Le Lay et al., 2014) et permet une délétion lors de la maturation des thymocytes au stade DP. Nous avons vérifié par Western-Blot la délétion d'Ikaros dans les LT triés à partir de la rate et les LB ont servi de contrôle. Nous avons vu que Ikaros n'est plus exprimé dans les cellules T, alors que cela est toujours le cas dans les cellules B (**Figure 31a**). Ces souris peuvent développer des tumeurs à partir de 3 semaines de vie, et leur utilisation a été effectuée après contrôle du pourcentage en LTCD4 $^+$ , en LTCD8 $^+$  et en LT doubles positifs (CD4 $^+$ CD8 $^+$ ) dans le thymus. Les résultats obtenus dans ce modèle conditionnel ont été confirmés par l'utilisation d'un autre modèle murin inductible. L'efficacité de la délétion après injection de tamoxifène dans le modèle Rosa-Cre Ikaros $^{fl/fl}$  a été confirmée par Western-Blot également (**Figure 31b**). Ainsi, dans le modèle KO conditionnel et inductible, la délétion d'Ikaros est efficace.



**Figure 31: Vérification de la délétion d'Ikaros dans les modèles murins.** (a) Les cellules TCD4 $^+$ , TCD8 $^+$  ou B (B220 $^+$ ) ont été triées à partir de souris CD4-Cre Ikaros $^{fl/fl}$  (Ikaros $^{KO}$ ) et la délétion d'Ikaros vérifiée par Western-Blot. (b) Pour les souris Rosa-Cre Ikaros $^{fl/fl}$ , les cellules TCD4 $^+$  triées ont été utilisées pour vérifier la délétion d'Ikaros par Western-Blot. Le poids moléculaire (kDa) est représenté sur la droite des blots, et à gauche sont notés les protéines étudiées. La β-actin sert de contrôle de charge dans les expériences. Ik1 – Ikaros isoforme 1, Ik2 – Ikaros isoforme 2.

Pour étudier le rôle d'Ikaros au cours de la différenciation en LT $_{H17}$  dans les cellules WT et KO, les LTCD4 $^+$  naïfs provenant des ganglions ont été triés et mis en culture en présence d'anti-CD3, d'anti-CD28, d'IL-6 et de concentrations croissantes de TGF-β1 pendant 3 jours. Les concentrations croissantes en TGF-β1 permettent de contrôler la balance régulant la



différenciation en LT<sub>H</sub>17 ou en LTreg (Lainé *et al.*, 2015). En effet, ces deux populations ont besoin de TGF- $\beta$ 1 pour se différencier. Néanmoins, les LT<sub>H</sub>17 ont besoin de concentrations très faibles, alors que les LTreg se différencieront en fortes concentrations de TGF- $\beta$ 1 même en présence d'IL-6. L'analyse de l'expression de la protéine ROR $\gamma$ t a été effectuée par cytométrie de flux grâce à un marquage intracellulaire pour chaque modèle murin.

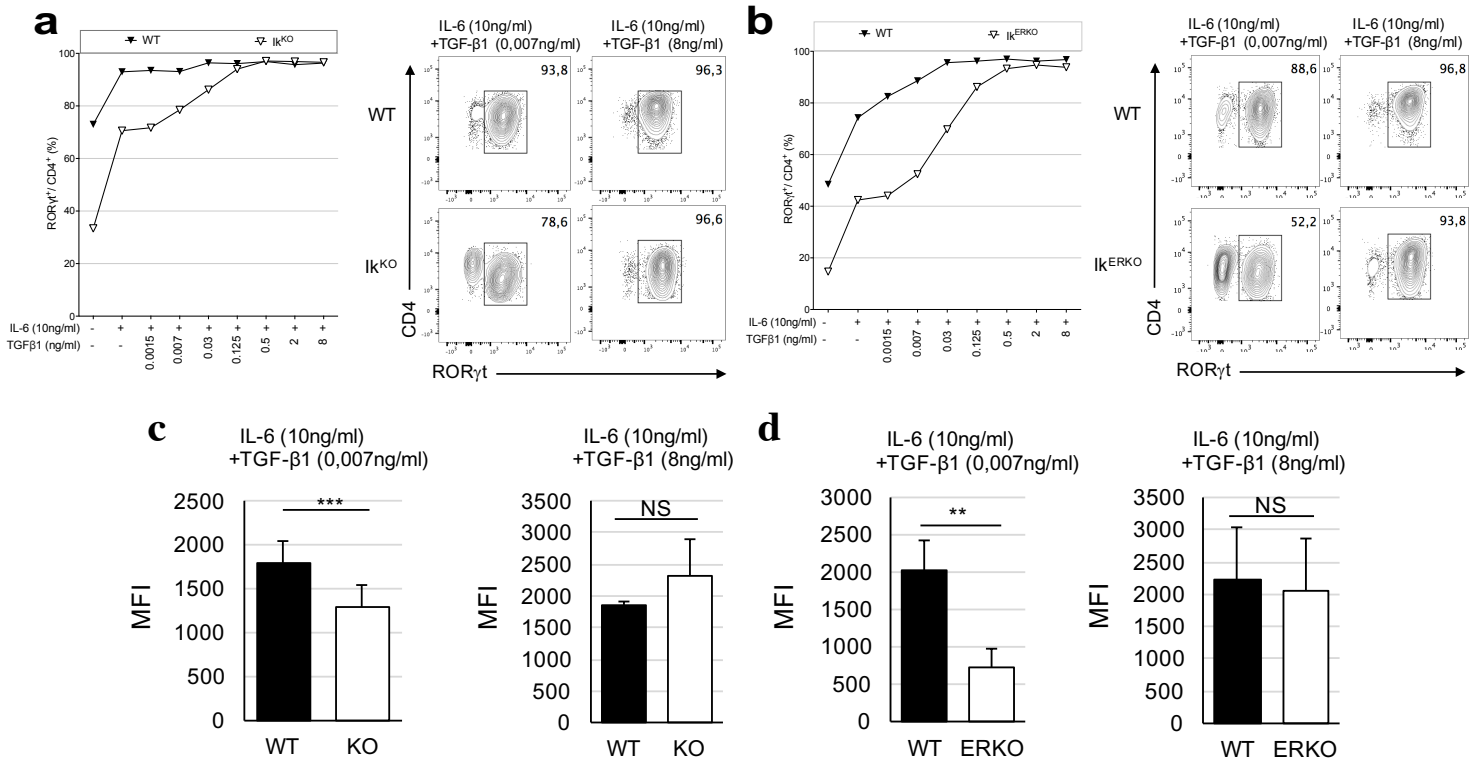
L'expression de ROR $\gamma$ t est diminuée dans les souris déficientes en Ikaros comparé aux souris WT. Néanmoins, à de fortes concentrations en TGF- $\beta$ 1 (8ng), la différence entre WT et KO s'estompe car les deux peuvent quasiment atteindre 100% de cellules positives pour ce facteur (**Figure 32 a-b**). Cette constatation est confirmée avec l'intensité moyenne de fluorescence (**Figure 32 c-d**). A de faibles concentrations en TGF- $\beta$ 1 (0,007ng), la différence d'intensité entre les cellules WT et KO est significative, alors que cela n'est plus le cas à de fortes concentrations en TGF- $\beta$ 1 (8ng). Ainsi, nos résultats suggèrent qu'en absence d'Ikaros, l'expression de ROR $\gamma$ t et la proportion de cellules exprimant ce facteur sont diminuées.

## **2. La délétion d'Ikaros inhibe la différenciation en LT<sub>H</sub>17 et en LTreg *in vitro***

### **2.1 Les cellules T déficientes en Ikaros ont un défaut d'expression de l'IL-17A**

ROR $\gamma$ t est le facteur clé de la différenciation en LT<sub>H</sub>17, car il régule l'expression de l'IL-17A. De ce fait, nous avons mesuré l'expression de cette cytokine par cytométrie de flux, car elle est majoritairement exprimée par les LT<sub>H</sub>17. Les cellules ont été marquées au niveau intracellulaire après 3 jours de culture avec un anticorps spécifique anti-IL-17A (**Figure 33**).

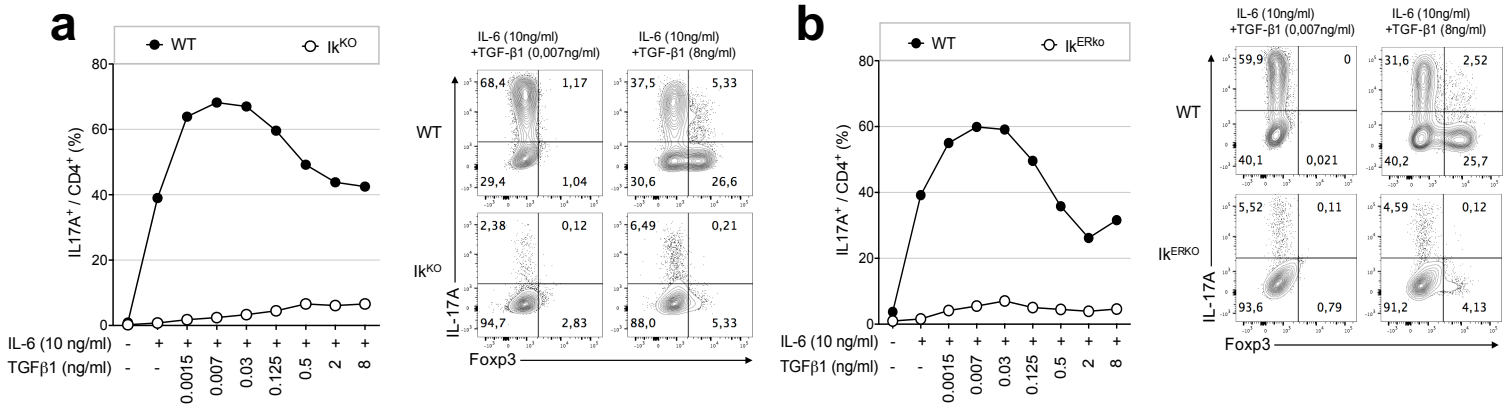
Nos résultats mettent en avant une absence d'expression d'IL-17A dans les cellules KO comparé aux cellules WT. La courbe obtenue pour ces dernières montre que la différenciation en LT<sub>H</sub>17 est maximale à de faibles concentrations en TGF- $\beta$ 1 (0,007ng), et que celle-ci diminue à de fortes concentrations en TGF- $\beta$ 1 (8ng), qui permettent la différenciation en LTreg préférentiellement même en présence d'IL-6. Les cellules KO, quant à elle, ne répondent pas, ou très peu à la différenciation, car à de faibles concentrations en TGF- $\beta$ 1, les cellules KO n'expriment pas d'IL-17A. L'ensemble de ces résultats suggère que les cellules KO ont un défaut d'expression d'IL-17A, provenant potentiellement d'un défaut de réponse aux cytokines présentes dans le milieu de culture.



**Figure 32: Les cellules déficientes en Ikaros ont un défaut d'expression de RORγt.** Les cellules TCD4<sup>naïves</sup> (CD4<sup>+</sup> CD44<sup>low</sup>/ CD25/NK1.1/TCRγδ) triées ont été placées en culture en présence d'anti-CD3, d'anti-CD28, d'IL-6 et de concentrations croissantes en TGF-β1 pendant 3 jours. Les cellules ont ensuite été restimulées pendant 2h en présence de PMA/ionomycine/GolgiPlug avant d'être marquées pour RORγt avec un anticorps spécifique. Les résultats obtenus pour les souris CD4-Cre *Ik<sup>ko</sup>* (a) et pour les souris Rosa-Cre *Ik<sup>erko</sup>* (b) sont présentés par des courbes représentant le pourcentage de cellules positives pour le marqueur étudié. Les FACS plots présentent un exemple d'expression de RORγt en conditions de différenciation T<sub>H</sub>17 (gauche) et Treg (droite). L'intensité moyenne de fluorescence (MFI) pour RORγt dans les souris CD4-Cre *Ik<sup>ko</sup>* (c) et dans les souris Rosa-Cre *Ik<sup>erko</sup>* (d) est représentée et calculé sur les cellules RORγt positives. Les conditions correspondantes au pic de différenciation en LT<sub>H</sub>17 (IL-6 + TGF-β1 0,007ng/mL) et en LTreg (IL-6 + TGF-β1 8ng/mL) sont décrites. Les souris proficientes pour Ikaros sont représentées en noir, alors que les souris déficientes sont représentées en blanc. Représentative de n=3 expériences indépendantes pour les courbes et n=3 expériences indépendantes pour les histogrammes. p-value ≤ 0.05 \*, ≤ 0.01 \*\*, ≤ 0.001 \*\*\* et ≤ 0.0001 \*\*\*\*.

## 2.2 L'utilisation d'anticorps bloquants pour les cellules T<sub>H</sub>1 et T<sub>H</sub>2 en culture ne permet pas la génération de cellules T<sub>H</sub>17 en absence d'Ikaros

Le défaut d'expression d'IL-17A en absence d'Ikaros peut s'expliquer par un biais de différenciation vers les sous-populations T<sub>H</sub>1 ou T<sub>H</sub>2. En effet, Ikaros est un FT dont le rôle a été décrit au cours de la différenciation en LT<sub>H</sub>2 (Quirion *et al.*, 2009), ainsi qu'au cours de la différenciation en LT<sub>H</sub>1 (Thomas *et al.*, 2010). Pour vérifier cette hypothèse, j'ai effectué des différenciations en LT<sub>H</sub>17 en présence ou en absence d'anticorps bloquants anti-IL-4 et anti-



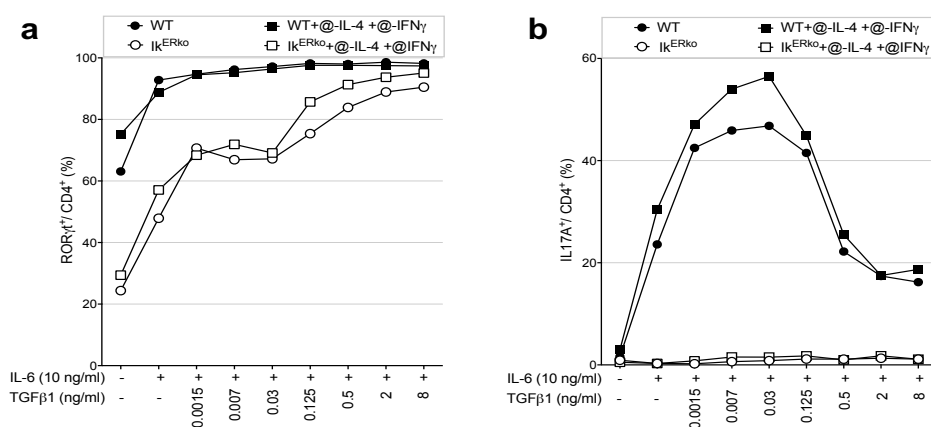
**Figure 33: Les cellules déficientes en Ikaros n’expriment pas d’IL-17A.** Les cellules TCD4-naïves triées ont été différenciées et stimulées comme décrit dans la figure 32, puis marquées pour l’expression d’IL-17A intra-cellulaire avec un anticorps spécifique. Les résultats obtenus pour les souris CD4-Cre Ikaros<sup>fl/fl</sup> (Ikaros<sup>KO</sup>) (a) et pour les souris Rosa-Cre Ikaros<sup>fl/fl</sup> (Ikaros<sup>ERKO</sup>) (b) sont présentés par des courbes représentant le pourcentage de cellules positives pour le marqueur étudié. Les FACS plots présentent un exemple d’expression d’IL-17A en conditions de différenciation T<sub>H</sub>17 (gauche) et Treg (droite). Les souris proficientes pour Ikaros sont représentées en noir, alors que les souris déficientes sont représentées en blanc. Représentative de n=3 expériences indépendantes.

IFN-γ afin de bloquer la différenciation en LT<sub>H</sub>2 et en LT<sub>H</sub>1 respectivement. Après 3 jours de culture en conditions de différenciation T<sub>H</sub>17, l’expression de RORγt et d’IL-17A ont été analysées par cytométrie de flux avec un marquage intra-cellulaire (Figure 34). Nous avons observé que l’ajout d’anticorps bloquants ne rétablit pas l’expression de RORγt et d’IL-17A dans les cultures KO (Figure 34). Cela suggère que le défaut de différenciation en LT<sub>H</sub>17 des cellules KO n’est pas dû à un biais de différenciation en cellules T<sub>H</sub>1 ou T<sub>H</sub>2.

### 2.3 La délétion d’Ikaros réduit la génération de lymphocytes Treg

Le défaut d’expression en IL-17A observé en absence d’Ikaros pourrait aussi être la conséquence d’une différenciation en iTreg plus efficace, car il existe une relation réciproque entre les LT<sub>H</sub>17 et les LTreg. Dans le même puit de culture, les concentrations croissantes de TGF-β1 permettent d’évaluer le développement des LT<sub>H</sub>17 et iTreg. J’ai donc mesuré le pourcentage de cellules iTreg dans mes conditions de culture par marquage intra-cellulaire de FoxP3, facteur de transcription clé de la différenciation de ces cellules. Les résultats obtenus pour les cellules WT montrent qu’à de faibles concentrations en TGF-β1, les cellules Treg ne se différencient pas car ces concentrations induisent une différenciation en LT<sub>H</sub>17, mais à de fortes concentrations en TGF-β1, même en présence d’IL-6, nous obtenons des LTreg et mettons en évidence la balance entre les LT<sub>H</sub>17 et les LTreg (Figure 35). Les résultats obtenus

chez le KO montrent qu'à de fortes concentrations en TGF- $\beta$ 1, les LTreg se différencient peu, voire pas.



**Figure 34: L'ajout d'anticorps bloquants ne permet pas la génération de lymphocytes T<sub>H</sub>17 en absence d'Ikaros.** Les cellules TCD4<sup>+</sup> naïves triées ont été placées en culture en présence d'anti-CD3, d'anti-CD28, d'anti-IL4, d'anti-IFN $\gamma$ , d'IL-6 et de concentrations croissantes en TGF- $\beta$ 1 pendant 3 jours. Les cellules ont ensuite été restimulées pendant 2h en présence de PMA/ionomycine/GolgiPlug avant d'être marquées pour ROR $\gamma$ t (a) et pour IL-17A (b) avec un anticorps spécifique. Les résultats obtenus sont présentés sous forme de courbes représentant le pourcentage de cellules positives pour le marqueur étudié. Les souris proficientes pour Ikaros sont représentées en noir, alors que les souris déficientes sont représentées en blanc. Représentative de n=2 expériences indépendantes.

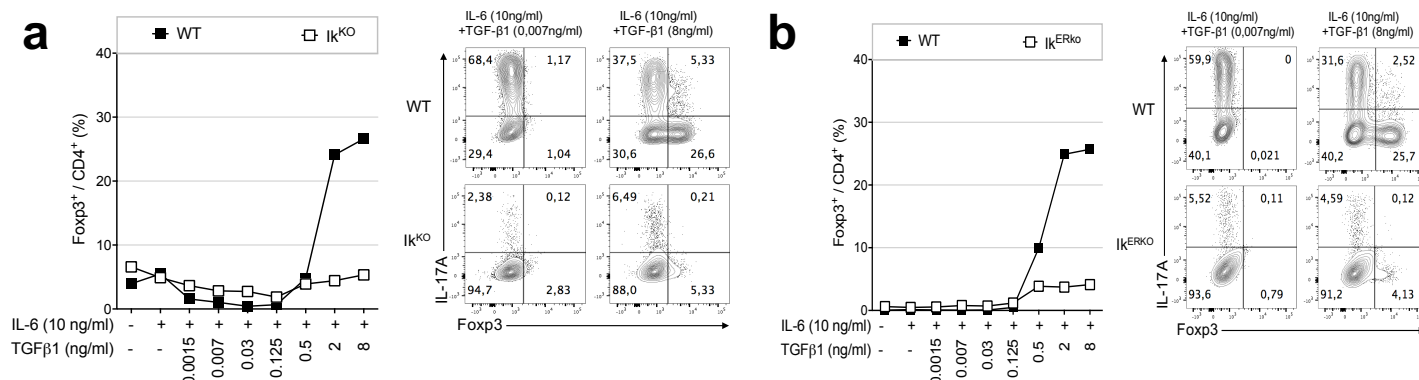
Les résultats obtenus suggèrent que le défaut d'expression d'IL-17A n'est pas dû à une plus forte différenciation des cellules KO en LTreg et quelque soit le modèle murin utilisé au cours des expériences.

Ainsi, tous les résultats obtenus précédemment suggèrent que les cellules déficientes en Ikaros ne peuvent pas se différencier en LT<sub>H</sub>17 au cours des cultures effectuées, probablement à cause d'un défaut dans la réponse au TGF- $\beta$ 1, puisque ces cellules ne présentent pas de biais de différenciation vers une autre sous-population au cours des cultures effectuées.

### 3. Ikaros régule d'autres facteurs au cours de la différenciation des lymphocytes T<sub>H</sub>17

Les résultats obtenus précédemment montrent qu'Ikaros est un facteur important au cours de la différenciation en LT<sub>H</sub>17. Néanmoins, les cellules T<sub>H</sub>17 n'expriment pas seulement l'IL-17A, et comme décrit en introduction (Figure 9), d'autres facteurs sont impliqués mis à part ROR $\gamma$ t au cours de la différenciation. Pour avoir une vision plus globale de l'effet de la délétion d'Ikaros sur l'expression génique, nous avons effectués une analyse transcriptomique

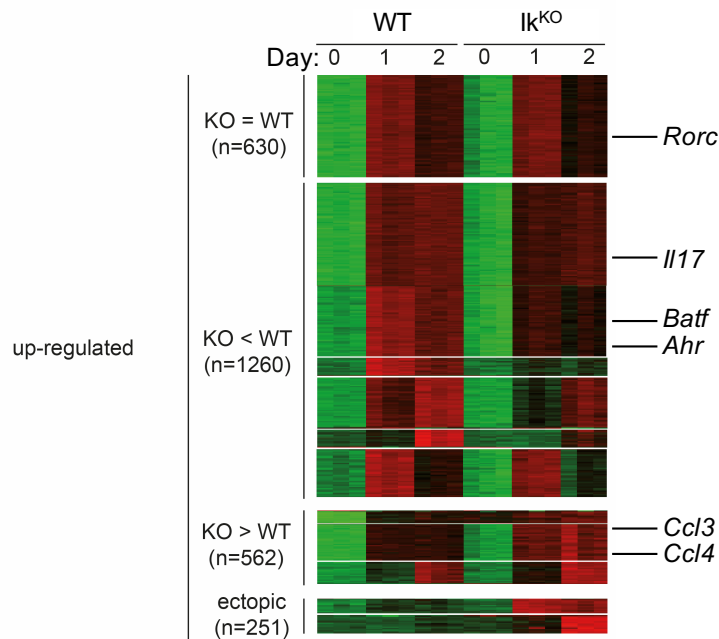
par puces Affymetrix. Nous avons utilisé des LTCD4<sup>+</sup> naïfs triés à partir des souris CD4-Cre I $\kappa$ <sup>tr</sup> pour exclure un effet potentiel d'autres populations *in vivo*. Ces LTCD4<sup>+</sup> naïfs ont ensuite



**Figure 35: Les cellules déficientes en Ikaros n'expriment pas FoxP3.** Les cellules TCD4<sup>+</sup> naïves triées ont été cultivées et stimulées comme décrit dans la figure 32 avant d'être marquées pour FoxP3 avec un anticorps spécifique. Les résultats obtenus pour les souris CD4-Cre I $\kappa$ <sup>tr</sup> (Ik<sup>KO</sup>) (a) et pour les souris Rosa-Cre I $\kappa$ <sup>tr</sup> (Ik<sup>ERKO</sup>) (b) sont présentés par des courbes donnant le pourcentage de cellules positives pour le marqueur étudié. Les FACS plots présentent un exemple d'expression de FoxP3 en conditions de différenciation T<sub>H</sub>17 (gauche) et Treg (droite). Les souris proficientes pour Ikaros sont représentées en noir, alors que les souris déficientes sont représentées en blanc. Représentative de n=3 expériences indépendantes.

été mis en culture T<sub>H</sub>17 en présence d'anti-CD3, d'anti-CD28, d'anti-IFN $\gamma$ , d'anti-IL4, d'IL-6 et de TGF- $\beta$ 1 et récupérés après 24 et 48h. L'ARN de celles-ci a été extrait afin d'effectuer une analyse du transcriptome grâce à des puces Affymetrix. Quatre groupes principaux de gènes ont été observés après analyse des résultats : i) Un groupe contenant 630 gènes exprimés de la même manière entre les cellules WT et KO, ii) Un groupe contenant 1230 gènes exprimés plus fortement dans les cellules WT, iii) Un groupe contenant 562 gènes exprimés plus fortement dans les cellules KO, iv) Un groupe contenant 251 gènes exprimés uniquement dans les cellules KO. Parmi les gènes moins fortement exprimés dans les cellules Ik<sup>KO</sup> comparé aux cellules WT, nous retrouvons le gène *Rorc*, ainsi que le gène *Ill17a*. Nous retrouvons également d'autres gènes impliqués dans la différenciation des LT<sub>H</sub>17 comme *Batf* ainsi que *Ahr* (Figure 36). Ces gènes font partie d'un groupe composé de 1260 gènes montrant un effet important de la délétion d'Ikaros au cours de la différenciation sur les gènes régulant les LT<sub>H</sub>17. Nous avons également observé une augmentation de l'expression de certains gènes dans les cellules déficientes comparé aux cellules proficientes. Ainsi, un groupe composé de 562 gènes contient entre autres les marqueurs *Ccl3* et *Ccl4* décrits dans la littérature comme faisant partie d'une signature pathogénique (Lee et al., 2012). Enfin, il est à noter qu'un groupe composé de 251 gènes n'est exprimé que dans les cellules Ik<sup>KO</sup>. Ce groupe de gènes dits ectopiques sera décrit plus en détail dans le point suivant. Au final, ces résultats suggèrent que la délétion d'Ikaros a un impact sur

les gènes régulant la différenciation en LT<sub>H</sub>17, mais qu'elle a aussi un impact plus général en touchant d'autres gènes non impliqués dans cette voie.



**Figure 36: La délétion d'Ikaros régule l'expression de nombreux gènes importants dans la différenciation en LT<sub>H</sub>17.** Les lymphocytes TCD4<sup>+</sup> naïfs (CD4<sup>+</sup> CD44<sup>low</sup> CD25<sup>-</sup> CD62L<sup>+</sup>) ont été triés à partir de souris CD4-Cre Ik<sup>fl</sup>, puis mis en culture en présence d'anti-CD3, d'anti-CD28, d'anti-IFN $\gamma$ , d'anti-IL4, d'IL-6 et de TGF- $\beta$ 1 ou non. Les cellules ont été récupérées après 1 jour, et 2 jours de culture, et l'ARN a été extrait pour une expérience de transcriptome sur puces Affymetrix. Le jour 0 correspond aux cellules TCD4<sup>+</sup> naïves. Chaque groupe est délimité en fonction de l'expression des gènes exprimés dans les cellules KO comparé au WT. Le nombre de gènes représenté dans chaque groupe est noté entre parenthèses. Vert : faible expression ; rouge : forte expression. n=3 expériences indépendantes.

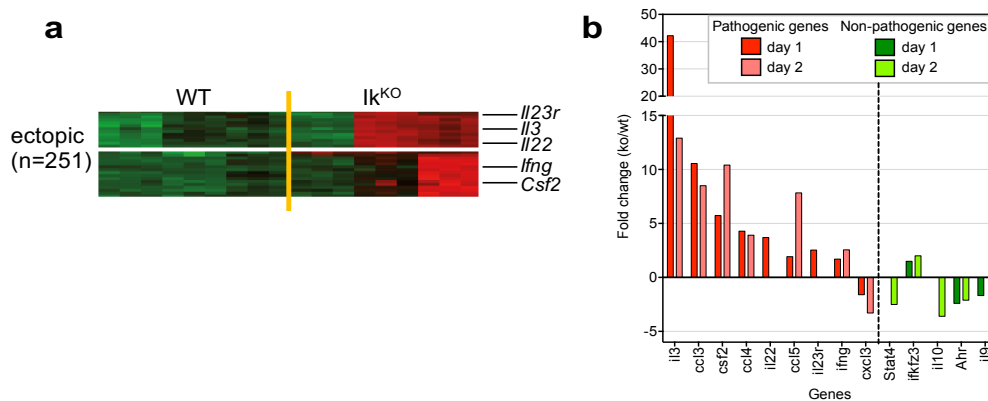
#### 4. Ikaros est un régulateur de gènes décrits comme pathogénique

##### 4.1 La délétion d'Ikaros augmente l'expression d'un groupe de gènes pathogéniques

Lee et al. ont publié en 2012 la description d'une population de LT<sub>H</sub>17 pathogéniques exprimant entre autres GM-CSF, IL-3 ou encore IFN- $\gamma$  qu'ils ont obtenu en présence d'IL-6 et de TGF- $\beta$ 3. Afin de caractériser la population KO obtenue au cours des cultures, nous avons croisés les résultats de notre expérience de transcriptome avec la signature publiée. Notre analyse a montré que le groupe de 250 gènes exprimés seulement dans les cellules Ik<sup>KO</sup> contient un grand nombre de gènes de la signature pathogénique (**Figure 37**). Parmi ces gènes se trouve l'*Il3* qui a été décrit comme le facteur le plus fortement exprimé par les cellules pathogéniques, mais se trouve également *Csf2*, codant pour GM-CSF, et décrit comme impliqué dans de

nombreuses MAI (**Figure 37a**). En se basant sur l'analyse de *Lee et al.* nous avons classé également les gènes importants dans la différenciation en LT<sub>H</sub>17 régulateurs et pathogéniques, afin d'observer leur régulation en fonction du jour d'analyse, et de la présence ou non d'Ikaros (**Figure 37b**). Nous avons vu que les gènes de la signature pathogénique sont fortement exprimés chez le KO, avec *Ii3* le plus fortement dérégulé, correspondant à la littérature. De plus, nous retrouvons également *Csf2* parmi les gènes dérégulés en accord avec *Lee et al.* et en parallèle, les gènes de la signature non-pathogénique comme *Ii10* sont moins fortement exprimés dans le KO comparé au WT. Ces résultats suggèrent que les cellules Ik<sup>KO</sup> adoptent directement un phénotype pathogénique en condition de culture régulatrice (TGF-β1 + IL-6), et que Ikaros est un facteur important dans la régulation de ce phénotype.

Nous avons vérifié que les sondes utilisées lors de notre transcriptome étaient bien spécifiques, en effectuant des qPCR et en utilisant des séquences pour des gènes importants lors de la différenciation en LT<sub>H</sub>17. Des amorces ont également été utilisées pour étudier les membres de la famille Ikaros au cours de la différenciation. Les résultats obtenus montrent qu'il n'y a pas de différence pour l'expression de *Rorc*, ni pour celle d'*Ii17a* dans l'expérience (**Figure 38a**), ce qui va à l'encontre de ce qui a été montré jusqu'à présent. Cependant, *Batf* et *Ahr* sont moins fortement exprimés dans les LT<sub>H</sub>17 provenant de cellules KO comparé aux cellules WT. L'expression d'*Ii10* est également diminuée dans les KO comme ce qui a été publié et va dans le sens de la mise en place d'une signature pathogénique. L'expression du gène *Ikzf1* est nulle dans les cellules KO, confirmant que les souris KO utilisées étaient bien délétées comparé aux souris WT (**Figure 38b**), alors que les résultats obtenus pour les autres membres montrent que *Ikzf2*, codant pour Helios, est fortement exprimé dans les cellules Ik<sup>KO</sup>



**Figure 37: La délétion d'Ikaros entraîne une augmentation de l'expression des gènes pathogéniques.** (a) Le groupe de gènes ectopiques représenté en figure 36 est présenté plus en détails. Vert : faible expression ; rouge : forte expression. (b) Le rapport des fold change a été effectué entre KO et WT pour les gènes de la signature pathogénique, et ceux de la signature régulatrice, et est représenté sous forme de diagramme. Les gènes pathogéniques sont représentés en rouge, alors que les gènes régulateurs sont représentés en vert.

non stimulées comparé aux cellules WT, tout comme *Ikaros*, codant pour Aiolos. Ce dernier a déjà été décrit comme étant un activateur de la différenciation T<sub>H</sub>17, par inhibition de la voie IL-2 (Quintana *et al.*, 2012).

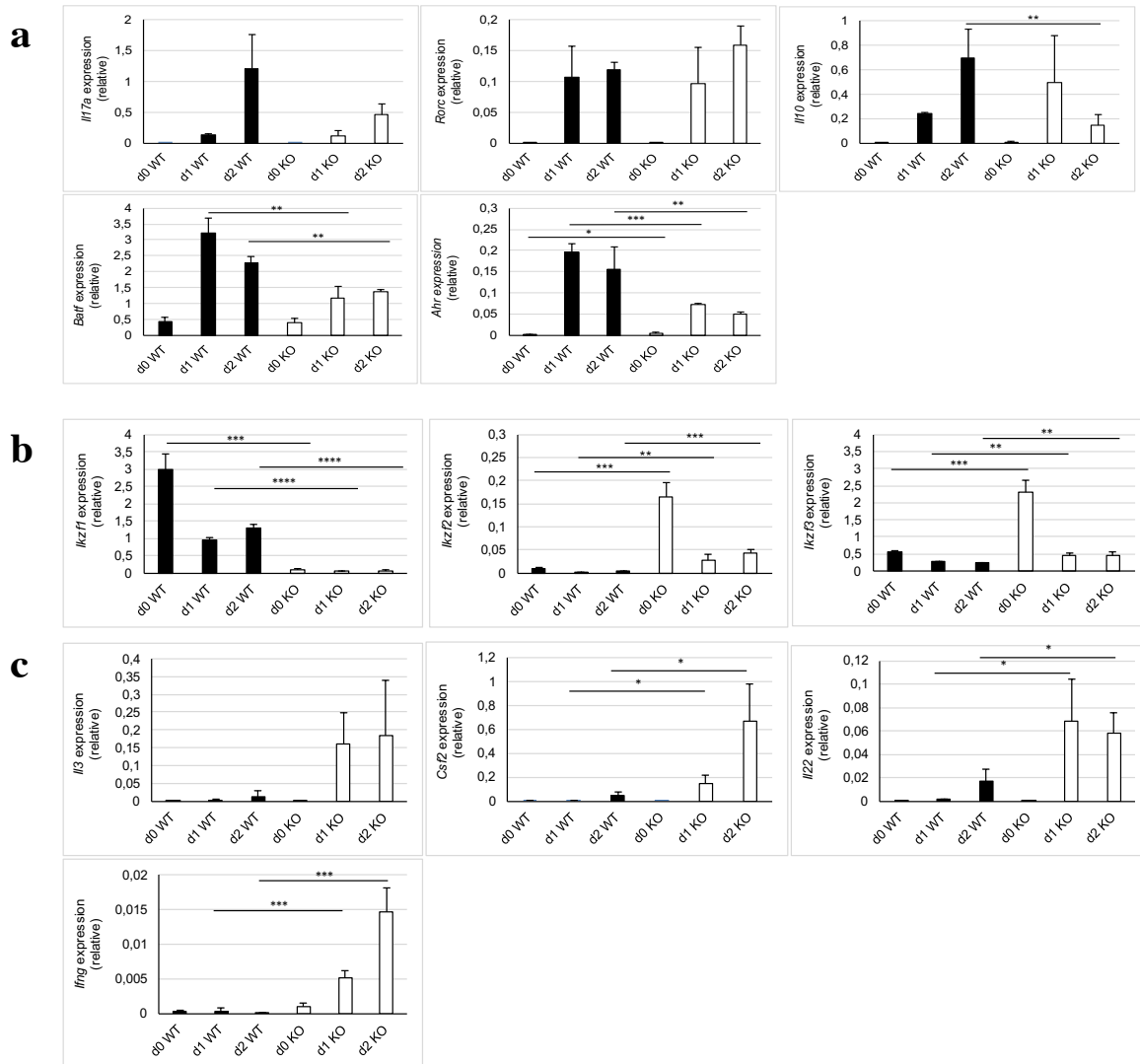
Concernant les gènes de la signature pathogénique, tous ceux testés sont plus fortement exprimés dans le KO comparé au WT, suggérant que la signature pathogénique est présente en absence d'Ikaros (Figure 38c). Puis dans l'ensemble, les résultats obtenus lors de notre transcriptome suggèrent que Ikaros inhibe l'expression des gènes pathogéniques en condition de différenciation T<sub>H</sub>17 régulatrice.

#### **4.2 La délétion d'Ikaros entraîne une augmentation de l'expression de GM-CSF**

Les travaux publiés par Codarri *et al.* et par El-Behi *et al.* en 2011 mettent en avant le fait que les cellules T<sub>H</sub>17 pathogéniques expriment la cytokine GM-CSF, et sont impliquées au cours des pathologies autoimmunes inflammatoires. Les travaux de Codarri *et al.* suggèrent que ROR $\gamma$ t est le facteur régulant l'expression de GM-CSF dans les cellules T<sub>H</sub>17. De plus, El-Behi *et al.* ont suggéré que le TGF- $\beta$ 1 inhibe l'expression de GM-CSF au cours de la différenciation. Ainsi, nous avons voulu vérifier qu'il y avait bien une production élevée de GM-CSF par les cellules déficientes en Ikaros. Pour étudier l'expression de GM-CSF au niveau protéine par cytométrie de flux, nous avons effectué des cultures en présence d'IL-6 et de TGF- $\beta$ 1 pendant 3 jours (Figure 39). Nous avons observé qu'en absence d'Ikaros, l'expression de GM-CSF est plus élevée et suit celle de l'IL-17A représentée plus haut. Les résultats obtenus pour les cellules WT, quant à eux, montrent que l'ajout de TGF- $\beta$ 1 inhibe l'expression de GM-CSF, alors qu'en absence de cytokines dans le milieu, l'expression entre WT et KO est quasiment la même. Les résultats obtenus suggèrent que: 1) L'absence d'Ikaros permet l'expression de GM-CSF et implique donc un effet inhibiteur de ce premier ; 2) L'ajout d'IL-6 seul semble activer l'expression de GM-CSF dans les cellules KO.

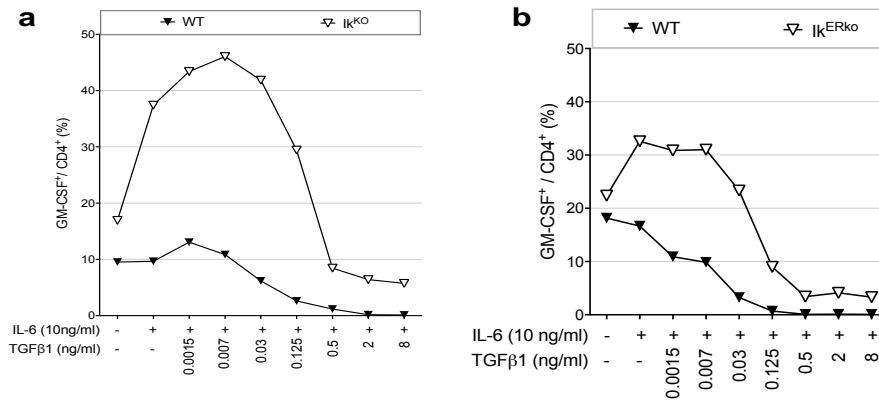
Lee *et al.* ont montré que les cellules T<sub>H</sub>17 différenciées en condition de culture pathogénique expriment toujours ROR $\gamma$ t, mais également GM-CSF, alors qu'en parallèle, ces cellules n'expriment plus, ou très peu d'IL-17A (Lee *et al.*, 2012). Ainsi, nous avons suivi l'expression d'IL-17A et de ROR $\gamma$ t par cytométrie de flux dans nos cultures en parallèle de GM-CSF, afin de voir si dans les cellules KO, l'expression de ROR $\gamma$ t corrèle avec l'expression de GM-CSF (Figure 40). Nous avons observé que les cellules KO expriment GM-CSF et pas





**Figure 38: L’absence d’Ikaros dérégule l’expression des gènes différentiellement.** Les ADNc provenant de la plateforme de Biopuces et Séquençages de l’IGBMC ont été utilisés pour comparer l’expression entre KO et WT par qPCR. Les résultats montrés représentent la moyenne des triplicats biologiques pour chaque condition. Le mutant est représenté en blanc, et le WT en noir. **(a)** Expression des gènes de la signature des lymphocytes  $T_H17$ . **(b)** Expression des gènes de la famille Ikaros et des gènes importants au cours de la différenciation en  $LT_H17$  régulateurs. **(c)** Expression des gènes impliqués lors de la différenciation en  $LT_H17$  pathogéniques. L’expression des gènes a été normalisée par rapport à celle du gène *L32*. Les barres d’erreurs représentent la déviation standard entre les 3 expériences. n=3 expériences indépendantes. p-value  $\leq 0.05$  \*,  $\leq 0.01$  \*\*,  $\leq 0.001$  \*\*\* et  $\leq 0.0001$  \*\*\*\*.

IL-17A, au contraire de ce que nous pouvons voir pour 19% de cellules chez le WT (**Figure 40 a-b**). De plus, nous avons observé que les cellules exprimant ROR $\gamma$ t pouvait également exprimer GM-CSF, allant dans le sens de ce qui est décrit dans la littérature (**Figure 40 c-d**). Ces résultats suggèrent que les cellules KO ne sont pas des  $LT_H17$  pathogéniques, car elles n’expriment pas d’IL-17A, et pourrait correspondre à une autre sous-population de lymphocytes décrit comme n’exprimant que GM-CSF (*Sheng et al.*, 2014).

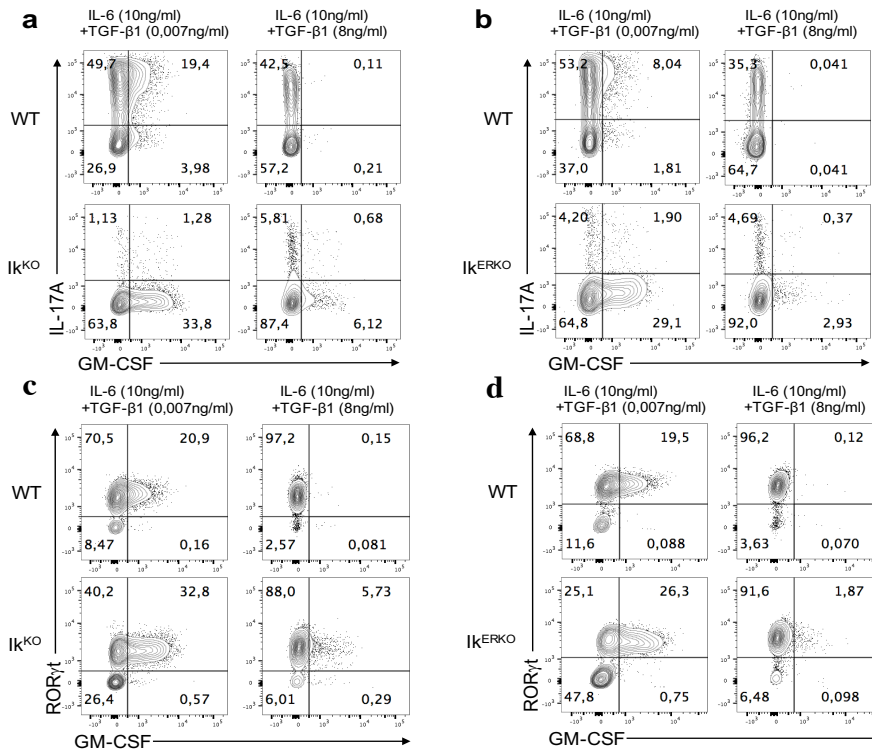


**Figure 39: La délétion d'Ikaros augmente l'expression de GM-CSF en conditions de cultures régulatrices.** Les cellules TCD4<sup>+</sup> naïves triées ont été placées en culture en présence d'anti-CD3, d'anti-CD28, d'IL-6 et de concentrations croissantes en TGF-β1 pendant 3 jours. Les cellules ont ensuite été restimulées pendant 2h en présence de PMA/ionomycine/GolgiPlug avant d'être marquées pour GM-CSF avec un anticorps spécifique. Les résultats obtenus pour les souris CD4-Cre (Ik<sup>KO</sup>) (a) et pour les souris Rosa-Cre (Ik<sup>ERKO</sup>) (b) sont présentés par des courbes représentant le pourcentage de cellules positives pour le marqueur étudié. Les souris proficientes pour Ikaros sont représentées en noir, alors que les souris déficientes sont représentées en blanc. Représentative de n=3 expériences indépendantes.

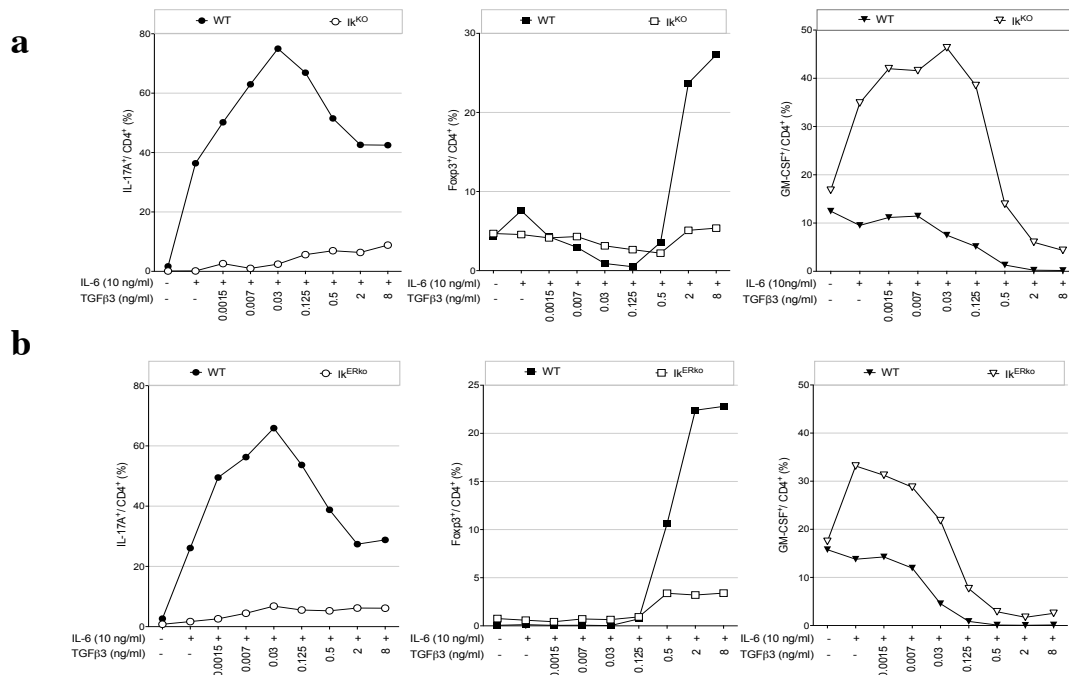
#### 4.3 Les cellules déficientes en Ikaros ont le même phénotype en conditions de différenciation pathogénique et régulatrice

Les cellules T<sub>H</sub>17 ont été obtenues jusqu'à présent en utilisant un milieu de culture contenant de l'IL-6 et du TGF-β1. Néanmoins, ces cellules peuvent également être obtenues en conditions pathogéniques en présence de TGF-β3 et d'IL-6 (Lee et al., 2012), ou en présence d'IL-1β, d'IL-6 et d'IL-23 (Ghoreschi et al., 2006). Les cultures que nous avons effectuées en absence de TGF-β n'ont pas permis d'obtenir des cellules WT exprimant de l'IL-17A, alors que cela a été décrit dans la littérature (Ghoreschi et al., 2006). Nos cultures en présence de TGF-β3 ont, quant à elles, apporté plus d'informations concernant ces cytokines. La publication de Lee et al. a mis en avant que le TGF-β3 est produit en réponse à la stimulation par l'IL-23, et que ce TGF-β agit de manière autocrine sur les cellules permettant la production de GM-CSF (Lee et al., 2012). De ce fait, l'utilisation du TGF-β3 en culture permet d'outrepasser la culture initiale comprenant IL-6 et TGF-β1, puis IL-23.

J'ai initié des différenciations en conditions pathogéniques en présence de TGF-β3 et d'IL-6 pendant 3 jours, puis j'ai étudié l'expression d'IL-17A, de FoxP3 et de GM-CSF par marquage intra-cellulaire, dans les cellules déficientes et proficientes pour Ikaros par cytométrie de flux (Figure 41).



**Figure 40: Les cellules KO exprimant GM-CSF expriment également RORγt mais n'expriment pas IL-17A.** Représentation des cellules décrites en figure 39 pour les souris CD4-Cre *Ik<sup>fl</sup>* (a et c) et pour les souris Rosa-Cre *Ik<sup>fl</sup>* (b et d) sous forme de FACS plot. Les marqueurs étudiés ainsi que les conditions de culture sont indiqués. Le pourcentage de cellules dans chaque cadran est représenté. Représentative de n=3 expériences indépendantes.

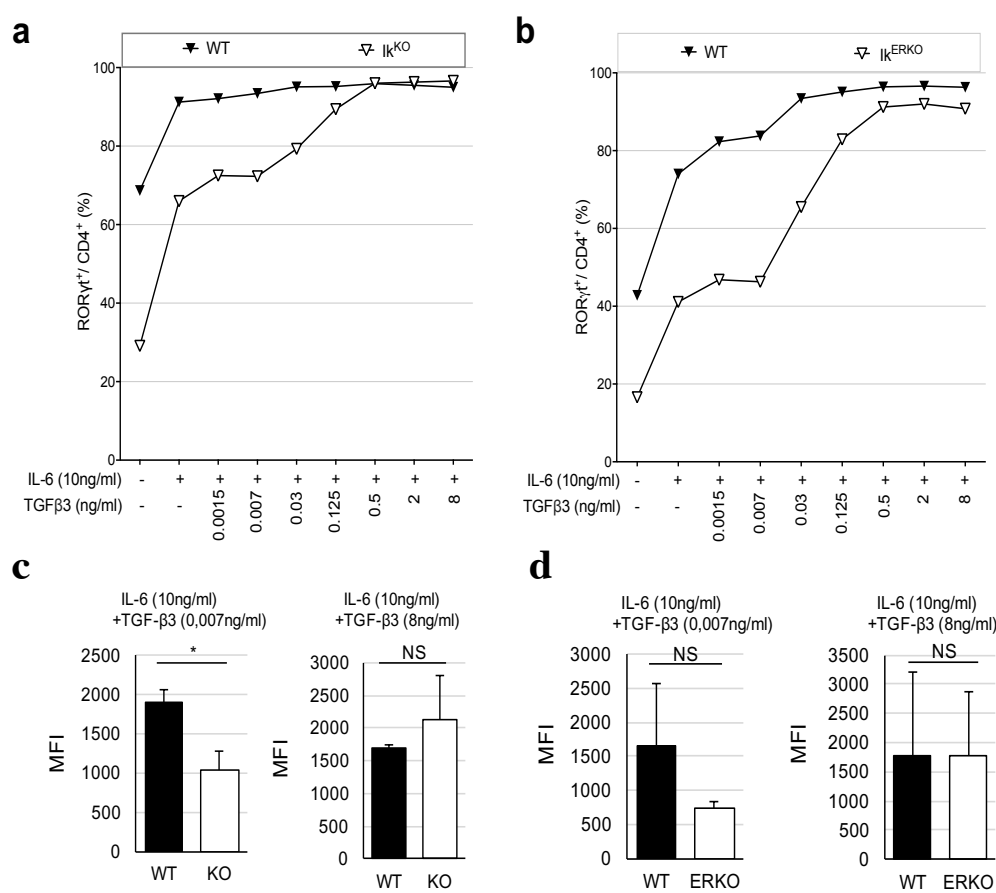


**Figure 41: TGF-β3 a le même effet sur les cellules déficientes en Ikaros que le TGF-β1.**

Les cellules TCD4<sup>+</sup> naïves triées (CD4<sup>+</sup> CD44<sup>low</sup> CD25/NK1.1/TCRγδ) ont été placées en culture en présence d'anti-CD3, d'anti-CD28, d'IL-6 et de concentrations croissantes en TGF-β3 pendant 3 jours. Les cellules ont ensuite été restimulées pendant 2h en présence de PMA/ionomycine/GolgiPlug avant d'être marquées pour IL-17A, FoxP3, et GM-CSF avec un anticorps spécifique. Les résultats obtenus pour les souris CD4-Cre (*Ik<sup>KO</sup>*) (a) et pour les souris Rosa-Cre (*Ik<sup>ERKO</sup>*) (b) sont présentés par des courbes représentant le pourcentage de cellules positives pour le marqueur étudié. Les souris proficientes pour Ikaros sont représentées en noir, alors que les souris déficientes sont représentées en blanc. Représentative de n=3 expériences indépendantes.

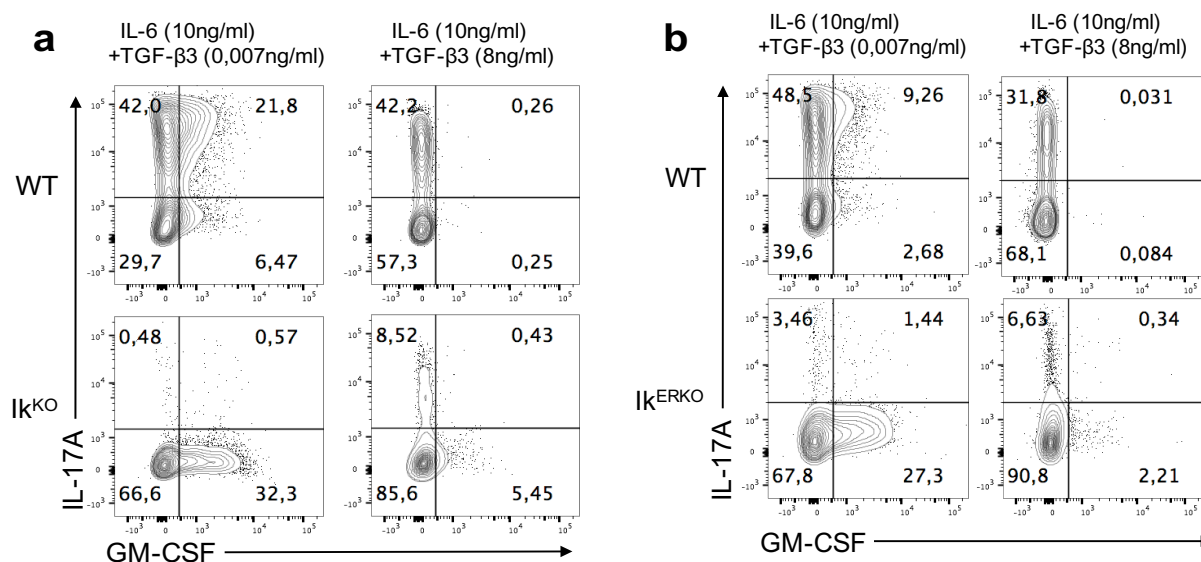
Nous avons observé que l'effet du TGF- $\beta$ 3 sur les cellules KO est le même que celui du TGF- $\beta$ 1, car elles n'expriment pas ou peu d'IL-17A, de FoxP3, et expriment fortement GM-CSF, au contraire des cellules WT. Ces résultats suggèrent que TGF- $\beta$ 3 ne permet pas la différenciation en LT<sub>H</sub>17 dans les cellules KO, et que cela n'est pas dû à une différenciation plus importante en LTreg. De plus, les fortes concentrations en TGF- $\beta$ 3 inhibent l'expression de GM-CSF. Ainsi, nos résultats suggèrent que l'utilisation de TGF- $\beta$ 3 directement en présence d'IL-6 ne permet pas d'obtenir des LT<sub>H</sub>17 pathogéniques dans les cellules WT, au contraire de la publication de *Lee et al.* qui montre que les cellules WT expriment du GM-CSF en présence de TGF- $\beta$ 3 et d'IL-6.

Comme avec le TGF- $\beta$ 1, nous avons observé l'expression de ROR $\gamma$ t après 3j de culture en présence de TGF- $\beta$ 3 par cytométrie de flux après marquage intra-cellulaire (**Figure 42**). Comme avec TGF- $\beta$ 1, l'expression de ROR $\gamma$ t est diminuée dans les souris déficientes en Ikaros comparé aux souris WT. Néanmoins, à de fortes concentrations en TGF- $\beta$ 3 (8ng), la différence entre WT et KO s'estompe car les deux peuvent quasiment atteindre 100% de cellules positives pour ce facteur, suggérant également un effet similaire du TGF- $\beta$ 3 sur les cellules KO.



**Figure 42:** La culture en condition pathogénique a le même impact sur l'expression de ROR $\gamma$ t que la culture en condition régulatrice. Les cellules décrites en figure 41 ont été marquées pour ROR $\gamma$ t avec un anticorps spécifique. Les résultats obtenus pour les souris CD4-Cre (I $\kappa$ <sup>KO</sup>) (**a**) et pour les souris Rosa-Cre (I $\kappa$ <sup>ERKO</sup>) (**b**) sont présentés par des courbes représentant le pourcentage de cellules positives pour le marqueur étudié. L'intensité de fluorescence pour ROR $\gamma$ t dans les souris CD4-Cre (**c**) et pour les souris Rosa-Cre (**d**) est également représentée sous forme de diagramme et calculé sur les cellules ROR $\gamma$ t positives. Les souris proficientes pour Ikaros sont représentées en noir, alors que les souris déficientes sont représentées en blanc. Représentative de n=3 expériences indépendantes. p-value  $\leq 0.05$  \*,  $\leq 0.01$  \*\*,  $\leq 0.001$  \*\*\* et  $\leq 0.0001$  \*\*\*\*. NS : non significatif.

Enfin, en présence de TGF- $\beta$ 3, tout comme en présence de TGF- $\beta$ 1, les cellules qui expriment GM-CSF dans les cellules Ik<sup>ko</sup> n'expriment pas IL-17A (**Figure 43**). Ce résultat suggère que les cellules KO ne répondent pas correctement aux cytokines présentes dans le milieu de culture aboutissant à un biais dans l'expression de ROR $\gamma$ t, de FoxP3, d'IL-17A et de GM-CSF.

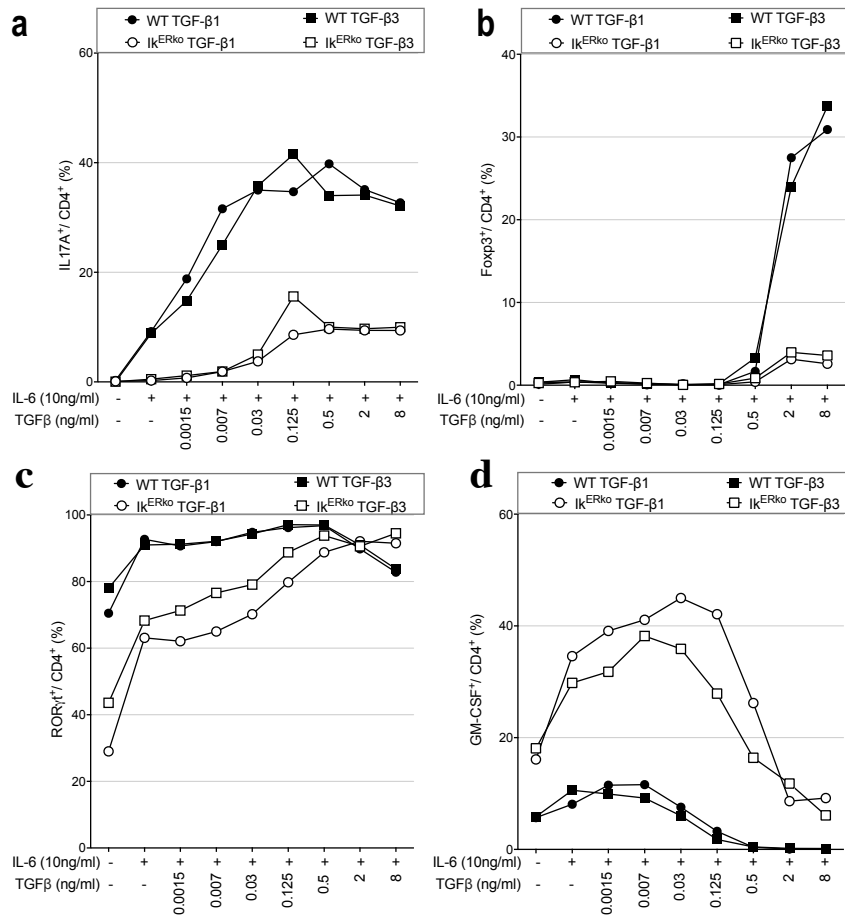


**Figure 43: Les cellules déficientes en Ikaros expriment GM-CSF et ROR $\gamma$ t, mais n'expriment pas IL-17A.** Représentation des cellules décrites en figure 42 sous forme de FACS plot. Les marqueurs étudiés ainsi que les conditions de culture sont indiqués. Les résultats obtenus pour les souris CD4-Cre (Ik<sup>ko</sup>) (**a**) et pour les souris Rosa-Cre (Ik<sup>ERKO</sup>) (**b**) sont présentés. Le pourcentage de cellules dans chaque cadran est représenté. Représentative de n=3 expériences indépendantes.

#### 4.4 Le phénotype observé est toujours présent en utilisant un autre sérum

Les résultats obtenus dans nos conditions de culture ne permettent pas de reproduire ceux publiés dans la littérature concernant TGF- $\beta$ 1 et TGF- $\beta$ 3. Ceci peut être dû aux conditions de culture utilisées au cours de ces différenciations, et potentiellement au sérum de veau fœtal qui contient des composants pouvant influencer les cellules. Afin de tester l'influence éventuelle du sérum sur nos résultats, nous avons effectué des cultures en conditions régulatrice et pathogénique pendant 3 jours dans le même milieu de culture, mais avec un sérum différent (**Figure 44**). Nous avons suivi l'expression de ROR $\gamma$ t, IL-17A, FoxP3 et GM-CSF par marquage intra-cellulaire et cytométrie de flux dans les cellules WT et KO. Les résultats obtenus montrent que le changement de sérum n'a pas modifié le défaut d'expression de ROR $\gamma$ t, de l'IL-17A, et de FoxP3 en absence d'Ikaros. De même, la forte expression de GM-CSF est conservée avec le nouveau sérum en présence de TGF- $\beta$ 1 et de TGF- $\beta$ 3. Ces résultats suggèrent que le phénotype observé dans les cellules KO n'est pas dû à un biais induit par le milieu de

culture, mais provient bien de la délétion d'Ikaros. De plus, nos résultats montrent encore une fois qu'il n'y a pas de différence entre TGF- $\beta$ 1 et TGF- $\beta$ 3 dans l'induction de la différenciation en LT<sub>H</sub>17.

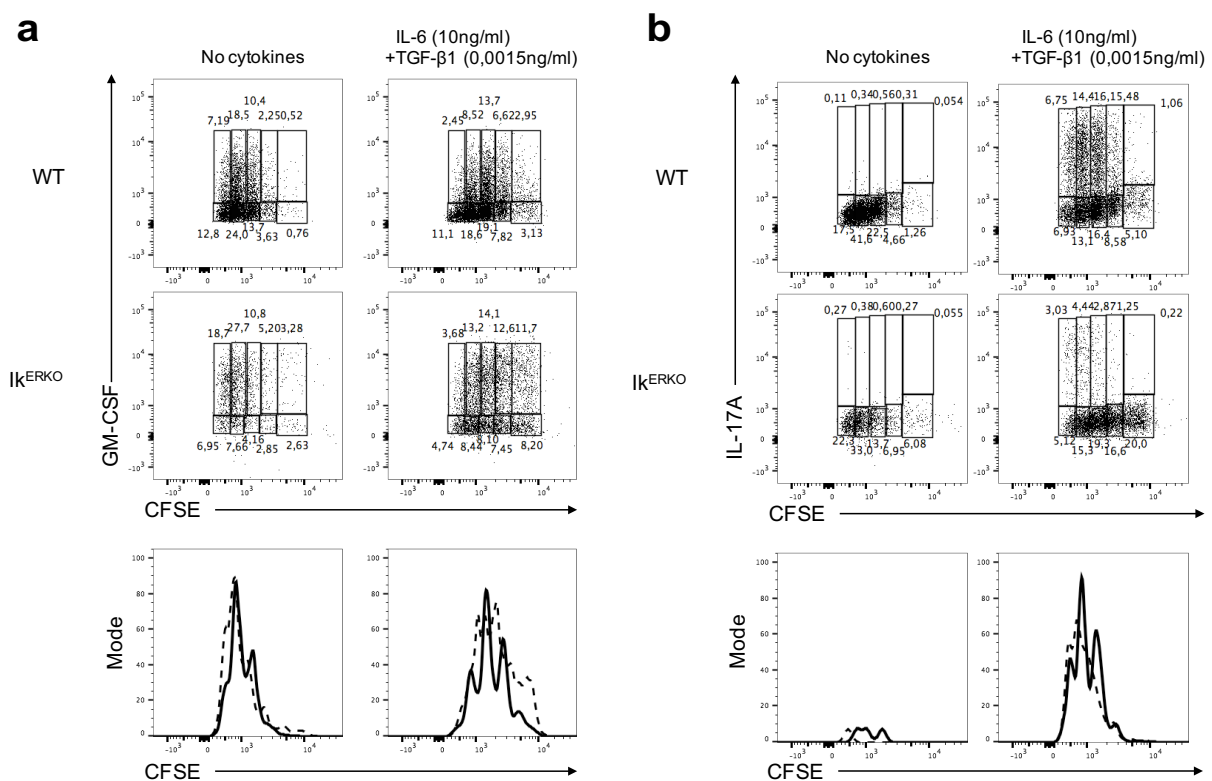


**Figure 44: L'expression de GM-CSF ne dépend pas du sérum.** Les cellules TCD4<sup>+</sup> naïves triées ont été placées en culture en présence d'anti-CD3, d'anti-CD28, d'IL-6 et de concentrations croissantes en TGF- $\beta$ 1 ou TGF- $\beta$ 3 pendant 3 jours. Les cellules ont ensuite été restimulées pendant 2h en présence de PMA/ionomycine/GolgiPlug avant d'être marquées avec des anticorps anti-IL-17A (a), anti-FoxP3 (b), anti-ROR $\gamma$ t (c) et anti-GM-CSF (d). Les résultats obtenus sont présentés sous forme de courbes représentant le pourcentage de cellules positives pour le marqueur étudié. Les souris proficientes pour Ikaros sont représentées en noir, alors que les souris déficientes sont représentées en blanc. n=1.

#### 4.5 La production de GM-CSF est plus importante dans les cellules à faible indice de prolifération

Les cellules GM-CSF n'exprimant pas l'IL-17A dans les cellules KO, nous avons voulu savoir si nous obtenions deux populations différentes au cours de la différenciation en LT<sub>H</sub>17, ou non. Pour cela, nous avons effectué un suivi de la prolifération lors d'une culture de 3 jours en condition régulatrice et en utilisant du CFSE, pour voir si les cellules KO obtenues étaient différentes. Après marquage intra-cellulaire et mesure par cytométrie de flux, j'ai observé que les cellules GM-CSF positives obtenues chez le KO semblent moins proliférer (Figure 45a)

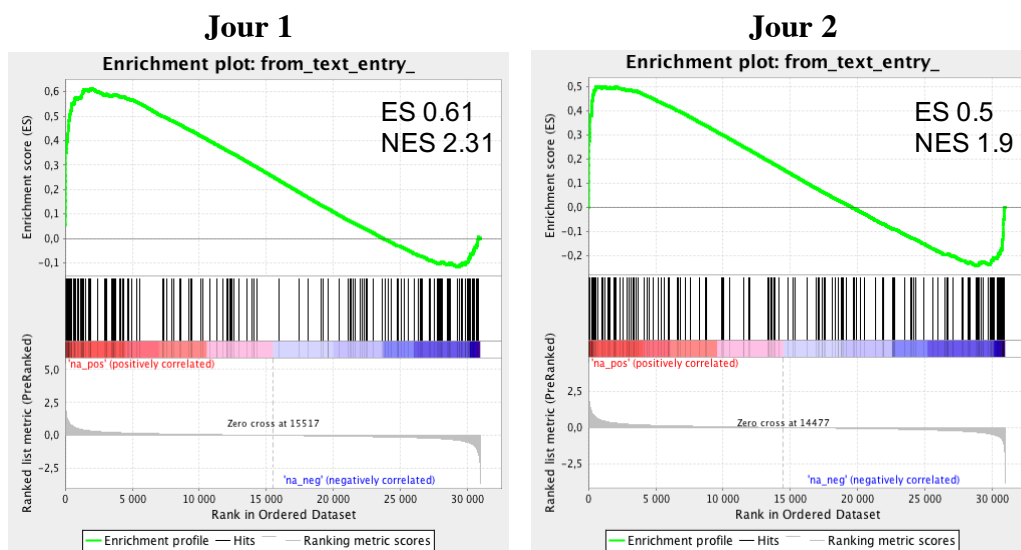
que les cellules WT en présence d'IL-6 et de TGF- $\beta$ 1. Il est à noter qu'en condition sans cytokines (activation par anti-CD3 et anti-CD28 uniquement), les cellules WT et KO prolifèrent avec le même potentiel. Les résultats obtenus pour l'IL-17A montrent que les cellules KO semblent proliférer un peu plus, comparé aux cellules WT (**Figure 45b**). Ainsi, nos résultats suggèrent qu'en présence de cytokines, les cellules KO semblent répondre différemment à la stimulation, comparé aux cellules WT, et suggèrerait que deux populations différentes soient présentes dans le puit. Néanmoins, les cellules WT et KO semblent répondre de la même manière à la stimulation par anti-CD3 et anti-CD28 en absence de cytokines.



**Figure 45: Les cellules exprimant GM-CSF prolifèrent moins que les cellules exprimant IL-17A.** Les cellules TCD4<sup>+</sup> naïves triées de souris Rosa-Cre Ik<sup>fl</sup> ont été mises en présence de CFSE pour les marquées et placées en culture en présence d'anti-CD3, d'anti-CD28, d'IL-6 et de TGF- $\beta$ 1 ou non pendant 3 jours. Les cellules ont été restimulées pendant 2h en présence de PMA/ionomycine/GolgiPlug avant d'être marquées pour IL-17A, et GM-CSF avec un anticorps spécifique. Les résultats obtenus pour GM-CSF (**a**) et pour IL-17A (**b**) sont présentés. Chaque cadran représente un pic de CFSE avec le pourcentage de cellules représenté au-dessus. Les histogrammes représentent les résultats obtenus pour les cellules GM-CSF positives (**a**) ou IL-17A positives (**b**) dans chaque condition. Les cellules WT sont représentées en trait plein, alors que les cellules KO sont représentées en trait discontinu. n=1 expérience.

## 5. Les cellules KO sont-elles des cellules T<sub>H</sub>GM-CSF ou des cellules T<sub>H</sub>17 pathogéniques ?

Les résultats publiés par *Sheng et al.* en 2014 montrent qu'en présence d'IL-7, la phosphorylation de STAT5 permet l'expression de GM-CSF spécifiquement dans des cellules WT. De plus, ces cellules expriment également IL-3, dont le gène est dans le même locus que celui codant pour GM-CSF (*Sheng et al.*, 2014). Nous avons effectué une analyse par GSEA pour comparer la liste de gènes publiés par *Sheng et al.* avec celle que nous avons obtenu lors de notre expérience de transcriptome à jour 1 et à jour 2, afin de voir si la signature décrite pouvait se retrouver dans les cellules KO (**Figure 46**).



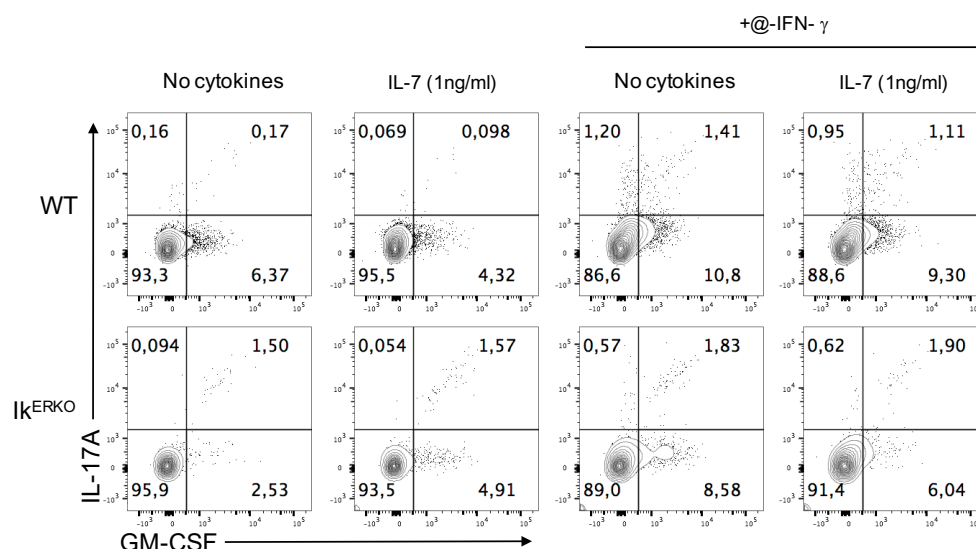
**Figure 46:** Les cellules déficientes en Ikaros expriment la signature des lymphocytes T<sub>H</sub>GM-CSF. Analyse par GSEA des gènes exprimés par les LT<sub>H</sub>GM-CSF et des gènes (provenant du ratio KO/WT en log2) utilisés lors de l'analyse du transcriptome à jour 1 (panneau de gauche) et à jour 2 (panneau de droite).

Les résultats de l'analyse par GSEA montrent un enrichissement des gènes de la signature décrite par *Sheng et al.* dans les cellules KO à jour 1, mais également à jour 2. Ainsi, ces résultats suggèrent qu'en condition de culture régulatrice, les cellules KO adoptent un phénotype différent correspondant aux cellules T<sub>H</sub>GM-CSF.

De ce fait, nous nous sommes placés dans des conditions de culture décrites par *Sheng et al.* en présence d'IL-7 pendant 3 jours, afin d'étudier l'expression de GM-CSF dans les cellules KO (*Sheng et al.*, 2014). Pour effectuer la différenciation, nous avons trié des LTCD4-naïfs que nous avons mis en culture pendant 3 jours en présence d'anti-CD3, d'anti-CD28, d'IL-7, et en présence ou non d'anti-IFN- $\gamma$ . Nous avons ensuite mesuré l'expression de GM-CSF et d'IL-17A par cytométrie de flux après marquage intra-cellulaire. Nous n'avons pas vu de cellules exprimant l'IL-17A dans ces conditions de culture, ce qui était attendu, puisque nous



ne sommes pas dans des conditions de culture permettant une différenciation en cette sous-population. Cependant, nous n'avons obtenu que 10% maximum de cellules exprimant GM-CSF (**Figure 47**), comparé au 40% obtenus dans l'étude de *Sheng et al.* Nous remarquons que dans nos conditions de culture, nous n'obtenons pas de différence dans l'expression de GM-CSF entre les cellules proficientes et déficientes en Ikaros. Les résultats que nous avons obtenus ne nous permettent pas de conclure sur le phénotype des cellules KO obtenues, et si celles-ci correspondent à des cellules T<sub>H</sub>GM-CSF ou des cellules T<sub>H</sub>17 pathogéniques.

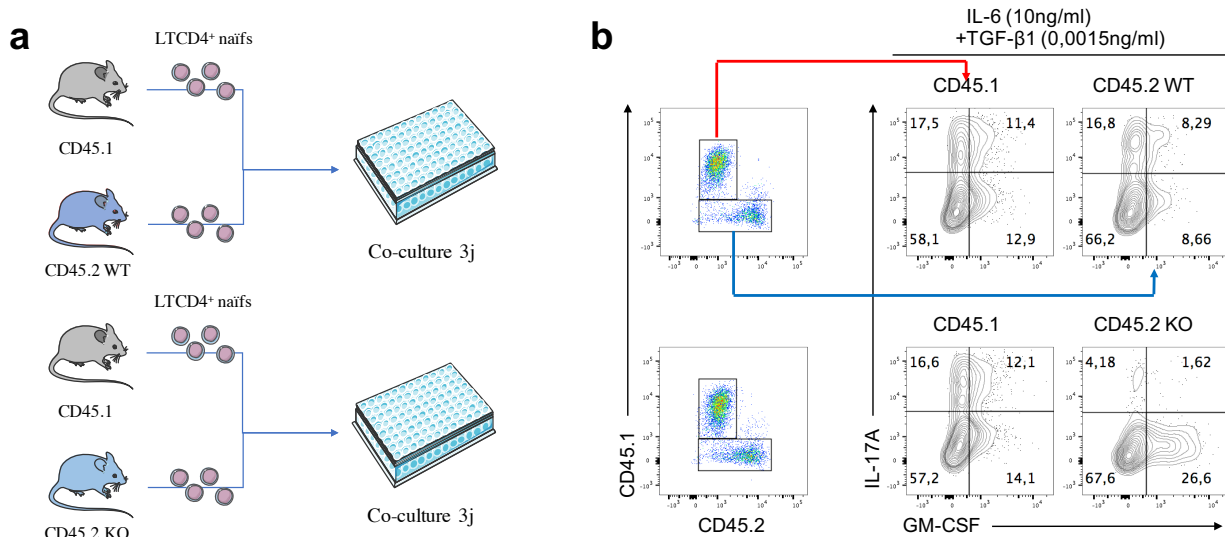


**Figure 47: Les cellules déficientes en Ikaros ne semblent pas être des lymphocytes T<sub>H</sub>GM-CSF.** Les cellules TCD4<sup>+</sup> naïves triées ont été placées en culture en présence d'anti-CD3, d'anti-CD28, d'IL-7 et d'anti-IFN- $\gamma$  ou non pendant 3 jours. Les cellules ont été restimulées pendant 2h en présence de PMA/ionomycine/GolgiPlug avant d'être marquées pour IL-17A, et GM-CSF avec un anticorps spécifique. Le pourcentage de cellules dans chaque cadran est représenté. n=1 expérience.

## 6. Ikaros régule la différenciation T<sub>H</sub>17 de manière intrinsèque

Les résultats obtenus précédemment suggèrent que les cellules déficientes en Ikaros se différencient en cellules T<sub>H</sub>17 pathogéniques en condition de culture régulatrice. Nous avons donc tenté de savoir si ces cellules sécrétaient un facteur pouvant influencer leur devenir comme l'IL-23. Ma première hypothèse s'est tournée vers un facteur extrinsèque, car l'analyse du transcriptome a révélé que les cellules déficientes en Ikaros expriment l'*Il23a* codant pour une partie de l'IL-23. Cette cytokine n'est normalement pas sécrétée par les LT, et sa présence pourrait expliquer pourquoi les cellules déficientes en Ikaros adoptent directement un phénotype pathogénique. Pour savoir si ce facteur est un facteur extrinsèque, ou plutôt intrinsèque aux cellules, j'ai effectué des co-cultures en mettant en présence des cellules WT et des cellules KO. Pour déterminer quelles cellules expriment GM-CSF, j'ai utilisé des cellules

WT exprimant le marqueur CD45.1, et des cellules WT ou KO exprimant le marqueur CD45.2 dans mes cultures en condition régulatrice. Après 3 jours de culture, nous n'avons pas observé une expression de GM-CSF plus forte dans les cellules WT en présence de cellules KO, comparé aux cellules WT cultivées en absence de cellules KO (**Figure 48**).



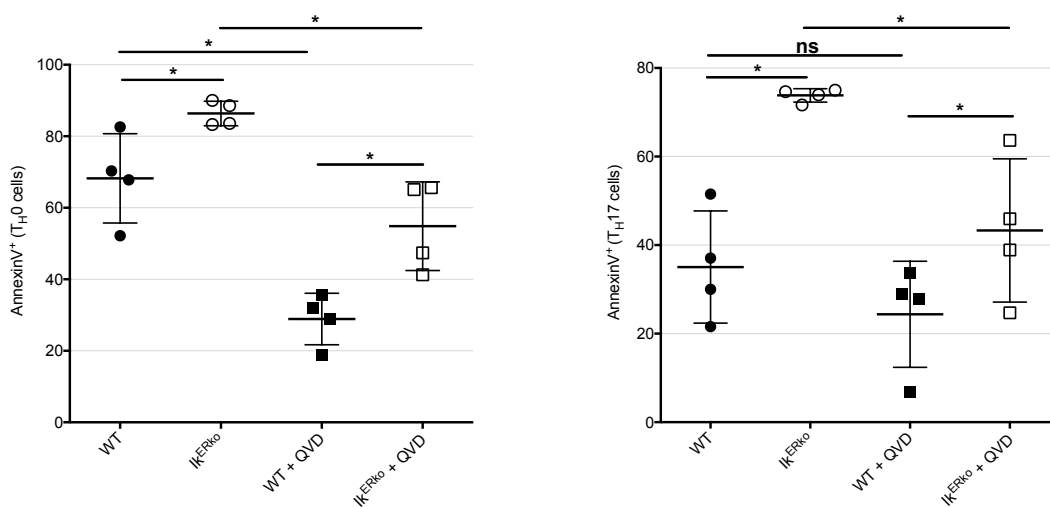
**Figure 48: Le phénotype des cellules  $I\kappa\text{ko}$  dépend d'un facteur intrinsèque.** Les cellules TCD4<sup>+</sup> naïves provenant de souris exprimant le marqueur CD45.1 ou CD45.2 (provenant de la lignée Rosa-Cre  $I\kappa$ ) ont été triées, puis placées en culture en présence d'anti-CD3, d'anti-CD28, d'IL-6 et de TGF-β1 ou non pendant 3 jours. Les cellules ont ensuite été restimulées pendant 2h en présence de PMA/ionomycine/GolgiPlug (**a**) Schéma des conditions de co-culture utilisées entre les souris exprimant le marqueur CD45.1 et CD45.2. (**b**) Après culture et restimulation, les cellules ont été marquées pour IL-17A et GM-CSF avec un anticorps spécifique. Les marqueurs des cellules mises en culture ainsi que les conditions de culture sont présentées en-haut de la figure. Le pourcentage de cellules est représenté dans chaque cadran. Un nombre équivalent de cellules provenant des souris exprimant le marqueur CD45.1 et des souris possédant le marqueur CD45.2 a été placé en culture. Représentative de n=2 expériences indépendantes.

De plus, les cellules KO cultivées en présence de cellules WT ne sont pas influencées par ces dernières pour adopter un phénotype régulateur au cours de la différenciation, puisqu'elles expriment toujours GM-CSF. Ainsi, nos résultats suggèrent que le facteur influençant la différenciation des cellules déficientes en Ikaros est un facteur intrinsèque, et que la présence des cellules WT n'influence pas le devenir des cellules KO en culture.

## 7. La délétion d'Ikaros augmente l'apoptose dans les cellules KO en culture $T_H17$

Lors de nos expériences de coculture, ainsi que lors de nos expériences de différenciation, nous avons remarqué que les cellules KO semblaient être affectées après 3 jours de culture, et qu'elles étaient présentes en moins grand nombre dans les puits, comparé aux cellules WT. Ainsi, nous avons voulu savoir si les cellules KO entraînent plus fortement en

apoptose au cours de nos cultures. Pour vérifier l'apoptose cellulaire, nous avons cultivé des LTCD4<sup>+</sup> naïfs WT et KO en conditions de culture sans cytokines, ou avec IL-6+TGF-β1 pendant 3 jours en présence ou en absence de Q-VD Oph bloquant l'activité des caspases 1, 3, 8 et 9. Nous avons ensuite mesuré l'apoptose par un marquage Annexin V/iodure de propidium (**Figure 49**). Nous avons vu qu'en absence de Q-VD, les cellules KO entrent plus fortement en apoptose que les cellules WT en conditions sans cytokines, ainsi qu'avec IL-6+TGF-β1. Cependant, en présence de Q-VD, nous arrivons à diminuer le pourcentage de cellules apoptotiques dans les deux conditions. Ainsi, nos résultats suggèrent qu'Ikaros est un facteur important pour la survie des cellules.



**Figure 49: Les cellules déficientes en Ikaros entrent plus fortement en apoptose.** Résultats compilés de 4 expériences de culture cellulaire en condition anti-CD3 et anti-CD28 (Th0) ± Q-VD, ou anti-CD3, anti-CD28, IL-6 et TGF-β1 (Th17) ± Q-VD (20nM). Les cellules TCD4<sup>+</sup> naïves triées ont été placées en culture pendant 3j, puis marquées avec de l'annexinV permettant de discriminer les cellules en apoptose de celles vivantes. n=4 expériences indépendantes. p-value ≤ 0.05 \*, ≤ 0.01 \*\*, ≤ 0.001 \*\*\* et ≤ 0.0001 \*\*\*\*. NS : non significatif.

## 8. Ikaros régule de manière indirecte les gènes de la signature pathogénique

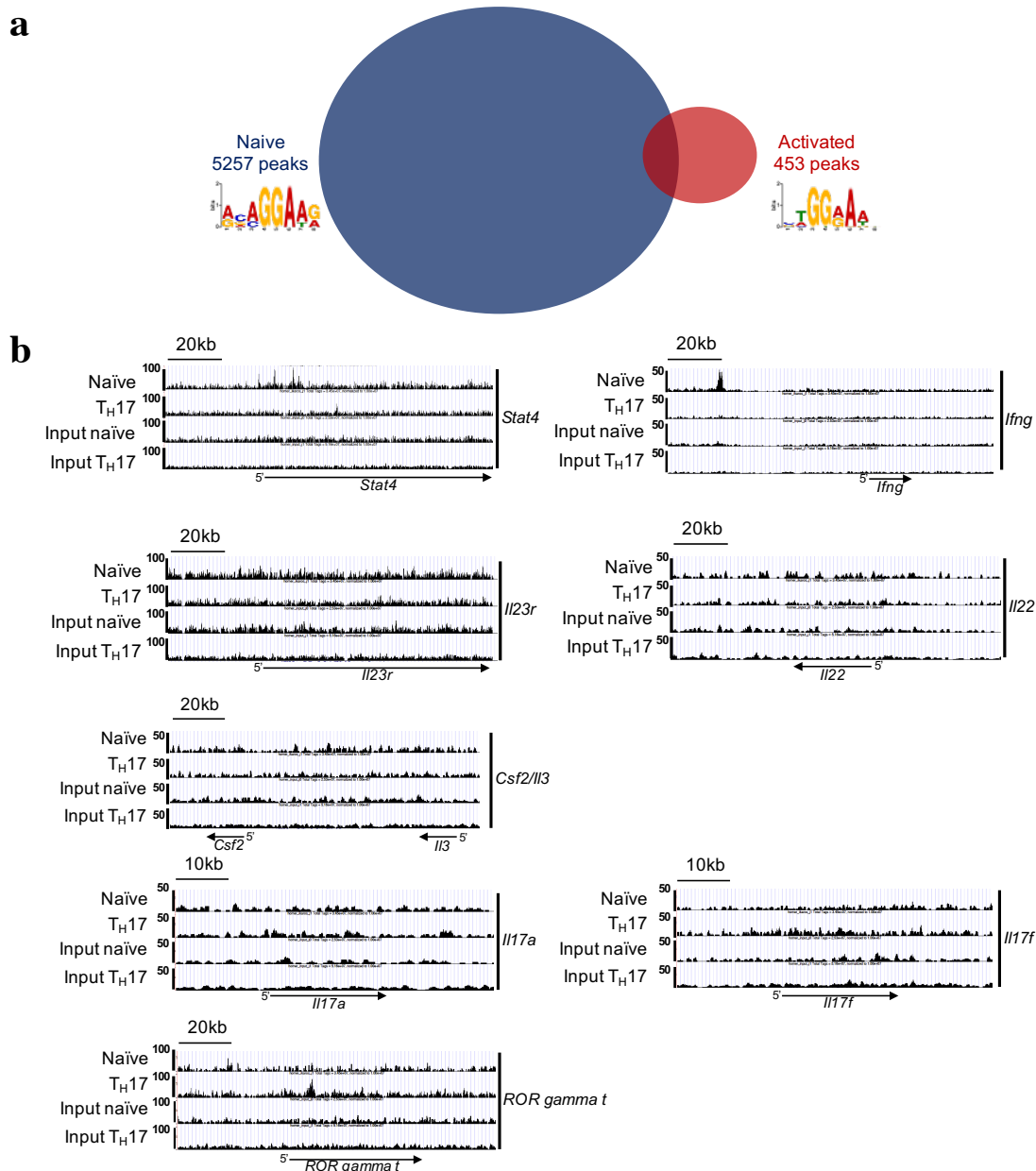
Thomas *et al.* ont montré en 2010 que Ikaros se fixe sur le promoteur du gène *Ifng* afin d'inhiber sa transcription au cours de la différenciation en LT<sub>H2</sub>. Nous avons voulu savoir si cela était également le cas pour les gènes de la signature pathogénique. Pour cela, j'ai utilisé des souris WT afin d'effectuer une expérience de ChIP-sequencing sur des cellules TCD4<sup>+</sup> naïves triées, et sur des cellules après 24h de culture en condition de différenciation T<sub>H17</sub> régulatrice. Les données brutes ont été analysées par la plateforme de séquençage et les données transférées sur UCSC Genome browser.

Nous avons tout d'abord noté une dynamique de fixation d'Ikaros au cours de la différenciation (**Figure 50a**). En effet, le diagramme de Venn représentant le nombre de pics obtenus pour chaque condition indique que 5000 pics sont présents dans les cellules TCD4<sup>+</sup> naïves comparé à 500 pics après 24h de culture. Cependant, pour chaque condition, la séquence d'ADN la plus fortement enrichie au sein des pics représentés correspond à la séquence consensus fixée par Ikaros.

De plus, nous avons également observé que Ikaros régule de manière indirecte la plupart des gènes de la signature pathogénique. En effet, mis à part les gènes *Ifng* et *Stat4*, tous les autres gènes ne sont pas fixés directement par Ikaros, comme *Csf2*, *Il3* ou encore *Il23r* (**Figure 50b**). Pour *ROR gamma t*, il semble que Ikaros fixe son promoteur après 24h de culture comparé aux cellules TCD4<sup>+</sup> naïves qui ne présentent pas de pic au niveau du promoteur de ce gène. Pour *Il17a* ainsi que pour *Il17f*, il ne semble pas y avoir de fixation également au niveau du promoteur de ces gènes montrant également une régulation indirecte (**Figure 50b**). Ces résultats indiquent que, la régulation de la transcription médiée par Ikaros au cours de la différenciation est dynamique, due à la diminution du nombre de pics. De plus, Ikaros semble réguler de manière indirecte la plupart des gènes de la signature pathogénique, et des gènes impliqués au cours de la différenciation en LT<sub>H</sub>17.

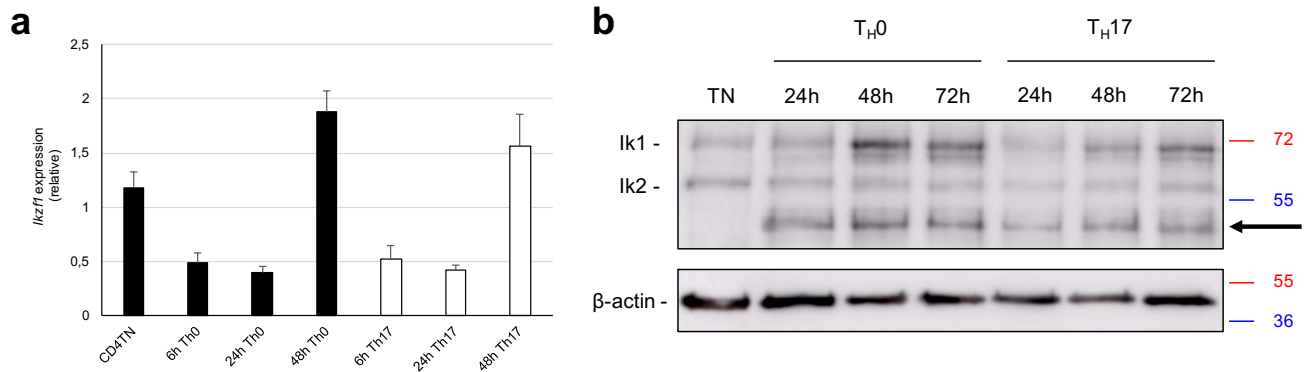
## **9. L'expression d'Ikaros est régulée au cours de la différenciation en LT<sub>H</sub>17**

Afin de mieux comprendre la régulation dynamique initiée par Ikaros, nous avons suivi son expression au cours de la différenciation en lymphocytes T<sub>H</sub>17, au niveau ARN par RT-qPCR (**Figure 51a**), et au niveau protéique par Western-Blot (**Figure 51b**). Au cours des premières heures, la transcription d'Ikaros diminue jusqu'à 24h, puis augmente à 48h indépendamment de la présence d'IL-6 et de TGF-β1 (**Figure 51a**). Au niveau protéique, nous n'observons pas de différence d'expression au cours des 24 premières heures. Cependant, l'expression d'Ikaros, à la fois dans les cellules T<sub>H</sub>0 et T<sub>H</sub>17, semble augmenter à 48h et 72h (**Figure 51b**), en accord avec les résultats obtenus pour l'ARN. De manière intéressante, nous remarquons qu'une bande supplémentaire de 50kDa apparaît à 24h, et que celle-ci persiste tout au long de la différenciation. Cette bande peut correspondre à une autre isoforme exprimée par les LT après leur activation. Les résultats obtenus suggèrent que la différenciation en LT<sub>H</sub>17 requiert une régulation de l'expression d'Ikaros au niveau ARN et protéine, et que



**Figure 50: Ikaros régule de manière indirecte la plupart des gènes de la signature pathogénique.** Les cellules TCD4<sup>+</sup> naïves triées ont été placées en culture ou non, en présence d’anti-CD3, d’anti-CD28, d’IL-6 et de TGF- $\beta$ 1 pendant 24h. La chromatine a été immuno-précipitée avec un anticorps dirigé contre Ikaros, puis séquencée. Le nombre de pics récupérés pour chaque condition est représenté par un diagramme de Venn (a), et la séquence la plus représentée est notée pour chaque condition. (b) Régions d’ADN représentant des gènes de la signature pathogénique, ainsi que des gènes impliqués dans la différenciation en cellules T<sub>H</sub>17. Les pics représentent une séquence fixée par Ikaros, et la normalisation est effectuée avec l’input de chaque condition. Le sens de transcription de chaque gène est représenté par la flèche noire sous la région, ainsi que l’échelle de taille qui est notée en-haut à gauche pour chaque région. n=1.

celles-ci ne sont pas dépendantes des cytokines présentes dans le milieu, mais plutôt du récepteur des cellules T. De plus, nos résultats suggèrent qu'une autre isoforme d'Ikaros apparaît au cours de la différenciation, correspondant peut-être à une isoforme dominante négative, et potentiellement importante pour empêcher la fixation des isoformes Ik1 et Ik2 à l'ADN, pouvant ainsi expliquer les résultats obtenus lors de notre expérience de ChIP-seq.



**Figure 51: L'expression d'Ikaros est modulée au cours de la différenciation  $T_H17$ .** Les cellules TCD4<sup>+</sup> naïves triées ont été placées en culture ou non, en présence d'anti-CD3, d'anti-CD28, d'IL-6 et de TGF- $\beta$ 1, ou sans cytokines, pendant 6h, 24h, 48h et 72h. **(a)** L'ARN a été extrait à 6h, 24h et 48h, et retrotranscrit en ADNc afin d'effectuer des PCR quantitatives pour l'expression du gène *Ikzf1*. **(b)** Un extrait total a été préparé à partir des cellules en culture et récupérées à 24h, 48h et 72h, afin de mesurer l'expression d'Ikaros au niveau protéine avec un anticorps spécifique par Western-Blot. La condition Th0 correspond à la condition de culture sans cytokines, mais avec une activation en présence d'anti-CD3 et d'anti-CD28. La flèche représente une isoforme potentielle d'Ikaros de 50kDa. Les résultats en (a) représentent la moyenne de 2 expériences et les barres d'erreur correspondent à la déviation standard entre les expériences. En (b), le poids moléculaires (kDa) est donné à droite de la figure. La normalisation a été effectuée avec la  $\beta$ -actine. n=2 expériences indépendantes. CD4TN : LTCD4<sup>+</sup> naïfs ; TN : LTCD4<sup>+</sup> naïfs.

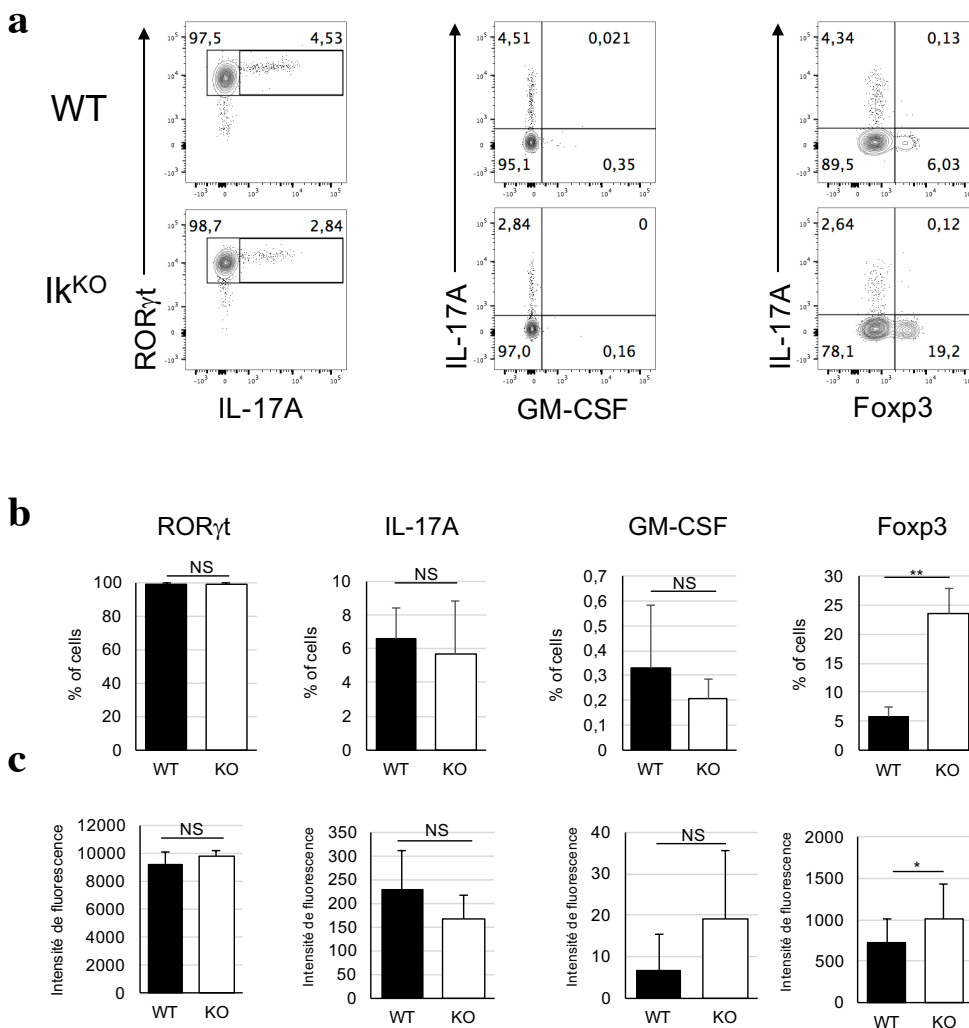
## 10. La délétion d'Ikaros n'a pas les mêmes effets *ex vivo* que *in vitro* sur les lymphocytes $T_H17$

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'impact de la délétion d'Ikaros *in vivo*. Les travaux de *Ivanov et al.* publiés en 2009 ont montré que la population  $T_H17$  est présente principalement au niveau de la lamina propria du petit intestin. De ce fait, nous avons extrait les cellules de la lamina propria de souris proficientes et déficientes en Ikaros, afin de suivre l'expression de ROR $\gamma$ t, IL-17A, FoxP3 et GM-CSF par marquage intra-cellulaire. Nous avons vu que les souris déficientes en Ikaros n'ont pas de défaut dans l'expression de ROR $\gamma$ t, car plus de 95% de cellules sont positives pour ce facteur dans les souris WT et KO. Au contraire de ce que nous avons observé *in vitro* pour l'IL-17A, les cellules KO expriment cette cytokine pour moitié, comparé aux cellules WT (**Figure 52**). Concernant l'expression de GM-CSF, nous n'avons pas vu de différence entre les cellules KO et les cellules WT au contraire de ce que

nous avons pu remarquer *in vitro* (Figure 52a). Par contre, nous avons observé qu'un pourcentage plus élevé de cellules expriment le facteur FoxP3 dans les cellules déficientes en Ikaros comparé aux cellules WT (Figure 52a).

De plus, nous avons compilé les résultats de plusieurs expériences, et analysé l'intensité de fluorescence pour chaque facteur. Nous observons que *ex vivo*, il n'y a pas de différence significative pour l'expression de ROR $\gamma$ t, d'IL-17A et de GM-CSF. Cependant, l'expression de FoxP3 entre les cellules WT et KO est significativement différente en faveur des cellules déficientes en Ikaros (Figure 52b-c).

Ainsi, les résultats obtenus *ex vivo* suggèrent qu'à l'état basal il n'y a pas de différence entre souris WT et KO pour les cellules T<sub>H</sub>17, mais qu'il existe une différence pour les cellules Treg.



**Figure 52: La délétion d'Ikaros n'augmente pas l'expression de GM-CSF *ex vivo*, mais augmente le pourcentage de cellules Treg.**

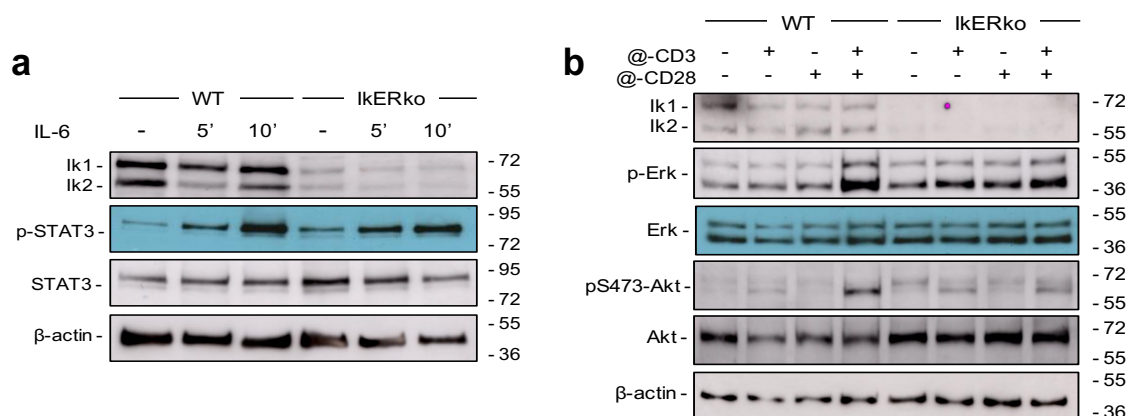
(a) Les cellules de la lamina propria ont été stimulées pendant 4h en présence de PMA/ionomycine/GolgiPlug avant d'être marquées pour mesurer l'expression de ROR $\gamma$ t, IL-17A, GM-CSF et FoxP3. Les analyses ont été effectuées sur les LTCD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> correspondant aux LT activés. Résultats compilés de 4 expériences d'extraction de cellules de la lamina propria chez des souris proficientes et déficientes en Ikaros. (b) Pourcentage de cellules CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> exprimant les différents facteurs représentés en-haut de la figure. (c) MFI mesurée pour chaque marqueur dans les CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> et positives pour le marqueur étudié. Les cellules WT sont représentées en noir, alors que les cellules déficientes sont représentées en blanc. n=4 expériences indépendantes. p-value  $\leq 0.05$  \*,  $\leq 0.01$  \*\*,  $\leq 0.001$  \*\*\* et  $\leq 0.0001$  \*\*\*\*. NS : non significatif.

## 11. La signalisation ne semble pas être affectée dans les cellules déficientes en Ikaros

Le défaut d'expression de ROR $\gamma$ t en culture par les cellules KO, ainsi que le fait que ces cellules ne répondent pas à la stimulation en culture nous a suggéré que ces cellules pourraient avoir un défaut dans la signalisation des différentes voies impliquées (TCR, IL-6 et TGF- $\beta$ ). Pour étudier la signalisation intra-cellulaire, nous avons triés des LTCD4<sup>+</sup> naïfs proficients ou déficients en Ikaros que nous avons stimulés avec de l'IL-6, ou avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28. Nous avons ensuite mesuré la phosphorylation et l'expression de différentes protéines pour chaque voie par Western-Blot avec des anticorps spécifiques.

La phosphorylation de STAT3, induite par l'IL-6, ne semble pas affectée dans les KO comparé aux WT, indiquant qu'il n'y a pas de défaut de signalisation via le récepteur de l'IL-6 (**Figure 53a**). Ainsi, nos résultats suggèrent que même si l'expression de ROR $\gamma$ t est affectée en absence d'Ikaros en culture, la voie de signalisation de cette cytokine ne semble pas affectée.

La phosphorylation de Erk et de Akt, induite par le TCR en combinaison avec le CD28, ne semble pas affectée non plus dans les KO, comparé aux WT, indiquant qu'il n'y a pas de défaut de signalisation via le TCR et le co-activateur (**Figure 53b**). Ces résultats suggèrent que malgré le fait que les cellules déficientes en Ikaros ne se différencient pas en culture, cela n'est pas dû à un défaut dans la signalisation du TCR+CD28.



**Figure 53: Les voies de signalisation de l'IL-6 et du récepteur des cellules T ne semblent pas affectées en absence d'Ikaros.** Les cellules TCD4<sup>+</sup> naïves triées de souris Rosa-Cre ont été placées en présence d'IL-6 ou en présence d'anti-CD3 et d'anti-CD28. **(a)** Western-Blot pour la voie de signalisation de l'IL-6. Les facteurs étudiés sont notés à gauche de la figure. Le temps d'incubation des cellules est représenté en-haut de la figure avec la provenance des cellules. Le poids moléculaire est noté à droite. **(b)** Western-Blot pour la voie de signalisation du TCR. La provenance des cellules stimulées pendant 5 minutes, ainsi que le mix d'anticorps utilisé pour la stimulation sont notés en-haut de la figure. Les facteurs étudiés sont représentés à gauche de la figure. Le poids moléculaire est noté à droite de la figure. La normalisation a été effectuée avec la  $\beta$ -actine. Représentative de n=2 expériences indépendantes.

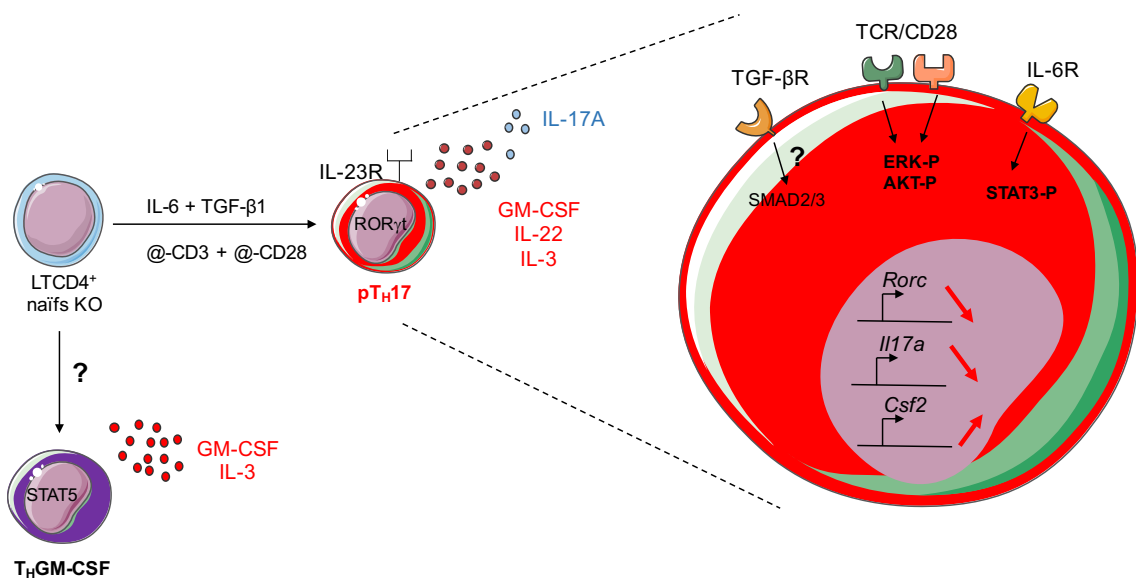
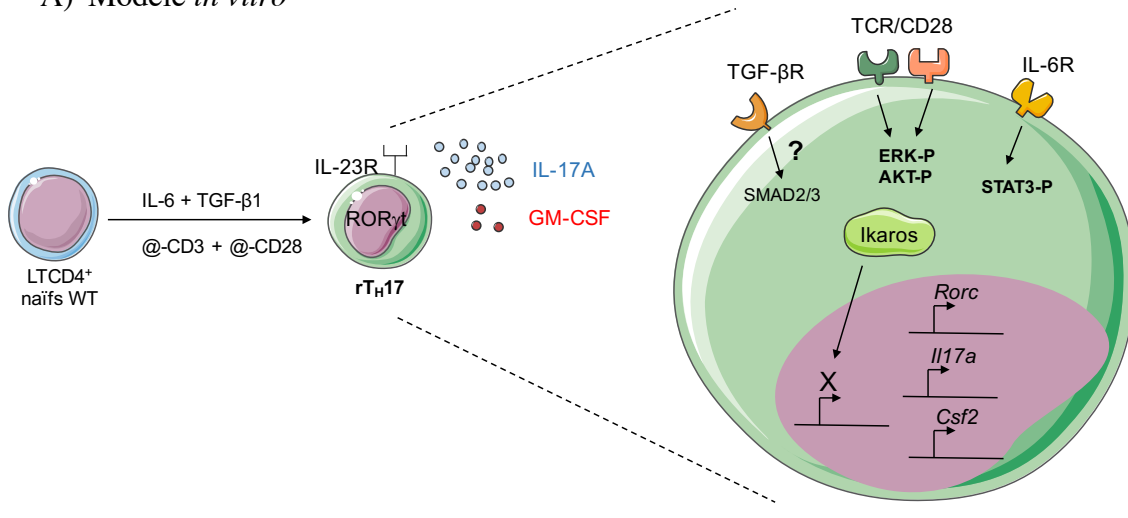


En résumé, les résultats obtenus suggèrent que *in vitro*, Ikaros est un facteur essentiel au cours de la différenciation en LT<sub>H</sub>17r. Son absence entraîne une dérégulation de l'expression des gènes importants dans la différenciation T<sub>H</sub>17 comme les FT *ROR gamma t*, ou encore *Batf* et *Ahr*, et une absence totale d'expression d'IL-17A.

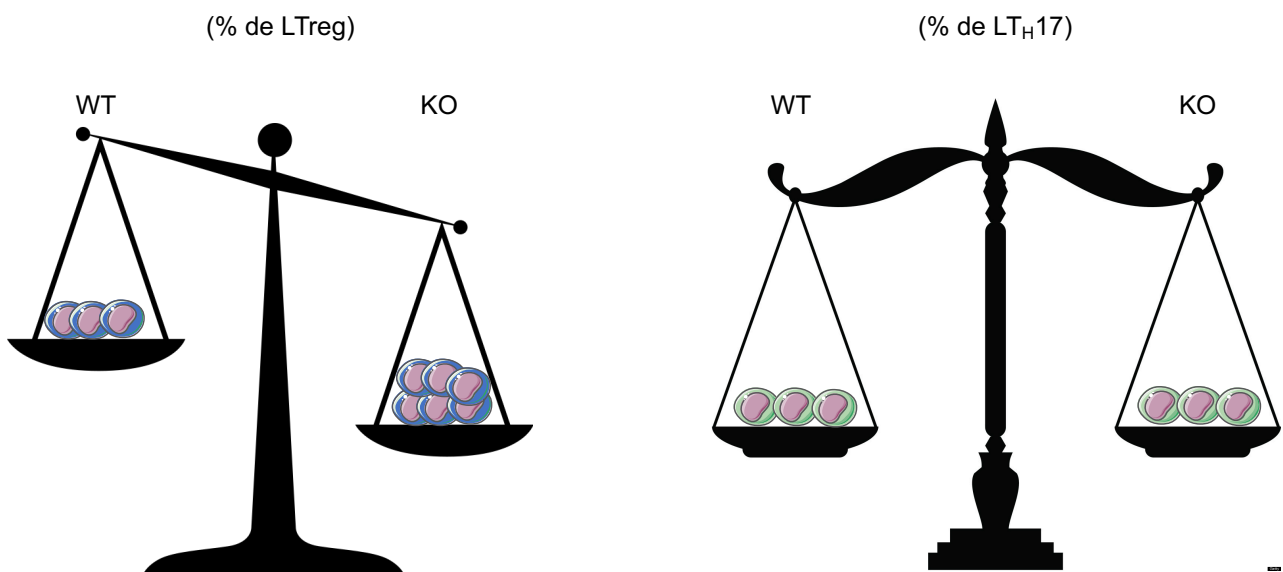
En parallèle de cette dérégulation, de nombreux gènes décrits comme faisant partie d'une signature pathogénique des T<sub>H</sub>17 sont fortement exprimés. Le plus important d'entre eux est *Csf2* codant pour GM-CSF, et impliqué dans plusieurs MAI. Néanmoins, la régulation de ces gènes par Ikaros semble être effectuée de manière indirecte, car l'expérience de ChIP-seq menée montre que les promoteurs de ces gènes ne sont pas fixés au cours de la différenciation (**Schéma bilan A**).

Les résultats obtenus *ex vivo* quant à eux suggèrent qu'à l'état basal, la différenciation en LT<sub>H</sub>17 n'est pas affectée dans les cellules KO. Le fait que les voies de signalisation induites par l'activation du TCR et la stimulation par l'IL-6 ne soient pas différentes entre WT et KO suggère que la voie du TGF- $\beta$  pourrait être suractivée, et ainsi induire le biais pris par les cellules TCD4<sup>+</sup> naïves déficientes en Ikaros (**Schéma bilan B**).

A) Modèle *in vitro*



B) Modèle *in vivo*



**Schéma bilan : Modèle schématique de différenciation des lymphocytes TCD4<sup>+</sup> chez les souris proficientes et déficientes en Ikaros.**

- A) Modèle *in vitro* :** Les LTCD4<sup>+</sup> naïfs sauvages (WT), en présence d'anti-CD3, d'anti-CD28, de TGF- $\beta$ 1 et d'IL-6, se différencient en LT<sub>H</sub>17 régulateurs exprimant le facteur de transcription ROR $\gamma$ t et l'IL-17A et peu de GM-CSF. Dans les mêmes conditions de différenciation en LT<sub>H</sub>17, les LTCD4<sup>+</sup> naïfs Ik<sup>ko</sup> expriment fortement le GM-CSF et peu, ou pas d'IL-17A. Les cellules KO expriment également moins fortement ROR $\gamma$ t que les cellules WT, alors que la signalisation de la voie IL-6 ne semble pas affectée. La signalisation du TCR/CD28 semble également non affectée dans les cellules KO. De manière intéressante, les cellules KO qui expriment GM-CSF, n'expriment pas IL-17A. De ce fait, il est possible qu'en condition de différenciation en LT<sub>H</sub>17, les cellules Ik<sup>ko</sup> représentent une sous-population récemment identifiée, LT<sub>H</sub>GM-CSF, qui expriment le GM-CSF, ainsi que l'IL-3 via l'activation de STAT5. Ikaros semble réguler l'expression des gènes pathogéniques, tel que *Csf2*, de manière indirecte via un facteur non défini actuellement, car la plupart des promoteurs des gènes pathogéniques ne sont pas fixés par Ikaros. Ce facteur semble intrinsèque aux cellules KO, car aucun effet n'est détecté sur le phénotype de cellules WT lorsqu'elles sont cultivées en présence de cellules KO.
- B) Modèle *in vivo* :** A l'état basal, les souris KO montrent un pourcentage plus important de cellules exprimant Foxp3 qui semblent être des lymphocytes nTreg. Cependant, aucune différence n'est observée entre les souris WT et KO dans le pourcentage de cellules exprimant ROR $\gamma$ t, IL-17A, ainsi que GM-CSF.

## **1. Ikaros est un régulateur de la différenciation en lymphocytes T<sub>H</sub>17**

### **1.1 Ikaros régule l'expression de ROR $\gamma$ t au cours de la différenciation en lymphocytes T<sub>H</sub>17**

Les résultats que nous avons obtenus au cours des cultures effectuées avec les cellules ILC87-Ik1-ER ont confirmé que Ikaros était un régulateur de l'expression de *Rorc*, codant pour ROR $\gamma$ t. En effet, la translocation d'Ikaros dans le noyau a augmenté de 6 fois l'expression du gène *Rorc*, ainsi que l'expression de la protéine ROR $\gamma$ t. Au cours de nos expériences de différenciation *in vitro* de LTCD4<sup>+</sup> naïfs en LT<sub>H</sub>17, nous n'avons pas vu, lors de l'analyse de notre transcriptome, une différence significative pour l'expression de *Rorc*. De manière consistante avec notre analyse menée sur les cellules ILC87-Ik1-ER, lors de nos différenciations en LT<sub>H</sub>17, les cellules déficientes en Ikaros exprimaient moins fortement ROR $\gamma$ t, comparé aux cellules WT. Cette différence peut s'expliquer par le fait que dans l'expérience de transcriptome, nous avons utilisé une condition de culture contenant 1ng de TGF- $\beta$ 1. En se référant aux courbes de différenciation T<sub>H</sub>17 présentées précédemment, cette concentration permet une expression similaire de la protéine entre cellules WT et KO, et de ce fait, une expérience de transcriptome avec une concentration plus faible en TGF- $\beta$ 1 aurait permis potentiellement de détecter une différence dans l'expression de *Rorc*. Les résultats publiés par Wong *et al.* en 2013 montrent qu'en l'absence d'Ikaros, l'expression de *Rorc* est diminuée au cours de la différenciation, allant dans le sens des résultats que nous avons obtenus au niveau protéine lors de nos tests *in vitro*. De plus, Wong *et al.* ont montré que Ikaros fixe le promoteur de *Rorc* au cours de la différenciation en LT<sub>H</sub>17 (Wong *et al.*, 2013). Nos résultats, obtenus au cours du ChIP-seq réalisé sur des cellules WT, montrent également une fixation d'Ikaros sur le promoteur de *Rorc* après 24h de culture. Nos données de ChIP-seq apportent l'information que Ikaros n'est pas fixé sur ce promoteur dans les LTCD4<sup>+</sup> naïfs. L'expression de ROR $\gamma$ t est médiée par la voie de signalisation de l'IL-6, et la phosphorylation de STAT3, cependant, nous n'avons pas remarqué de différence entre WT et KO, suggérant que la voie de signalisation de l'IL-6 n'est pas impactée par la délétion d'Ikaros (Yang *et al.*, 2007). De ce fait, nos résultats confirment ceux publiés par Wong *et al.* sur le fait que Ikaros semble important pour moduler l'état de la chromatine, permettant l'activation de la transcription de *Rorc* par STAT3 entre autres au cours de la différenciation en LT<sub>H</sub>17 (Wong *et al.*, 2013). Il est possible qu'au cours de la différenciation en LT<sub>H</sub>17, la délétion d'Ikaros module l'état de la chromatine

du gène *Ikzf3* codant pour Aiolos, et régulé par STAT3, aboutissant à une dérégulation de l'expression de l'IL-2 et inhibant la différenciation en LT<sub>H</sub>17 dans les cellules KO (Quintana *et al.*, 2012). Les résultats publiés par Read *et al.* dans les LT<sub>H</sub> vont dans ce sens, puisqu'ils montrent que STAT3 forme un complexe avec Aiolos au niveau du promoteur de *Bcl-6* (Read *et al.*, 2017). De plus, ils montrent que Ikaros est également présent au niveau du promoteur de ce gène. De ce fait, il est possible que dans les LT<sub>H</sub>17, Ikaros et Aiolos soient essentiels pour activer la transcription de *Rorc*, mais il reste à déterminer si ces facteurs se fixent sur l'ADN sous forme d'un hétérodimère ou sous forme d'homodimères.

Au contraire des résultats obtenus *in vitro*, nous n'avons pas pu observer de différence significative concernant l'expression de IL-17A *ex vivo* entre souris WT et KO. Ces résultats peuvent avoir plusieurs explications : 1) L'environnement en cytokine présent lors des expériences, et plus particulièrement TGF- $\beta$ 1, ne permet pas d'obtenir une expression d'IL-17A assez différente entre les cellules proficientes et déficientes en Ikaros. 2) Il est possible que les LT<sub>H</sub>17 circulants soient des nT<sub>H</sub>17 (natural T<sub>H</sub>17) provenant du thymus, et non des iT<sub>H</sub>17 différenciés dans les organes lymphoïdes secondaires (Marks *et al.*, 2009).

## **1.2 Ikaros régule l'expression d'autres facteurs impliqués dans la différenciation en lymphocytes T<sub>H</sub>17**

Au cours de notre analyse du transcriptome, nous avons également remarqué que les cellules déficientes en Ikaros expriment moins fortement d'autres facteurs impliqués au cours de la différenciation. Les gènes *Batf* et *Ahr* codant respectivement pour les facteurs BATF et AhR sont moins fortement exprimés, ce qui peut expliquer en partie le fait que les cellules KO ne se différencient pas en LT<sub>H</sub>17. Veldhoen *et al.* ont montré en 2008 que le facteur AHR est important pour l'expression d'IL-22, sécrétée par les LT<sub>H</sub>17 au cours de la différenciation, cependant, nos résultats suggèrent que d'autres facteurs sont impliqués dans l'expression d'IL-22, puisque cette cytokine est plus fortement exprimée dans les cellules KO. Ciofani *et al.* ont montré en 2012 que le facteur BATF permet d'augmenter l'accessibilité à la chromatine par d'autres facteurs comme STAT3, au niveau des promoteurs de *Il17a* ou *Il17f* entre autres. Wong *et al.* ont publié en 2013 qu'Ikaros pouvait se fixer sur le promoteur de *Ahr* en effectuant des études *in silico*. Cependant, les résultats que nous avons obtenu lors de notre étude de CHIP-seq n'ont pas permis de mettre en évidence une fixation d'Ikaros au niveau du promoteur de *Ahr*. Enfin, les résultats que nous avons obtenus pour l'IL-17A sont en accord avec ceux déjà publiés (Wong *et al.*, 2013). En effet, les cellules déficientes en Ikaros n'expriment pas IL-17A en culture dans nos conditions, et confirment ceux déjà publiés (même si dans les expériences de

différenciation *in vitro* menées par l'équipe de Mélissa Brown, une expression résiduelle reste présente). De plus, nous n'avons pas observé de fixation d'Ikaros sur le promoteur du gène *Il17a*, ce qu'a également observé l'équipe de Mélissa Brown, suggérant une régulation indirecte d'Ikaros. Cette régulation peut provenir de l'interaction directe entre Ikaros et ROR $\gamma$ t. En effet, des résultats obtenus dans le laboratoire suggèrent une fixation entre ces deux protéines, et de fait, Ikaros pourrait potentialiser la fixation de ROR $\gamma$ t sur les promoteurs des gènes cibles en remodelant la chromatine. Néanmoins, lorsque nous avons étudié l'expression d'IL-17A *ex vivo*, nous n'avons pas remarqué de différence d'expression entre les cellules WT et KO. Tout comme pour l'expression de ROR $\gamma$ t, cela peut être dû à l'environnement cytokinique non propice à une différenciation en LT $_{H17}$ . Afin de tester si une différence peut être visible, une infection par des bactéries filamenteuses segmentées serait à effectuer pour étudier par la suite les cellules T $_{H17}$  présentes au niveau de la lamina propria du petit intestin dans des souris WT et KO.

### 1.3 Ikaros est important pour les LT $_{H17}$ et les LTreg

Au cours des cultures effectuées, nous avons étudiés la balance qui existe entre les LT $_{H17}$  et les LTreg, comme ces 2 sous-populations ont besoin de TGF- $\beta$ 1 à des concentrations différentes pour se différencier. Notre hypothèse était que la délétion d'Ikaros permettait d'obtenir plus de LTreg, aboutissant à une inhibition de la différenciation en LT $_{H17}$  dans nos cultures. Cependant, les marquages de FoxP3 que nous avons effectués ne nous ont pas permis de détecter une différenciation efficace en LTreg des cellules KO *in vitro* à de fortes concentrations en TGF- $\beta$ 1 comparé aux cellules WT. Ces résultats confirment ceux obtenus par l'équipe de Mélissa Brown (Wong *et al.*, 2013).

Les résultats que nous avons obtenu *ex vivo* diffèrent de ceux obtenus *in vitro*. En effet, les souris KO possèdent un pourcentage plus élevé de cellules Treg, comparé aux souris WT. Cette présence plus importante de LTreg peut expliquer pourquoi nous ne pouvons pas, ou peu, détecter les autres sous-populations de LT auxiliaires dans les souris KO. De plus, ces résultats contradictoires ont suggéré que les LTreg obtenus *ex vivo* étaient des cellules LTreg thymiques, et non des LTreg induits. Pour étudier cette hypothèse, nous avons utilisé le marqueur Neuropilin1, spécifique des LTreg thymiques (Yadav *et al.*, 2012), et nos résultats préliminaires indiquent un pourcentage de cellules exprimant Nrpl plus important dans les souris KO comparé aux WT, ce qui suggère que les LTreg sont d'origine thymique. Ainsi, la délétion

d'Ikaros semble affecter différemment la différenciation en LTreg, car il n'y a pas de LTreg induits, mais il y a plus de LTreg naturels dans les souris KO, comparé aux souris WT.

## **2. Ikaros régule les gènes pathogéniques au cours de la différenciation en lymphocytes T<sub>H</sub>17**

### **2.1 Ikaros régule l'expression de GM-CSF**

L'équipe de Vijay Kuchroo a publié en 2012 que les LT<sub>H</sub>17 peuvent se différencier en présence de TGF- $\beta$ 3 et d'IL-6 (Lee *et al.*, 2012). Ils ont ainsi mis en évidence que ces cellules expriment une signature dite « pathogénique ». Cette signature pathogénique met en avant l'expression du gène *Csf2* codant pour GM-CSF, et démontré comme étant impliqué dans de nombreuses maladies auto-immunes. Dans les cellules KO, nous avons obtenus une forte expression de GM-CSF, même en condition de différenciation en présence de TGF- $\beta$ 1 et d'IL-6, suggérant que ces cellules sont des LT<sub>H</sub>17 pathogéniques. De ce fait, il semble que Ikaros soit un inhibiteur de l'expression de GM-CSF, et, les résultats que nous avons obtenus lors de notre expérience de CHIP-seq montrent que cette inhibition est indirecte, car Ikaros ne se fixe pas sur le promoteur de *Csf2*. Il est possible que Ikaros inhibe un facteur dépendant de la voie IL-6 qui activerait l'expression de GM-CSF, car en absence d'Ikaros, l'ajout d'IL-6 seul permet une augmentation de l'expression de cette cytokine dans les cellules KO, comparé aux cellules WT. ROR $\gamma$ t, facteur régulé par la voie IL-6 et décrit dans l'étude de Codarri *et al.* publiée en 2011, comme régulant l'expression de GM-CSF pourrait être la cible d'Ikaros dans notre système. De plus, le fait que toutes les cellules exprimant GM-CSF, soient également positives pour ROR $\gamma$ t a renforcé cette hypothèse. Cependant, les résultats que nous avons obtenus ne sont pas en adéquation avec cette hypothèse, car nous avons remarqué une expression moins forte de ROR $\gamma$ t dans les cellules KO, alors que celle de GM-CSF est beaucoup plus élevée, comparé aux cellules WT. Une autre possibilité serait une régulation de l'expression de GM-CSF indépendante de la voie IL-6, et de ROR $\gamma$ t. El-Behi *et al.* ont proposé également en 2011 que la régulation soit dépendante de la voie de signalisation de l'IL-23. Cette dernière est normalement sécrétée par les cellules dendritiques activées, permettant l'activation de l'IL-23R exprimé par les LT et aboutissant à l'expression de GM-CSF. L'équipe de Vijay Kuchroo a montré en 2012 que la fixation de l'IL-23 à l'IL-23R permet en fait l'expression de TGF- $\beta$ 3, qui va de manière autocrine activer l'expression de GM-CSF (Lee *et al.*, 2012). Les résultats que nous avons obtenu lors de notre expérience de transcriptome ont montré 2 choses : 1) Le

récepteur de l'IL-23 est plus fortement exprimé dans les cellules KO comparé aux cellules WT permettant une réponse plus importante à cette cytokine. 2) Les cellules KO semblent exprimer l'IL-23 (Mesure protéique non effectuée), car le gène codant pour l'*Il23a* est fortement exprimé dans les cellules KO comparé aux cellules WT (résultat non décrit), permettant ainsi une activation autocrine des cellules KO et un biais vers la signature pathogénique. Ce deuxième point a été testé lors de nos co-cultures, et nous n'avons pas pu constater un effet des cellules KO sur les cellules WT, et inversement, suggérant un effet intrinsèque de la délétion d'Ikaros sur le phénotype observé dans les cellules KO. Cependant, les cellules KO meurent au cours de la différenciation et il serait intéressant de refaire ces expériences en y ajoutant l'inhibiteur de pan-caspases Q-VD Oph, afin de freiner l'apoptose.

*Sheng et al.* ont publié en 2014 des résultats présentant une nouvelle population exprimant spécifiquement GM-CSF après activation des LTCD4<sup>+</sup> naïfs en présence d'IL-7. Nous avons de ce fait émis l'hypothèse que les LT KO différenciés pouvaient être des cellules T<sub>H</sub>GM-CSF. Notre analyse par GSEA a conforté notre hypothèse, puisque les cellules KO semblent adopter un biais vers la signature des cellules T<sub>H</sub>GM-CSF. De plus, les résultats que nous avons obtenus en présence de CFSE ont renforcé cette hypothèse, puisque les cellules exprimant GM-CSF semblent proliférer moins que celles exprimant l'IL-17A. Néanmoins, nos tests de différenciation en LT<sub>H</sub>GM-CSF ne nous ont pas permis d'obtenir cette population. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'au cours de la différenciation en LT auxiliaires, l'expression du récepteur de l'IL-7 diminue dans les cellules proficientes en Ikaros, et que ce récepteur n'est plus exprimé dans les cellules déficientes en Ikaros (*Agnihotri et al.*, 2017). Cela peut aussi s'expliquer par les conditions de culture que nous avons utilisées, et qui n'ont pas fonctionné. Il est également possible que cette population n'exprimant que GM-CSF soit en fait une population T<sub>H</sub>1 exprimant GM-CSF (*Stienne et al.*, 2016). Cette population exprimant Foxo3, active l'expression du facteur Eomes permettant la production de GM-CSF. En accord avec ces résultats, nous avons observé une transcription plus élevée du gène *Eomes* dans les cellules KO comparé aux cellules WT. Cependant, des études complémentaires seraient nécessaires pour vérifier que l'expression de la protéine est aussi plus élevée dans les cellules KO. Néanmoins, les cultures que nous avons effectuées en présence d'anticorps bloquants, dont l'anti-IFN $\gamma$  n'ont pas permis d'obtenir plus de LT<sub>H</sub>17, et surtout, n'ont pas interféré sur le pourcentage de cellules exprimant GM-CSF. Des différenciations T<sub>H</sub>1 seraient cependant intéressantes à effectuer, puis un marquage de GM-CSF et de l'IFN- $\gamma$  permettrait de voir si cette population est plus présente dans les cellules KO comparé aux cellules WT.



## 2.2 Ikaros régule l'expression d'autres facteurs pathogéniques

En plus de GM-CSF, Ikaros régule la transcription d'un pool de gènes également pathogéniques. Parmi eux, l'*Il3* contenu dans le même locus que *Csf2* est également fortement exprimé dans les cellules KO. L'IL-3 a été décrit pour être impliquée dans la sclérose en plaques (Renner *et al.*, 2016). Les résultats que nous avons obtenus au cours de notre expérience de CHIP-seq ont montré que la transcription de ce gène est également régulée de manière indirecte. Tout comme pour GM-CSF, nous avons comparé l'expression de la protéine entre les cellules WT et KO. Pour cela, nous avons utilisé des souris reportrices pour l'expression d'IL-3 que nous avons croisées avec des souris déficientes ou non en Ikaros, et nous avons observé une expression plus importante d'IL-3 dans les cellules KO. L'augmentation de l'expression d'IL-3 corrèle avec l'augmentation de l'expression de GM-CSF, confirmant les résultats publiés par l'équipe de Vijay Kuchroo (Lee *et al.*, 2012). Néanmoins, même si *Csf2* et *Il3* sont contenus dans le même locus, la régulation effectuée par Ikaros est différente, car *Il3* est fortement transcrit après 24h de culture, alors que *Csf2* est fortement transcrit après 48h de culture. De ce fait, comprendre comment Ikaros régule ce locus permettrait potentiellement de l'utiliser comme cible de futurs traitements.

D'autres gènes sont également régulés par Ikaros comme *Stat4* ou *Ifng*. Nous nous sommes intéressés à ces gènes, car les travaux de Thomas *et al.* publiés en 2010 montrent que Ikaros régule l'expression de *Ifng* en se fixant directement sur son promoteur, et parce que *Stat4* est impliqué dans plusieurs maladies autoimmunes, comme la maladie de Crohn (Glas *et al.*, 2010), mais également parce qu'il a été montré comme régulant l'expression de GM-CSF dans les cellules T<sub>H</sub>17 au cours de l'EAE (McWilliams *et al.*, 2015). Les résultats que nous avons obtenus lors de notre étude par CHIP-seq confirment une liaison directe d'Ikaros sur le promoteur du gène *Ifng*. Cette liaison permet l'inhibition de la transcription de ce gène, car en absence d'Ikaros, la transcription est plus importante, mais également l'expression de la protéine (résultats non présentés). D'un autre côté, Ikaros régule de manière indirecte la transcription du gène *Stat4*, cependant, nous n'avons pas encore mesuré l'expression de la protéine, afin d'étudier si une différence peut être visible entre WT et KO. Il est intéressant d'étudier ces facteurs, car l'étude menée par l'équipe de Anne Dejean sur les LT<sub>H</sub>1 montre que ces cellules peuvent également sécréter du GM-CSF (Stienne *et al.*, 2016). Ainsi, nous avons étudié si les cellules exprimant IFN- $\gamma$  *ex vivo*, étaient également positives pour GM-CSF. Nous n'avons pas pu observer de cellules doubles positives, suggérant que les cellules exprimant GM-CSF ne sont pas des LT<sub>H</sub>1 pathogéniques.

Il serait également intéressant d'étudier l'impact de la délétion d'Ikaros sur le facteur T-bet, car il est impliqué lors de la différenciation en LT<sub>H</sub>1, mais également au cours de la différenciation en LT<sub>H</sub>17 pathogéniques (Grifka-Walk et al., 2017). Nous n'avons pas détecté une plus forte expression de ce FT *in vitro* au cours de notre expérience de transcriptome, mais il est possible que nos conditions de cultures n'étaient pas optimales pour détecter l'expression de T-bet. En effet, dans la littérature, l'expression de T-bet est reliée à la voie de signalisation médiée par l'IL-23 (Krausgruber et al., 2016, Grifka-Walk et al., 2017). Comme nous n'avons pas utilisé d'IL-23 au cours de nos différenciations, il est probable que nos résultats soient simplement la résultante de ce manque. Néanmoins, T-bet régule l'expression de GM-CSF, et il est possible qu'il agisse en parallèle de ROR $\gamma$ t. La question du rôle d'Ikaros dans la régulation de l'expression de GM-CSF par ROR $\gamma$ t et T-bet reste ouverte. Cependant, un marquage intracellulaire de T-bet pour commencer, puis une étude par cytométrie de flux permettrait de vérifier qu'en absence d'Ikaros, et en conditions régulatrices, ce facteur n'est pas dérégulé, et permettrait d'éliminer un potentiel effet de T-bet dans les cellules KO. Il serait également intéressant de réaliser des cultures en présence d'IL-23, afin d'étudier si l'expression de T-bet est augmentée dans ces conditions, et quel est le phénotype obtenu dans les cellules KO.

### **3. Ikaros est impliqué dans d'autres voies de régulation au cours de la différenciation des lymphocytes T<sub>H</sub>17**

#### **3.1 Ikaros semble impliqué dans la régulation de la voie du TGF- $\beta$**

Lors de son étude de l'induction des LT<sub>H</sub>17 pathogéniques, l'équipe de Vijay Kuchroo a montré que la différenciation médiée par TGF- $\beta$ 1 active la phosphorylation des protéines SMAD2 et SMAD3, alors que la différenciation médiée par TGF- $\beta$ 3 active la phosphorylation des protéines SMAD1 et SMAD5, permettant une régulation différentielle des gènes cibles au cours de la différenciation (Lee et al., 2012). Au cours des différenciations que nous avons effectués en présence de TGF- $\beta$ 1 ou de TGF- $\beta$ 3, nous n'avons pas pu observer de différence, même en présence d'un sérum de veau foetal différent, au contraire de ce qui a été publié (Lee et al., 2012). Il est possible qu'en absence d'Ikaros, la voie de signalisation du TGF- $\beta$  est affectée, car au cours de notre analyse du transcriptome, nous avons observé une surexpression des gènes de la voie du TGF- $\beta$  et de leurs récepteurs, et plus particulièrement de ceux appartenant à la voie des Bone Morphogenic Protein comme *Acvr1* ou *Bmpr2* activant la phosphorylation de SMAD 1 et de SMAD5. Nous avons également observé une augmentation

de l'expression de l'endoglin qui fait partie du récepteur du TGF- $\beta$ , pouvant aboutir à une phosphorylation des SMAD1 et SMAD5 en présence de TGF- $\beta$ 1 (Pardali *et al.*, 2010). Enfin, au cours de nos expériences *in vitro*, nous avons observé une apoptose plus importante dans les cellules KO, comparé aux cellules WT qui pourrait être due à la voie du TGF- $\beta$  et à sa sur-activation (Schuster and Krieglstein, 2002). Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure le fait que l'apoptose soit due à l'activation du récepteur Fas, et donc à la voie extrinsèque. En effet, au cours de l'analyse de notre expérience de transcriptome, nous avons observé que le gène *Fasl* codant pour la protéine FasL est plus fortement transcrit dans les cellules KO (4,5 fois plus de transcrit dans les cellules KO comparé aux cellules WT). L'interaction de FasL avec son récepteur Fas active l'apoptose dans les cellules via des protéines appelées des caspases. Nous avons également étudié la transcription des gènes impliqués dans la voie intrinsèque comme *Noxa*, *Puma*, *Bcl2*, *Bax* sans observé de différence significative entre les cellules WT et KO, et suggérant que cette voie n'est pas dérégulée en absence d'Ikaros.

### **3.2 Ikaros semble réguler son expression au cours de la différenciation en lymphocytes T<sub>H</sub>17 de manière TCR-dépendante**

Les résultats que nous avons obtenus suggèrent que l'expression d'Ikaros est régulée au cours de la différenciation en LT<sub>H</sub>17 par un mécanisme TCR dépendant. Le fait que la transcription d'*Ikzf1* diminue au cours des 24 premières heures de culture en absence, ou en présence de cytokines, montre que celle-ci est importante afin d'initier la différenciation en LT<sub>H</sub>17. Néanmoins, l'expression de la protéine ne semble pas diminuée au cours de l'activation des cellules T, et il apparaît également une isoforme supplémentaire. Il reste à déterminer si l'apparition de cette isoforme est essentielle à la différenciation en LT<sub>H</sub>17. Comme expliqué en introduction, Ikaros régule le seuil d'activation des LT. En effet, en absence d'Ikaros, le TCR requiert un signal moins important pour être activé, et les cellules répondent également mieux à l'IL-2 aboutissant à une prolifération plus importante (Avitahl *et al.*, 1999).

En conclusion, ma thèse a permis de mettre en évidence qu'Ikaros est un répresseur indirect de la transcription des gènes pathogéniques dans les LTCD4<sup>+</sup> naïfs, cultivés pour induire une polarisation vers le phénotype T<sub>H</sub>17 régulateur. De plus, en absence d'Ikaros et en condition de culture régulatrice, l'ajout d'IL-6 seul augmente l'expression de GM-CSF, facteur clé dans l'induction des MAI, suggérant un rôle d'Ikaros dans la régulation de cette voie. Ainsi, Ikaros est nécessaire pour polariser correctement les LTCD4<sup>+</sup> naïfs vers le phénotype T<sub>H</sub>17.

- Acosta-Rodriguez, E.V.**, Napolitani, G., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2007a). Interleukins 1 $\beta$  and 6 but not transforming growth factor- $\beta$  are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* 8, 942-949.
- Acosta-Rodriguez, E.V.**, Rivino, L., Geginat, J., Jarrossay, D., Gattorno, M., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., and Napolitani, G. (2007b). Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* 8, 639-646.
- Aggarwal, S.**, Ghilardi, N., Xie, M.H., de Sauvage, F.J., and Gurney, A.L. (2003). Interleukin-23 Promotes a Distinct CD4 T Cell Activation State Characterized by the Production of Interleukin-17. *J Biol Chem* 278, 1910-1914.
- Agnihotri, P.**, Robertson, N.M., Umetsu, S.E., Arakcheeva, K., and Winandy, S. (2017). Lack of Ikaros cripples expression of Foxo1 and its targets in naive T cells. *Immunology* 152, 494-506.
- Agoston, D.V.**, Szemes, M., Dobi, A., Palkovits, M., Georgopoulos, K., Gyorgy, A., and Ring, M.A. (2007). Ikaros is expressed in developing striatal neurons and involved in enkephalinergic differentiation: Ikaros in striatal development. *J Neurochem* 102, 1805-1816.
- 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. *Nat Immunol* 4, 168-174.
- Allman, D.**, Dalod, M., Asselin-Paturel, C., Delale, T., Robbins, S.H., Trinchieri, G., Biron, C.A., Kastner, P., and Chan, S. (2006). Ikaros is required for plasmacytoid dendritic cell differentiation. *Blood* 108, 4025-4034.
- Annunziato, F.**, Cosmi, L., Santarlasci, V., Maggi, L., Liotta, F., Mazzinghi, B., Parente, E., Fili, L., Ferri, S., Frosali, F., Giudici, F., Romagnani, P., Parronchi, P., Tonelli, F., Maggi, E., and Romagnani, S. (2007). Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* 204, 1849-1861.
- Apostolov, A.**, Litim-Mecheri, I., Oravecz, A., Goepf, M., Kirstetter, P., Marchal, P., Ittel, A., Mauvieux, L., Chan, S., and Kastner, P. (2016). Sumoylation Inhibits the Growth Suppressive Properties of Ikaros. *PLoS One* 11, e0157767.
- Arican, O.**, Aral, M., Sasmaz, S., and Ciragil, P. (2005). Serum Levels of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, and IL-18 in Patients With Active Psoriasis and Correlation With Disease Severity. *Mediators Inflamm* 2005, 273-279.
- Avitahl, N.**, Winandy, S., Friedrich, C., Jones, B., Ge, Y., and Georgopoulos, K. (1999). Ikaros sets thresholds for T cell activation and regulates chromosome propagation. *Immunity* 10, 333-343.
- Badea, T.C.**, Wang, Y., and Nathans, J. (2003). A noninvasive genetic/pharmacologic strategy for visualizing cell morphology and clonal relationships in the mouse. *J Neurosci* 23, 2314-2322.
- Bain, G.**, Engel, I., Robanus Maandag, E.C., te Riele, H.P., Voland, J.R., Sharp, L.L., Chun, J., Huey, B., Pinkel, D., and Murre, C. (1997). E2A deficiency leads to abnormalities in alphabeta T-cell development and to rapid development of T-cell lymphomas. *Mol Cell Biol* 17, 4782-4791.
- Barrett, J.C.**, Hansoul, S., Nicolae, D.L., Cho, J.H., Duerr, R.H., Rioux, J.D., Brant, S.R., Silverberg, M.S., Taylor, K.D., Barmada, M.M., *et al.* (2008). Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet* 40, 955-962.
- Benlagha, K.**, Kyin, T., Beavis, A., Teyton, L., and Bendelac, A. (2002). A thymic precursor to the NK T cell lineage. *Science* 296, 553-555.

- Benlagha, K.**, Wei, D.G., Veiga, J., Teyton, L., and Bendelac, A. (2005). Characterization of the early stages of thymic NKT cell development. *J Exp Med* 202, 485-492.
- Bentham, J.**, Morris, D.L., Graham, D.S.C., Pinder, C.L., Tomblinson, P., Behrens, T.W., Martín, J., Fairfax, B.P., Knight, J.C., Chen, L., Replogle, J., Syvänen, A.C., Rönnblom, L., Graham, R.R., Wither, J.E., Rioux, J.D., Alarcón-Riquelme, M.E., and Vyse, T.J. (2015). Genetic association analyses implicate aberrant regulation of innate and adaptive immunity genes in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 47, 1457-1464.
- Bettelli, E.**, Sullivan, B., Szabo, S.J., Sobel, R.A., Glimcher, L.H., and Kuchroo, V.K. (2004). Loss of T-bet, But Not STAT1, Prevents the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Exp Med* 200, 79-87.
- Bettelli, E.**, Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., and Kuchroo, V.K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441, 235-238.
- Boggs, S.S.**, Trevisan, M., Patrene, K., and Georgopoulos, K. (1998). Lack of natural killer cell precursors in fetal liver of Ikaros knockout mutant mice. *Nat Immun* 16, 137-145.
- Boschetti, G.**, Nancey, S., Kanjarawi, R., Almeras, T., Ruel, K., Kaiserlian, D., and Flourie, B. (2012). Réponses immunitaires au cours des MICI : implication de l'axe IL-23/Th17. *Hépatogastro* 19, 446-454.
- Bottardi, S.**, Mavoungou, L., Bourgoïn, V., Mashtalir, N., Affar el, B., and Milot, E. (2013). Direct Protein Interactions Are Responsible for Ikaros-GATA and Ikaros-Cdk9 Cooperativeness in Hematopoietic Cells. *Mol Cell Biol* 33, 3064-3076.
- Broere, F.**, Apasov, S.G., Sitkovsky, M.V., and van Eden, W. (2011). A2 T cell subsets and T cell-mediated immunity. In *Principles of Immunopharmacology*, F.P. Nijkamp, and M.J. Parnham, eds. (Birkhäuser Basel), pp. 15-27.
- Brown, K.E.**, Guest, S.S., Smale, S.T., Hahm, K., Merkenschlager, M., and Fisher, A.G. (1997). Association of transcriptionally silent genes with Ikaros complexes at centromeric heterochromatin. *Cell* 91, 845-854.
- Brüstle, A.**, Heink, S., Huber, M., Rosenplänter, C., Stadelmann, C., Yu, P., Arpaia, E., Mak, T.W., Kamradt, T., and Lohoff, M. (2007). The development of inflammatory TH-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nat Immunol* 8, 958-966.
- Carbo, A.**, Hontecillas, R., Andrew, T., Eden, K., Mei, Y., Hoops, S., and Bassaganya-Riera, J. (2014). Computational modeling of heterogeneity and function of CD4+ T cells. *Front Cell Dev Biol* 2, 31.
- Caza, T.**, and Landas, S. (2015). Functional and Phenotypic Plasticity of CD4(+) T Cell Subsets. *Biomed Res Int* 521957.
- Cella, M.**, Fuchs, A., Vermi, W., Facchetti, F., Otero, K., Lennerz, J.K., Doherty, J.M., Mills, J.C., and Colonna, M. (2009). A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature* 457, 722-725.
- Chalmin, F.**, Mignot, G., Bruchard, M., Chevriaux, A., Végran, F., Hichami, A., Ladoire, S., Derangère, V., Vincent, J., Masson, D., Robson, S.C., Eberl, G., Pallandre, J.R., Borg, C., Ryffel, B., Apetoh, L., Rébé, C., and Ghiringhelli, F. (2012). Stat3 and Gfi-1 Transcription Factors Control Th17 Cell Immunosuppressive Activity via the Regulation of Ectonucleotidase Expression. *Immunity* 36, 362-373.

- Chen, Z.,** Laurence, A., and O'Shea, J.J. (2007). Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation. *Semin Immunol* *19*, 400-408.
- Christensen, J.R.,** Börnsen, L., Ratzer, R., Piehl, F., Khademi, M., Olsson, T., Sørensen, P.S., and Sellebjerg, F. (2013) Systemic Inflammation in Progressive Multiple Sclerosis Involves Follicular T-Helper, Th17- and Activated B-Cells and Correlates with Progression. *PLoS ONE* *8*, e57820.
- Ciofani, M.,** and Zuniga-Pflucker, J.C. (2010). Determining  $\gamma\delta$  versus  $\alpha\beta$  T cell development. *Nat Rev Immunol* *10*, 657-663.
- Ciofani, M.,** Madar, A., Galan, C., Sellars, M., Mace, K., Pauli, F., Aggarwal, A., Huang, W., Parkhurst, C.N., Muratet, M., Newberry, K.M., Meadows, S., Greenfield, A., Yang, Y., Jain, P., Kirigin, F.K., Birchmeier, C., Wagner, E.F., Murphy, K.M., Myers, R.M., Bonneau, R., and Littman, D.R. (2012). A Validated Regulatory Network for Th17 Cell Specification. *Cell* *151*, 289-303.
- Clambey, E.T.,** Collins, B., Young, M.H., Eberlein, J., David, A., Kappler, J.W., and Marrack, P. (2013). The Ikaros Transcription Factor Regulates Responsiveness to IL-12 and Expression of IL-2 Receptor Alpha in Mature, Activated CD8 T Cells. *PLoS One* *8*, e57435.
- Codarri, L.,** Gyölvézi, G., Tosevski, V., Hesske, L., Fontana, A., Magnenat, L., Suter, T., and Becher, B. (2011). ROR $\gamma$ t drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol* *12*, 560-567.
- Coffman, R.L.,** and Carty, J. (1986). A T cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by interferon-gamma. *J Immunol* *136*, 949-954.
- Coimbra, S.,** Oliveira, H., Reis, F., Belo, L., Rocha, S., Quintanilha, A., Figueiredo, A., Teixeira, F., Castro, E., Rocha-Pereira, P., and Santos-Silva, A. (2010). Interleukin (IL)-22, IL-17, IL-23, IL-8, vascular endothelial growth factor and tumour necrosis factor- $\alpha$  levels in patients with psoriasis before, during and after psoralen-ultraviolet A and narrowband ultraviolet B therapy: Psoriasis vulgaris cytokines and PUVA/NB-UVB therapy. *Br J Dermatol* *163*, 1282-1290.
- Coquet, J.M.,** Chakravarti, S., Kyparissoudis, K., McNab, F.W., Pitt, L.A., McKenzie, B.S., Berzins, S.P., Smyth, M.J., and Godfrey, D.I. (2008). Diverse cytokine production by NKT cell subsets and identification of an IL-17-producing CD4-NK1.1- NKT cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 11287-11292.
- Cosmi, L.,** Liotta, F., Maggi, E., Romagnani, S., and Annunziato, F. (2011). Th17 cells: new players in asthma pathogenesis: T lymphocytes and asthma phenotypes. *Allergy* *66*, 989-998.
- Crotty, S.** (2011). Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol* *29*, 621-663.
- Cua, D.J.,** Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C.A., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L., To, W., Kwan, S., Churakova, T., Zurawski, S., Wiekowski, M., Lira, S.A., Gorman, D., Kastelein, R.A., and Sedgwick, J.D. (2003). Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* *421*, 744-748.
- Dardalhon, V.,** Awasthi, A., Kwon, H., Galileos, G., Gao, W., Sobel, R.A., Mitsdoerffer, M., Strom, T.B., Elyaman, W., Ho, I.C., Khoury, S., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. (2008). IL-4 inhibits TGF- $\beta$ -induced Foxp3<sup>+</sup> T cells and, together with TGF- $\beta$ , generates IL-9<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> Foxp3<sup>-</sup> effector T cells. *Nat Immunol* *9*, 1347-1355.

- Deaglio, S.,** Dwyer, K.M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J.F., Enjyoji, K., Linden, J., Oukka, M., Kuchroo, V.K., Strom, T.B., and Robson, S.C. (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* *204*, 1257-1265.
- Desbarats, J.,** Wade, T., Wade, W.F., and Newell, M.K. (1999). Dichotomy between naïve and memory CD4(+) T cell responses to Fas engagement. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 8104-8109.
- Dovat, S.,** Song, C., Payne, K.J., and Li, Z. (2011). Ikaros, CK2 kinase, and the road to leukemia. *Mol Cell Biochem* *356*, 201-207.
- Du, J.,** Li, Z., Shi, J., and Bi, L. (2014a). Associations between serum interleukin-23 levels and clinical characteristics in patients with systemic lupus erythematosus. *J Int Med Res* *42*, 1123-1130.
- Du, R.,** Zhao, H., Yan, F., and Li, H. (2014b). IL-17+Foxp3+ T cells: an intermediate differentiation stage between Th17 cells and regulatory T cells. *J Leukoc Biol* *96*, 39-48.
- Dumortier, A.,** Jeannot, R., Kirstetter, P., Kleinmann, E., Sellars, M., dos Santos, N.R., Thibault, C., Barths, J., Ghysdael, J., Punt, J.A., Kastner, P., and Chan, S. (2006). Notch Activation Is an Early and Critical Event during T-Cell Leukemogenesis in Ikaros-Deficient Mice. *Mol Cell Biol* *26*, 209-220.
- Dupuis, A.,** Gaub, M.P., Legrain, M., Drenou, B., Mauvieux, L., Lutz, P., Herbrecht, R., Chan, S., and Kastner, P. (2013). Biclonal and biallelic deletions occur in 20% of B-ALL cases with IKZF1 mutations. *Leukemia* *27*, 503-507.
- Dwyer, K.M.,** Deaglio, S., Gao, W., Friedman, D., Strom, T.B., and Robson, S.C. (2007). CD39 and control of cellular immune responses. *Purinergic Signal* *3*, 171-180.
- Eberl, G.,** Marmon, S., Sunshine, M.J., Rennert, P.D., Choi, Y., and Littman, D.R. (2004). An essential function for the nuclear receptor ROR $\gamma$ t in the generation of fetal lymphoid tissue inducer cells. *Nat Immunol* *5*, 64-73.
- El-Behi, M.,** Ciric, B., Dai, H., Yan, Y., Cullimore, M., Safavi, F., Zhang, G.X., Dittel, B.N., and Rostami, A. (2011). The encephalitogenicity of TH17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nat Immunol* *12*, 568-575.
- Elias, K.M.,** Laurence, A., Davidson, T.S., Stephens, G., Kanno, Y., Shevach, E.M., and O'Shea, J.J. (2008). Retinoic acid inhibits Th17 polarization and enhances FoxP3 expression through a Stat-3/Stat-5 independent signaling pathway. *Blood* *111*, 1013-1020.
- Ezzat, S.,** Mader, R., Fischer, S., Yu, S., Ackerley, C., and Asa, S.L. (2006). An essential role for the hematopoietic transcription factor Ikaros in hypothalamic-pituitary-mediated somatic growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 2214-2219.
- Ferraro, A.,** Socci, C., Stabilini, A., Valle, A., Monti, P., Piemonti, L., Nano, R., Olek, S., Maffi, P., Scavini, M., Secchi, A., Staudacher, C., Bonifacio, E., and Battaglia, M. (2011). Expansion of Th17 Cells and Functional Defects in T Regulatory Cells Are Key Features of the Pancreatic Lymph Nodes in Patients With Type 1 Diabetes. *Diabetes* *60*, 2903-2913.
- Fina, D.,** Sarra, M., Fantini, M.C., Rizzo, A., Caruso, R., Caprioli, F., Stolfi, C., Cardolini, I., Dottori, M., Boirivant, M., Pallone, F., Macdonald, T.T., and Monteleone, G. (2008). Regulation of Gut Inflammation and Th17 Cell Response by Interleukin-21. *Gastroenterology* *134*, 1038-1048.

- Freeman, G.J.,** Long, A.J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L.J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M.C., Horton, H.F., Fouser, L., Carter, L., Ling, V., Bowman, M.R., Carreno, B.M., Collins, M., Wood, C.R., and Honjo, T. (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* *192*, 1027-1034.
- Fujino, S.,** Andoh, A., Bamba, S., Ogawa, A., Hata, K., Araki, Y., Bamba, T., and Fujiyama, Y. (2003). Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* *52*, 65-70.
- Gagliani, N.,** Amezcu Vesely, M.C., Iseppon, A., Brockmann, L., Xu, H., Palm, N.W., de Zoete, M.R., Licona-Limon, P., Paiva, R.S., Ching, T., Weaver, C., Zi, X., Pan, X., Fan, R., Garmire, L.X., Cotton, M.J., Drier, Y., Bernstein, B., Geginat, J., Stockinger, B., Esplugues, E., Huber, S., and Flavell, R.A. (2015). Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. *Nature* *523*, 221-225.
- Gateva, V.,** Sandling, J.K., Hom, G., Taylor, K.E., Chung, S.A., Sun, X., Ortmann, W., Kosoy, R., Ferreira, R.C., Nordmark, G., *et al.* (2009). A large-scale replication study identifies TNIP1, PRDM1, JAZF1, UHRF1BP1 and IL10 as risk loci for systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* *41*, 1228-1233.
- Geginat, J.,** Paroni, M., Maglie, S., Alfen, J.S., Kastirr, I., Gruarin, P., De Simone, M., Pagani, M., and Abrignani, S. (2014). Plasticity of Human CD4 T Cell Subsets. *Front Immunol* *5*, 630.
- Geimer Le Lay, A.S.,** Oravecz, A., Mastio, J., Jung, C., Marchal, P., Ebel, C., Dembélé, D., Jost, B., Le Gras, S., Thibault, C., Borggreffe, T., Kastner, P., and Chan, S. (2014). The Tumor Suppressor Ikaros Shapes the Repertoire of Notch Target Genes in T Cells. *Sci Signal* *7*, ra28.
- Georgopoulos, K.,** Moore, D.D., and Derfler, B. (1992). Ikaros, an early lymphoid-specific transcription factor and a putative mediator for T cell commitment. *Science* *258*, 808-812.
- Georgopoulos, K.,** Bigby, M., Wang, J.H., Molnar, A., Wu, P., Winandy, S., and Sharpe, A. (1994). The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell* *79*, 143-156.
- Ghoreschi, K.,** Laurence, A., Yang, X.P., Tato, C.M., McGeachy, M.J., Konkel, J.E., Ramos, H.L., Wei, L., Davidson, T.S., Bouladoux, N., Grainger, J.R., Chen, Q., Kanno, Y., Watford, W.T., Sun, H.W., Eberl, G., Shevach, E.M., Belkaid, Y., Cua, D.J., Chen, W., and O'Shea, J.J. (2010). Generation of pathogenic TH17 cells in the absence of TGF- $\beta$  signaling. *Nature* *467*, 967-971.
- Gladiator, A.,** Wangler, N., Trautwein-Weidner, K., and LeibundGut-Landmann, S. (2013). Cutting Edge: IL-17-Secreting Innate Lymphoid Cells Are Essential for Host Defense against Fungal Infection. *J Immunol* *190*, 521-525.
- Glas, J.,** Seiderer, J., Nagy, M., Fries, C., Beigel, F., Weidinger, M., Pfennig, S., Klein, W., Epplen, J.T., Lohse, P., Folwaczny, M., Göke, B., Ochsenkühn, T., Diegelmann, J., Müller-Myhsok, B., Roeske, D., and Brand, S. (2010). Evidence for STAT4 as a Common Autoimmune Gene: rs7574865 Is Associated with Colonic Crohn's Disease and Early Disease Onset. *PLoS One* *5*, e10373.
- Godfrey, D.I.,** Kennedy, J., Suda, T., and Zlotnik, A. (1993). A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J Immunol* *150*, 4244-4252.
- Gómez-del Arco, P.,** Maki, K., and Georgopoulos, K. (2004). Phosphorylation controls Ikaros's ability to negatively regulate the G(1)-S transition. *Mol Cell Biol* *24*, 2797, 2807.



- Gómez-del Arco, P.,** Koipally, J., and Georgopoulos, K. (2005). Ikaros SUMOylation: Switching Out of Repression. *Mol Cell Biol* 25, 2688-2697.
- Grifka-Walk, H.M.,** and Segal, B.M. (2017). T-bet promotes the accumulation of encephalitogenic Th17 cells in the CNS. *J neuroimmunol* 304, 35-39.
- Grouard, G.,** Risoan, M.C., Filgueira, L., Durand, I., Banchereau, J., and Liu, Y.J. (1997). The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* 185, 1101-1111.
- Gudbjartsson, D.F.,** Bjornsdottir, U.S., Halapi, E., Helgadóttir, A., Sulem, P., Jonsdóttir, G.M., Thorleifsson, G., Helgadóttir, H., Steinthorsdóttir, V., Stefansson, H., *et al.* (2009). Sequence variants affecting eosinophil numbers associate with asthma and myocardial infarction. *Nat Genet* 41, 342-347.
- Guéry, L.,** Dubrot, J., Lippens, C., Brighthouse, D., Malinge, P., Irla, M., Pot, C., Reith, W., Waldburger, J.M., and Hugues, S. (2014). Ag-Presenting CpG-Activated pDCs Prime Th17 Cells That Induce Tumor Regression. *Cancer Res* 74, 6430-6440.
- Guéry, L.,** and Hugues, S. (2015). Th17 Cell Plasticity and Functions in Cancer Immunity. *Biomed Res Int* 2015, 314620.
- Gurel, Z.,** Ronni, T., Ho, S., Kuchar, J., Payne, K.J., Turk, C.W., and Dovati, S. (2008). Recruitment of Ikaros to Pericentromeric Heterochromatin Is Regulated by Phosphorylation. *J Biol Chem* 283, 8291-8300.
- Hahm, K.,** Ernst, P., Lo, K., Kim, G.S., Turck, C., and Smale, S.T. (1994). The lymphoid transcription factor LyF-1 is encoded by specific, alternatively spliced mRNAs derived from the Ikaros gene. *Mol Cell Biol* 14, 7111-7123.
- Hardy, R.R.,** Kincade, P.W., and Dorshkind, K. (2007). The protean nature of cells in the B lymphocyte lineage. *Immunity* 26, 703-714.
- Harrington, L.E.,** Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., and Weaver, C.T. (2005). Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6, 1123-1132.
- Harrington, L.E.,** Mangan, P.R., and Weaver, C.T. (2006). Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr Opin Immunol* 18, 349-356.
- Havenar-Daughton, C.,** Li, S., Benlagha, K., and Marie, J.C. (2012). Development and function of murine ROR t+ iNKT cells are under TGF- signaling control. *Blood* 119, 3486-3494.
- He, D.,** Li, H., Yusuf, N., Elmets, C.A., Li, J., Mountz, J.D., and Xu, H. (2010). IL-17 Promotes Tumor Development through the Induction of Tumor Promoting Microenvironments at Tumor Sites and Myeloid-Derived Suppressor Cells. *J Immunol* 184, 2281-2288.
- Heizmann, B.,** Kastner, P., and Chan, S. (2013). Ikaros is absolutely required for pre-B cell differentiation by attenuating IL-7 signals. *J Exp Med* 210, 2823-2832.
- Heller, J.J.,** Schjerven, H., Li, S., Lee, A., Qiu, J., Chen, Z.M., Smale, S.T., and Zhou, L. (2014). Restriction of IL-22-Producing T Cell Responses and Differential Regulation of Regulatory T Cell Compartments by Zinc Finger Transcription Factor Ikaros. *J Immunol* 193, 3934-3946.

- Henriques, A.,** Inês, L., Couto, M., Pedreiro, S., Santos, C., Magalhães, M., Santos, P., Velada, I., Almeida, A., Carvalheiro, T., Laranjeira, P., Morgado, J.M., Pais, M.L., da Silva, J.A., and Paiva, A. (2010). Frequency and functional activity of Th17, Tc17 and other T-cell subsets in Systemic Lupus Erythematosus. *Cell Immunol* 264, 97-103.
- Hirota, K.,** Yoshitomi, H., Hashimoto, M., Maeda, S., Teradaira, S., Sugimoto, N., Yamaguchi, T., Nomura, T., Ito, H., Nakamura, T., Sakaguchi, N., and Sakaguchi S. (2007). Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. *J Exp Med* 204, 2803-2812.
- Hirota, K.,** Duarte, J.H., Veldhoen, M., Hornsby, E., Li, Y., Cua, D.J., Ahlfors, H., Wilhelm, C., Tolaini, M., Menzel, U., Garefalaki, A., Potocnik, A.J., and Stockinger, B. (2011). Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat Immunol* 12, 255-263.
- Hirota, K.,** Turner, J.E., Villa, M., Duarte, J.H., Demengeot, J., Steinmetz, O.M., and Stockinger, B. (2013). Plasticity of TH17 cells in Peyer's patches is responsible for the induction of T cell-dependent IgA responses. *Nat Immunol* 14, 372-379.
- Honkanen, J.,** Nieminen, J.K., Gao, R., Luopajarvi, K., Salo, H.M., Ilonen, J., Knip, M., Otonkoski, T., and Vaarala, O. (2010). IL-17 Immunity in Human Type 1 Diabetes. *J Immunol* 185, 1959-1967.
- Hoshino, A.,** Okada, S., Yoshida, K., Nishida, N., Okuno, Y., Ueno, H., Yamashita, M., Okano, T., Tsumura, M., Nishimura, S., *et al.* (2017). Abnormal hematopoiesis and autoimmunity in human subjects with germline IKZF1 mutations. *J Allergy Clin Immunol* 140, 223-231.
- Hu, Y.,** Zhang, Z., Kashiwagi, M., Yoshida, T., Joshi, I., Jena, N., Somasundaram, R., Emmanuel, A.O., Sigvardsson, M., Fitamant, J., El-Bardeesy, N., Gounari, F., Van Etten, R.A., and Georgopoulos, K. (2016). Superenhancer reprogramming drives a B-cell-epithelial transition and high-risk leukemia. *Genes Dev* 30, 1971-1990.
- Huber, M.,** Heink, S., Grothe, H., Guralnik, A., Reinhard, K., Elflein, K., Hünig, T., Mittrücker, H.W., Brüstle, A., Kamradt, T., and Lohoff, M. (2009). A Th17-like developmental process leads to CD8(+) Tc17 cells with reduced cytotoxic activity. *Eur J Immunol* 39, 1716-1725.
- Igarashi, H.,** Gregory, S.C., Yokota, T., Sakaguchi, N., and Kincade, P.W. (2002). Transcription from the RAG1 locus marks the earliest lymphocyte progenitors in bone marrow. *Immunity* 17, 117-130.
- Ikuta, K.,** and Weissman, I.L. (1992). Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 1502-1506.
- Ivanov, I.I.,** McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J., and Littman, D.R. (2006). The Orphan Nuclear Receptor ROR $\gamma$ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells. *Cell* 126, 1121-1133.
- Ivanov, I.I.,** Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E.L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K.C., Santee, C.A., Lynch, S.V., Tanoue, T., Imaoka, A., Itoh, K., Takeda, K., Umesaki, Y., Honda, K., and Littman, D.R. (2009). Induction of Intestinal Th17 Cells by Segmented Filamentous Bacteria. *Cell* 139, 485-498.
- Jäger, A.,** Dardalhon, V., Sobel, R.A., Bettelli, E., and Kuchroo, V.K. (2009). Th1, Th17, and Th9 Effector Cells Induce Experimental Autoimmune Encephalomyelitis with Different Pathological Phenotypes. *J Immunol* 183, 7169-7177.

- Jeannot, R.,** Mastio, J., Macias-Garcia, A., Oravec, A., Ashworth, T., Geimer Le Lay, A.S., Jost, B., Le Gras, S., Ghysdael, J., Gridley, T., Honjo, T., Radtke, F., Aster, J.C., Chan, S., and Kastner, P. (2010). Oncogenic activation of the Notch1 gene by deletion of its promoter in Ikaros-deficient T-ALL. *Blood* 116, 5443-5454.
- Jenkins, M.K.,** and Schwartz, R.H. (1987). Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J Exp Med* 165, 302-319.
- Jin, Y.,** Birlea, S.A., Fain, P.R., Ferrara, T.M., Ben, S., Riccardi, S.L., Cole, J.B., Gowan, K., Holland, P.J., Bennett, D.C., *et al.* Genome-wide association analyses identify 13 new susceptibility loci for generalized vitiligo. *Nat Genet* 44, 676-680.
- Jostins, L.,** Ripke, S., Weersma, R.K., Duerr, R.H., McGovern, D.P., Hui, K.Y., Lee, J.C., Schumm, L.P., Sharma, Y., Anderson, C.A., *et al.* (2012). Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* 491, 119-124.
- June, C.H.,** Ledbetter, J.A., Gillespie, M.M., Lindsten, T., and Thompson, C.B. (1987). T-cell proliferation involving the CD28 pathway is associated with cyclosporine-resistant interleukin 2 gene expression. *Mol Cell Biol* 7, 4472-4481.
- Kagami, S.,** Rizzo, H.L., Lee, J.J., Koguchi, Y., and Blauvelt, A. (2010). Circulating Th17, Th22, and Th1 Cells Are Increased in Psoriasis. *J Invest Dermatol* 130, 1373-1383.
- Kastner, P.,** Dupuis, A., Gaub, M.P., Herbrecht, R., Lutz, P., and Chan, S. (2013). Function of Ikaros as a tumor suppressor in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Am J Blood Res* 3, 1-13.
- Kaufmann, C.,** Yoshida, T., Perotti, E.A., Landhuis, E., Wu, P., and Georgopoulos, K. (2003). A complex network of regulatory elements in Ikaros and their activity during hemo-lymphopoiesis. *EMBO J* 22, 2211-2223.
- Kebir, H.,** Kreymborg, K., Ifergan, I., Dodelet-Devillers, A., Cayrol, R., Bernard, M., Giuliani, F., Arbour, N., Becher, B., and Prat, A. (2007). Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med* 13, 1173-1175.
- Kim, J.,** Sif, S., Jones, B., Jackson, A., Koipally, J., Heller, E., Winandy, S., Viel, A., Sawyer, A., Ikeda, T., Kingston, R., and Georgopoulos, K. (1999). Ikaros DNA-binding proteins direct formation of chromatin remodeling complexes in lymphocytes. *Immunity* 10, 345-355.
- Kirstetter, P.,** Thomas, M., Dierich, A., Kastner, P., and Chan, S. (2002). Ikaros is critical for B cell differentiation and function. *Eur J Immunol* 32, 720-730.
- Kleinmann, E.,** Geimer Le Lay, A.S., Sellars, M., Kastner, P., and Chan, S. (2008). Ikaros Represses the Transcriptional Response to Notch Signaling in T-Cell Development. *Mol Cell Biol* 28, 7465-7475.
- Klose, C.S.N.,** Kiss, E.A., Schwierzeck, V., Ebert, K., Hoyler, T., d'Hargues, Y., Göppert, N., Croxford, A.L., Waisman, A., Tanriver, Y., and Diefenbach, A. (2013). A T-bet gradient controls the fate and function of CCR6-ROR $\gamma$ t+ innate lymphoid cells. *Nature* 494, 261-265.
- Koipally, J.,** and Georgopoulos, K. (2002). Ikaros Interactions with CtBP Reveal a Repression Mechanism That Is Independent of Histone Deacetylase Activity. *J Biol Chem* 275, 19594-19602.
- Koipally, J.,** Heller, E.J., Seavitt, J.R., and Georgopoulos, K. (2002a). Unconventional Potentiation of Gene Expression by Ikaros. *J Biol Chem* 277, 13007-13015.

- Koipally, J.**, and Georgopoulos, K. (2002b). A Molecular Dissection of the Repression Circuitry of Ikaros. *J Biol Chem* 277, 27697-27705.
- Kondo, M.**, Weissman, I.L. and Akashi, K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91, 661-672.
- Korn, T.**, Oukka, M., Kuchroo, V., and Bettelli, E. (2007). Th17 cells: Effector T cells with inflammatory properties. *Semin Immunol* 19, 362-371.
- Krantz, I.D.** (2002). Alagille syndrome: chipping away at the tip of the iceberg. *Am J Med Genet* 112, 160-162.
- Krausgruber, T.**, Schiering, C., Adelman, K., Harrison, O.J., Chomka, A., Pearson, C., Ahern, P.P., Shale, M., Oukka, M., and Powrie, F. (2016). T-bet is a key modulator of IL-23-driven pathogenic CD4+ T cell responses in the intestine. *Nat Commun* 7, 11627.
- Kryczek, I.**, Wei, S., Szeliga, W., Vatan, L., and Zou, W. (2009). Endogenous IL-17 contributes to reduced tumor growth and metastasis. *Blood* 114, 357-359.
- Kuehn, H.S.**, Boisson, B., Cunningham-Rundles, C., Reichenbach, J., Stray-Pedersen, A., Gelfand, E.W., Maffucci, P., Pierce, K.R., Abbott, J.K., Voelkerding, K.V., *et al.* (2016). Loss of B Cells in Patients with Heterozygous Mutations in IKAROS. *N Engl J Med* 374, 1032-1043.
- Kyttaris, V.C.**, Zhang, Z., Kuchroo, V.K., Oukka, M., and Tsokos, G.C. (2010). Cutting edge: IL-23 receptor deficiency prevents the development of lupus nephritis in C57BL/6-lpr/lpr mice. *J Immunol* 184, 4605-4609.
- Lafferty, K.J.**, and Cunningham, A.J. (1975). A new analysis of allogeneic interactions. *Aust J Exp Biol Med Sci* 53, 27-42.
- Lainé, A.**, Martin, B., Luka, M., Mir, L., Auffray, C., Lucas, B., Bismuth, G., and Charvet, C. (2015). Foxo1 Is a T Cell–Intrinsic Inhibitor of the ROR $\gamma$ t-Th17 Program. *J Immunol* 195, 1791-1803.
- Langrish, C.L.**, Chen, Y., Blumenschein, W.M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J.D., McClanahan, T., Kastelein, R.A., and Cua, D.J. (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 201, 233-240.
- Laurence, A.**, Tato, C.M., Davidson, T.S., Kanno, Y., Chen, Z., Yao, Z., Blank, R.B., Meylan, F., Siegel, R., Hennighausen, L., Shevach, E.M., and O’Shea, J.J. (2007). Interleukin-2 Signaling via STAT5 Constrains T Helper 17 Cell Generation. *Immunity* 26, 371-381.
- Lee, Y.**, Awasthi, A., Yosef, N., Quintana, F.J., Xiao, S., Peters, A., Wu, C., Kleinewietfeld, M., Kunder, S., Hafler, D.A., Sobel, R.A., Regev, A., and Kuchroo, V.K. (2012). Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nat Immunol* 13, 991-999.
- Lee, Y.K.**, Mukasa, R., Hatton, R.D., and Weaver, C.T. (2009). Developmental plasticity of Th17 and Treg cells. *Curr Opin Immunol* 21, 274-280.
- Li, M.O.**, Wan, Y.Y., and Flavell, R.A. (2007). T Cell-Produced Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Controls T Cell Tolerance and Regulates Th1- and Th17-Cell Differentiation. *Immunity* 26, 579-591.
- Li, Z.**, Perez-Casellas, L.A., Savic, A., Song, C., and Dovati, S. (2011). Ikaros isoforms: The saga continues. *World J Biol Chem* 2, 140-145.

- Liang, Z.**, Brown, K.E., Carroll, T., Taylor, B., Vidal, I.F., Hendrich, B., Rueda, D., Fisher, A.G., and Merckenschlager, M. (2017). A high-resolution map of transcriptional repression. *ELife* 6, pii: e22767.
- Linsley, P.S.**, Clark, E.A., and Ledbetter, J.A. (1990). T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 5031-5035.
- Liu, R.**, Wu, Q., Su, D., Che, N., Chen, H., Geng, L., Chen, J., Chen, W., Li, X., and Sun, L. (2012). A regulatory effect of IL-21 on T follicular helper-like cell and B cell in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 14, R255.
- Lo, K.**, Landeau, N.R., and Smale, S.T. (1991). LyF-1, a transcriptional regulator that interacts with a novel class of promoters for lymphocyte-specific genes. *Mol Cell Biol* 11, 5229-5243.
- Luckheeram, R.V.**, Zhou, R., Verma, A.D., and Xia, B. (2012). CD4<sup>+</sup>T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol* 925135.
- Malissen, B.**, Grégoire, C., Malissen, M., and Roncagalli, R. (2014). Integrative biology of T cell activation. *Nat Immunol* 15, 790-797.
- Mangan, P.R.**, Harrington, L.E., O'Quinn, D.B., Helms, W.S., Bullard, D.C., Elson, C.O., Hatton, R.D., Wahl, S.M., Schoeb, T.R., and Weaver, C.T. (2006). Transforming growth factor- $\beta$  induces development of the TH17 lineage. *Nature* 441, 231-234.
- Marçais, A.**, Jeannet, R., Hernandez, L., Soulier, J., Sigaux, F., Chan, S., and Kastner, P. (2010). Genetic inactivation of Ikaros is a rare event in human T-ALL. *Leuk Res* 34, 426-429.
- Marenholz, I.**, Esparza-Gordillo, J., Rüschenhoff, F., Bauerfeind, A., Strachan, D.P., Spycher, B.D., Baurecht, H., Margaritte-Jeannin, P., Sääf, A., Kerkhof, M., *et al.* (2015). Meta-analysis identifies seven susceptibility loci involved in the atopic march. *Nat Commun* 6, 8804.
- Marks, B.R.**, Nowyhed, H.N., Choi, J.Y., Poholek, A.C., Odegard, J.M., Flavell, R.A., and Craft, J. (2009). Thymic self-reactivity selects natural interleukin 17-producing T cells that can regulate peripheral inflammation. *Nat Immunol* 10, 1125-1132.
- Martin, F.**, Apetoh, L., and Ghiringhelli, F. (2012). Controversies on the role of Th17 in cancer: a TGF- $\beta$ -dependent immunosuppressive activity? *Trends Mol Med* 18, 742-749.
- Martin-Orozco, N.**, Muranski, P., Chung, Y., Yang, X.O., Yamazaki, T., Lu, S., Hwu, P., Restifo, N.P., Overwijk, W.W., and Dong, C. (2009). T Helper 17 Cells Promote Cytotoxic T Cell Activation in Tumor Immunity. *Immunity* 31, 787-798.
- Masuda, K.**, Kakugawa, K., Nakayama, T., Minato, N., Katsura, Y., and Kawamoto, H. (2007). T cell lineage determination precedes the initiation of TCR beta gene rearrangement. *J Immunol* 179, 3699-3706.
- McGeachy, M.J.**, Chen, Y., Tato, C.M., Laurence, A., Joyce-Shaikh, B., Blumenschein, W.M., McClanahan, T.K., O'Shea, J.J., and Cua, D.J. (2009). The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nat Immunol* 10, 314-324.
- McWilliams, I.L.**, Rajbhandari, R., Nozell, S., Benveniste, E., and Harrington, L.E. (2015). STAT4 controls GM-CSF production by both Th1 and Th17 cells during EAE. *J Neuroinflammation* 12, 128.

- Michel, M.L.,** Mendes-da-Cruz, D., Keller, A.C., Lochner, M., Schneider, E., Dy, M., Eberl, G., and Leite-de-Moraes, M.C. (2008). Critical role of ROR- $\gamma$  in a new thymic pathway leading to IL-17-producing invariant NKT cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 19845-19850.
- Molnár, A.,** and Georgopoulos, K. (1994). The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* *14*, 8292-8303.
- Morgan, B.,** Sun, L., Avitahl, N., Andrikopoulos, K., Ikeda, T., Gonzales, E., Wu, P., Neben, S., and Georgopoulos, K. (1997). Aiolos, a lymphoid restricted transcription factor that interacts with Ikaros to regulate lymphocyte differentiation. *EMBO J* *16*, 2004-2013.
- Mosmann, T.R.,** Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., and Coffman, R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* *136*, 2348-2357.
- Mucida, D.,** Park, Y., Kim, G., Turovskaya, O., Scott, I., Kronenberg, M., and Cheroutre, H. (2007). Reciprocal TH17 and Regulatory T Cell Differentiation Mediated by Retinoic Acid. *Science* *317*, 256-260.
- Mullighan, C.G.,** Su, X., Zhang, J., Radtke, I., Phillips, L.A., Miller, C.B., Ma, J., Liu, W., Cheng, C., Schulman, B.A., Harvey, R.C., Chen, I.M., Clifford, R.J., Carroll, W.L., Reaman, G., Bowman, W.P., Devidas, M., Gerhard, D.S., Yang, W., Relling, M.V., Shurtleff, S.A., Campana, D., Borowitz, M.J., Pui, C.H., Smith, M., Hunger, S.P., Willman, C.L., and Downing, J.R. (2009). Deletion of IKZF1 and Prognosis in Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* *360*, 470-480.
- Murphy, C.A.,** Langrish, C.L., Chen, Y., McClanahan, T., Kastelein, R.A., Sedgwick, J.D., and Cua, D.J. (2003). Divergent Pro- and Antiinflammatory Roles for IL-23 and IL-12 in Joint Autoimmune Inflammation. *J Exp Med* *198*, 1951-1957.
- Ng, S.Y.,** Yoshida, T., Zhang, J., and Georgopoulos, K. (2009). Genome-wide Lineage-Specific Transcriptional Networks Underscore Ikaros-Dependent Lymphoid Priming in Hematopoietic Stem Cells. *30*, 493-507.
- Nichogiannopoulou, A.,** Trevisan, M., Neben, S., Friedrich, C., and Georgopoulos, K. (1999). Defects in hemopoietic stem cell activity in Ikaros mutant mice. *J Exp Med* *190*, 1201-1214.
- Nistala, K.,** Adams, S., Cambrook, H., Ursu, S., Olivito, B., de Jager, W., Evans, J.G., Cimaz, R., Bajaj-Elliott, M., and Wedderburn, L.R. (2010). Th17 plasticity in human autoimmune arthritis is driven by the inflammatory environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 14751-14756.
- Notley, C.A.,** Inglis, J.J., Alzabin, S., McCann, F.E., McNamee, K.E., and Williams, R.O. (2008). Blockade of tumor necrosis factor in collagen-induced arthritis reveals a novel immunoregulatory pathway for Th1 and Th17 cells. *J Exp Med* *205*, 2491-2497.
- Numasaki, M.,** Fukushi, J., Ono, M., Narula, S.K., Zavodny, P.J., Kudo, T., Robbins, P.D., Tahara, H., and Lotze, M.T. (2003). Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood* *101*, 2620-2627.
- Numasaki, M.,** Watanabe, M., Suzuki, T., Takahashi, H., Nakamura, A., McAllister, F., Hishinuma, T., Goto, J., Lotze, M.T., Kolls, J.K., and Sasaki, H. (2005). IL-17 enhances the net angiogenic activity and in vivo growth of human non-small cell lung cancer in SCID mice through promoting CXCR-2-dependent angiogenesis. *J Immunol* *175*, 6177-6189.

- O'Brien, S.,** Thomas, R.M., Wertheim, G.B., Zhang, F., Shen, H., and Wells, A.D. (2014). Ikaros Imposes a Barrier to CD8+ T Cell Differentiation by Restricting Autocrine IL-2 Production. *J Immunol* *192*, 5118-5129.
- Ohsugi, T.** (2013). A transgenic mouse model of human T cell leukemia virus type 1-associated diseases. *Front Microbiol* *4*, 49.
- Okazaki, T.,** Iwai, Y., and Honjo, T. (2002). New regulatory co-receptors: inducible co-stimulator and PD-1. *Curr Opin Immunol* *14*, 779-782.
- Oppmann, B.,** Lesley, R., Blom, B., Timans, J.C., Xu, Y., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K., Zonin, F., Vaisberg, E., Churakova, T., Liu, M., Gorman, D., Wagner, J., Zurawski, S., Liu, Y., Abrams, J.S., Moore, K.W., Rennick, D., de Waal-Malefyt, R., Hannum, C., Bazan, J.F., and Kastelein, R.A. (2000). Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* *13*, 715-725.
- Oravec, A.,** Apostolov, A., Polak, K., Jost, B., Le Gras, S., Chan, S., and Kastner, P. (2015). Ikaros mediates gene silencing in T cells through Polycomb repressive complex 2. *Nat Commun* *6*, 8823.
- Papathanasiou, P.,** Perkins, A.C., Cobb, B.S., Ferrini, R., Sridharan, R., Hoyne, G.F., Nelms, K.A., Smale, S.T., and Goodnow, C.C. (2003). Widespread failure of hematolymphoid differentiation caused by a recessive niche-filling allele of the Ikaros transcription factor. *Immunity* *19*, 131-144.
- Papotto, P.H.,** Ribot, J.C., and Silva-Santos, B. (2017). IL-17+  $\gamma\delta$  T cells as kick-starters of inflammation. *Nat Immunol* *18*, 604-611.
- Pardali, E.,** Goumans, M.J., and ten Dijke, P. (2010). Signaling by members of the TGF- $\beta$  family in vascular morphogenesis and disease. *Trends Cell Biol* *20*, 556-567.
- Park, H.,** Li, Z., Yang, X.O., Chang, S.H., Nurieva, R., Wang, Y.H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., and Dong, C. (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* *6*, 1133-1141.
- Park, J.S.,** Park, M.K., Lee, S.Y., Oh, H.J., Lim, M.A., Cho, W.T., Kim, E.K., Ju, J.H., Park, Y.W., Park, S.H., Cho, M.L., and Kim, H.Y. (2012). TWEAK promotes the production of Interleukin-17 in rheumatoid arthritis. *Cytokine* *60*, 143-149.
- Payne, K.J.,** Huang, G., Sahakian, E., Zhu, J.Y., Barteneva, N.S., Barsky, L.W., Payne, M.A., and Crooks, G.M. (2003). Ikaros isoform x is selectively expressed in myeloid differentiation. *J Immunol* *170*, 3091-3098.
- Perotti, E.A.,** Georgopoulos, K., and Yoshida, T. (2015). An Ikaros Promoter Element with Dual Epigenetic and Transcriptional Activities. *PLoS One* *10*, e0131568.
- Porritt, H.E.,** Rumfelt, 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.
- Pui, J.C.,** Allman, D., Xu, L., DeRocco, S., Karnell, F.G., Bakkour, S., Lee, J.Y., Kadesch, T., Hardy, R.R., Aster, J.C., and Pear, W.S. (1999). Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity* *11*, 299-308.
- Punt, S.,** Fleuren, G.J., Kritikou, E., Lubberts, E., Trimbos, J.B., Jordanova, E.S., and Gorter, A. (2015). Angels and demons: Th17 cells represent a beneficial response, while neutrophil IL-17 is associated with poor prognosis in squamous cervical cancer. *Oncoimmunology* *4*, e984539.

- Quintana, F.J.,** Jin, H., Burns, E.J., Nadeau, M., Yeste, A., Kumar, D., Rangachari, M., Zhu, C., Xiao, S., Seavitt, J., Georgopoulos, K., and Kuchroo VK. (2012). Aiolos promotes TH17 differentiation by directly silencing Il2 expression. *Nat Immunol* *13*, 770-777.
- Quirion, M.R.,** Gregory, G.D., Umetsu, S.E., Winandy, S., and Brown, M.A. (2009). Cutting edge: Ikaros is a regulator of Th2 cell differentiation. *J Immunol* *182*, 741-745.
- Radtke, F.,** Wilson, A., Stark, G., Bauer, M., van Meerwijk, J., MacDonald, H.R., and Aguet, M. (1999). Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* *10*, 547-558.
- Read, K.A.,** Powell, M.D., Baker, C.E., Sreekumar, B.K., Ringel-Scaia, V.M., Bachus, H., Martin, R.E., Cooley, I.D., Allen, I.C., Ballesteros-Tato, A., and Oestreich, K.J. (2017). Integrated STAT3 and Ikaros Zinc Finger Transcription Factor Activities Regulate Bcl-6 Expression in CD4<sup>+</sup>Th Cells. *J Immunol* *199*, 2377-2387.
- Renner, K.,** Hellerbrand, S., Hermann, F., Riedhammer, C., Talke, Y., Schiechl, G., Gomez, M.R., Kutzi, S., Halbritter, D., Goebel, N., Brühl, H., Weissert, R., and Mack, M. (2016). IL-3 promotes the development of experimental autoimmune encephalitis. *JCI Insight* *1*, e87157.
- Roberts, C.W.,** and Orkin, S.H. (2004). The SWI/SNF complex — chromatin and cancer. *Nat Rev Cancer* *4*, 133-142.
- Roncagalli, R.,** Hauri, S., Fiore, F., Liang, Y., Chen, Z., Sansoni, A., Kanduri, K., Joly, R., Malzac, A., Lähdesmäki, H., Lahesmaa, R., Yamasaki, S., Saito, T., Malissen, M., Aebersold, R., Gstaiger, M., and Malissen, B. (2014). Quantitative proteomics analysis of signalosome dynamics in primary T cells identifies the surface receptor CD6 as a Lat adaptor-independent TCR signaling hub. *Nat Immunol* *15*, 384-392.
- Rovedatti, L.,** Kudo, T., Biancheri, P., Sarra, M., Knowles, C.H., Rampton, D.S., Corazza, G.R., Monteleone, G., Di Sabatino, A., and Macdonald, T.T. (2009). Differential regulation of interleukin 17 and interferon production in inflammatory bowel disease. *Gut* *58*, 1629-1636.
- Sakagushi, S.,** Yamaguchi, T., Nomura, T., and Ono, M. (2008). Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell* *133*, 775-787.
- Sawa, S.,** Cherrier, M., Mochner, M., Satoh-Takayama, N., Fehling, H.J., Langa, F., Di Santo, J.P., and Eberl, G. (2010). Lineage Relationship Analysis of ROR t+ Innate Lymphoid Cells. *Science* *330*, 665-669.
- Schirmer, L.,** Merkler, D., König, F.B., Brück, W., and Stadelmann, C. (2013). Neuroaxonal Regeneration is More Pronounced in Early Multiple Sclerosis than in Traumatic Brain Injury Lesions: Neuroaxonal De- and Regeneration in MS and TBI. *Brain Pathol* *23*, 2-12.
- Schjerven, H.,** McLaughlin, J., Arenzana, T.L., Fritze, S., Cheng, D., Wadsworth, S.E., Lawson, G.W., Bensinger, S.J., Farnham, P.J., Witte, O.N., and Smale, S.T. (2013). Selective regulation of lymphopoiesis and leukemogenesis by individual zinc fingers of Ikaros. *Nat Immunol* *14*, 1073-1083.
- Schuster, N.,** and Kriegelstein, K. (2002). Mechanisms of TGF- $\beta$ -mediated apoptosis. *Cell Tissue Res* *307*, 1-14.
- Sellars, M.,** Reina-San-Martin, B., Kastner, P. and Chan, S. (2009). Ikaros controls isotype selection during immunoglobulin class switch recombination. *J Exp Med* *206*, 1073-1087.



- Shah, K.**, Lee, W.W., Lee, S.H., Kim, S.H., Kang, S.W., Craft, J., and Kang, I. (2010). Dysregulated balance of Th17 and Th1 cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 12, R53.
- Sheng, W.**, Yang, F., Zhou, Y., Yang, H., Low, P.Y., Kemeny, D.M., Tan, P., Moh, A., Kaplan, M.H., Zhang, Y., and Fu, X.Y. (2014). STAT5 programs a distinct subset of GM-CSF-producing T helper cells that is essential for autoimmune neuroinflammation. *Cell Res* 24, 1387-1402.
- Shin, D.S.**, Jordan, A., Basu, S., Thomas, R.M., Bandyopadhyay, S., de Zoeten, E.F., Wells, A.D., and Macian, F. (2014). Regulatory T cells suppress CD4+ T cells through NFAT-dependent transcriptional mechanisms. *EMBO Rep* 15, 991-999.
- Shrikant, P.A.**, Rao, R., Li, Q., Kesterson, J., Eppolito, C., Mischo, A., and Singhal, P. (2010). Regulating functional cell fates in CD8 T cells. *Immunol Res* 46, 12-22.
- Shurin, M.R.**, Shurin, G.V., Lokshin, A., Yurkovetsky, Z.R., Gutkin, D.W., Chatta, G., Zhong, H., Han, B., and Ferris, R.L. (2006). Intratumoral cytokines/chemokines/growth factors and tumor infiltrating dendritic cells: friends or enemies?. *Cancer Metastasis Rev* 25, 333-356.
- Sitnicka, E.**, Brakebusch, C., Martensson, I.L., Svensson, M., Agace, W.W., Sigvardsson, M., Buza-Vidas, N., Bryder, D., Cilio, C.M., Ahlenius, H., Maraskovsky, E., Peschon, J.J., and Jacobsen, S.E.W. (2003). Complementary signaling through flt3 and Interleukin-7 Receptor  $\alpha$  Is Indispensable for Fetal and Adult B Cell Genesis. *J Exp Med* 198, 1495-1506.
- Soldaini, E.**, John, S., Moro, S., Bollenbacher, J., Schindler, U., and Leonard, W.J. (2000). DNA binding site selection of dimeric and tetrameric Stat5 proteins reveals a large repertoire of divergent tetrameric Stat5a binding sites. *Mol Cell Biol* 20, 389-401.
- Spangrude, G.J.**, Heimfeld, S., and Weissman, I.L. (1988). Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 241, 58-62.
- Spits, H.**, and Di Santo, J.P. (2011). The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. *Nat Immunol* 12, 21-27.
- Stienne, C.**, Michieletto, M.F., Benamar, M., Carrié, N., Bernard, I., Nguyen, X.H., Lippi, Y., Duguet, F., Liblau, R.S., Hedrick, S.M., Saoudi, A., and Dejean, A.S. (2016). Foxo3 Transcription Factor Drives Pathogenic T Helper 1 Differentiation by Inducing the Expression of Eomes. *Immunity* 45, 774-787.
- Stockinger, B.**, and Omenetti, S. (2017). The dichotomous nature of T helper 17 cells. *Nat Rev Immunol*.
- Sun, L.**, Liu, A., and Georgopoulos, K. (1996). Zinc finger-mediated protein interactions modulate Ikaros activity, a molecular control of lymphocyte development. *EMBO J* 15, 5358-5369.
- Sundrud, M.S.**, and Rao, A. (2008). Regulation of T Helper 17 Differentiation by Orphan Nuclear Receptors: It's Not Just ROR $\gamma$ t Anymore. *Immunity* 28, 5-7.
- Swafford, A.D.**, Howson, J.M., Davison, L.J., Wallace, C., Smyth, D.J., Schuilenburg, H., Maisuria-Armer, M., Mistry, T., Lenardo, M.J., and Todd, J.A. (2011). An Allele of IKZF1 (Ikaros) Conferring Susceptibility to Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Protects Against Type 1 Diabetes. *Diabetes* 60, 1041-1044.
- Szabo, S.J.**, Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G., and Glimcher, L.H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100, 655-669.

- Tabarkiewicz, J.**, Pogoda, K., Karczmarczyk, A., Pozarowski, P., and Giannopoulos, K. (2015). The Role of IL-17 and Th17 Lymphocytes in Autoimmune Diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 63, 435-449.
- 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.
- Tautz, D.**, Lehmann, R., Schnürch, H., Schuh, R., Seifert, E., Kienlin, A., Jones, K., and Jäckle, H. (1987). Finger protein of novel structure encoded by *hunchback*, a second member of the gap class of *Drosophila* segmentation genes. *Nature* 327, 383-389.
- Thomas, R.M.**, Chen, C., Chunder, N., Ma, L., Taylor, J., Pearce, E.J., and Wells, A.D. (2010). Ikaros Silences T-bet Expression and Interferon- $\gamma$  Production during T Helper 2 Differentiation. *J Biol Chem* 285, 2545-2553.
- Umetsu, S.E.**, and Winandy, S. (2009). Ikaros Is a Regulator of Il10 Expression in CD4+ T Cells. *J Immunol* 183, 5518-5525.
- Urbanek, P.**, Wang, Z.Q., Fetka, I., Wagner, E.F., and Busslinger, M. (1994). Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking Pax5/BSAP. *Cell* 79, 901-912.
- van Beelen, A.J.**, Teunissen, M.B., Kapsenberg, M.L., and de Jong, E.C. (2007). Interleukin-17 in inflammatory skin disorders. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 7, 374-381.
- van Hamburg, J.P.**, Corneth, O.B., Paulissen, S.M., Davelaar, N., Asmawidjaja, P.S., Mus, A.M., and Lubberts, E. (2013). IL-17/Th17 mediated synovial inflammation is IL-22 independent. *Ann Rheum Dis* 72, 1700-1707.
- van Panhuys, N.** (2016). TCR Signal Strength Alters T-DC Activation and Interaction Times and Directs the Outcome of Differentiation. *Front Immunol* 7, 6.
- Végran, F.**, Apetoh, L., and Ghiringhelli, F. (2015). Th9 Cells: A Novel CD4 T-cell Subset in the Immune War against Cancer. *Cancer Res* 75, 475-479.
- Veldhoen, M.**, Hocking, R.J., Atkins, C.J., Locksley, R.M., and Stockinger, B. (2006). TGF $\beta$  in the Context of an Inflammatory Cytokine Milieu Supports De Novo Differentiation of IL-17-Producing T Cells. *Immunity* 24, 179-189.
- Veldhoen, M.**, Uyttenhove, C., van Snick, J., Helmby, H., Westendorf, A., Buer, J., Martin, B., Wilhelm, C., and Stockinger, B. (2008). Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin-9 producing subset. *Nat Immunol* 9, 1341-1346.
- Vremec, D.**, Pooley, J., Hochrein, H., Wu, L., and Shortman, K. (2000). CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J Immunol* 164, 2978-2986.
- Wang, H.H.**, Dai, Y.Q., Qiu, W., Lu, Z.Q., Peng, F.H., Wang, Y.G., Bao, J., Li, Y., and Hu, X.Q. (2011). Interleukin-17-secreting T cells in neuromyelitis optica and multiple sclerosis during relapse. *J Clin Neurosci* 18, 1313-1317.
- Wang, J.H.**, Nichogiannopoulou, A., Wu, L., Sun, L., Sharpe, A.H., Bigby, M., and Georgopoulos, K. (1996). Selective defects in the development of the fetal and adult lymphoid system in mice with an Ikaros null mutation. *Immunity* 5, 537-549.

- Wilson, N.J.**, Boniface, K., Chan, J.R., McKenzie, B.S., Blumenschein, W.M., Mattson, J.D., Basham, B., Smith, K., Chen, T., Morel, F., Lecron, J.C., Kastelein, R.A., Cua, D.J., McClanahan, T.K., Bowman, E.P., and de Waal Malefyt, R. (2007). Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 8, 950-957.
- Winandy, S.**, Wu, P., and Georgopoulos, K. (1995). A dominant mutation in the Ikaros gene leads to rapid development of leukemia and lymphoma. *Cell* 83, 289-299.
- Wong, L.Y.**, Hatfield, J.K., and Brown, M.A. (2013). Ikaros Sets the Potential for Th17 Lineage Gene Expression through Effects on Chromatin State in Early T Cell Development. *J Biol Chem* 288, 35170-35179.
- Wu, L.**, Li, C.L., and Shortman, K. (1996). Thymic dendritic cell precursors: relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny. *J Exp Med* 184, 903-911.
- Wu, L.**, Nichogiannopoulou, A., Shortman, K., and Georgopoulos, K. (1997). Cell-autonomous defects in dendritic cell populations of Ikaros mutant mice point to a developmental relationship with the lymphoid lineage. *Immunity* 7, 483-492.
- Yadav, M.**, Louvet, C., Davini, D., Gardner, J.M., Martinez-Llordella, M., Bailey-Bucktrout, S., Anthony, B.A., Sverdrup, F.M., Head, R., Kuster, D.J., Ruminski, P., Weiss, D., Von Schack, D., and Bluestone, J.A. (2012). Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. *J Exp Med* 209, 1713-1722.
- Yang, L.**, Anderson, D.E., Baecher-Allan, C., Hastings, W.D., Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, V.K., and Hafler, D.A. (2008). IL-21 and TGF- $\beta$  are required for differentiation of human TH17 cells. *Nature* 454, 350-352.
- Yang, X.O.**, Panopoulos, A.D., Nurieva, R., Chang, S.H., Wang, D., Watowich, S.S., and Dong, C. (2007). STAT3 Regulates Cytokine-mediated Generation of Inflammatory Helper T Cells. *J Biol Chem* 282, 9358-9363.
- Ye, J.**, Livergood, R.S., and Peng, G. (2013). The Role and Regulation of Human Th17 Cells in Tumor Immunity. *Am J Pathol* 182, 10-20.
- Yen, H.R.**, Harris, T.J., Wada, S., Grosso, J.F., Getnet, D., Goldberg, M.V., Liang, K.L., Bruno, T.C., Pyle, K.J., Chan, S.L., Anders, R.A., Trimble, C.L., Adler, A.J., Lin, T.Y., Pardoll, D.M., Huang, C.T., and Drake, C.G. (2009). Tc17 CD8 T Cells: Functional Plasticity and Subset Diversity. *J Immunol* 183, 7161-7168.
- Yosef, N.**, Shalek, A.K., Gaublomme, J.T., Jin, H., Lee, Y., Awasthi, A., Wu, C., Karwacz, K., Xiao, S., Jorgolli, M., Gennert, D., Satija, R., Shakya, A., Lu, D.Y., Trombetta, J.J., Pillai, M.R., Ratcliffe, P.J., Coleman, M.L., Bix, M., Tantin, D., Park, H., Kuchroo, V.K., and Regev, A. (2013). Dynamic regulatory network controlling TH17 cell differentiation. *Nature* 496, 461-468.
- Yoshida, T.**, Ng, S.Y., and Georgopoulos, K. (2010). Awakening lineage potential by Ikaros-mediated transcriptional priming. *Curr Opin Immunol* 22, 154-160.
- Yoshida, T.**, Landhuis, E., Dose, M., Hazan, I., Zhang, J., Naito, T., Jackson, A.F., Wu, J., Perotti, E.A., Kaufmann, C., Gounari, F., Morgan, B.A., and Georgopoulos, K. (2013). Transcriptional regulation of the *Ikzf1* locus. *Blood* 122, 3149-3159.
- Yoshida, T.**, and Georgopoulos, K. (2014). Ikaros fingers on lymphocyte differentiation. *Int J Hematol* 100, 220-229.

**Zhang, L.,** Li, Y.G., Li, Y.H., Qi, L., Liu, X.G., Yuan, C.Z., Hu, N.W., Ma, D.X., Li, Z.F., Yang, Q., Li, W., and Li, J.M. (2012). Increased Frequencies of Th22 Cells as well as Th17 Cells in the Peripheral Blood of Patients with Ankylosing Spondylitis and Rheumatoid Arthritis. *PLoS One* 7, e31000.

**Zheng, W.,** and Flavell, R.A. (1997). The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 89, 587-596.

**Zhou, L.,** Ivanov, I.I., Spolski, R., Min, R., Shenderov, K., Egawa, T., Levy, D.E., Leonard, W.J., and Littman, D.R. (2007). IL-6 programs TH-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* 8, 967-974.

**Zhou, L.,** Chong, M.M., and Littman, D.R. (2009). Plasticity of CD4+ T Cell Lineage Differentiation. *Immunity* 30, 646-655.

## Analyse du rôle du facteur de transcription Ikaros dans le développement des lymphocytes T<sub>H</sub>17

### Résumé

Les cellules T auxiliaires T<sub>H</sub>17 sont caractérisées par l'expression de la cytokine IL-17A, ainsi que le facteur de transcription ROR $\gamma$ t. Elles sont connues pour jouer un rôle clé dans la pathogenèse de la sclérose en plaques. Ces cellules existent sous deux formes : les cellules régulatrices, immunomodulatrices, et les cellules pathogènes qui sont critiques pour l'inflammation. Il est donc important de comprendre le mécanisme qui sous-tend la différenciation des cellules TCD4<sup>+</sup> naïves en ces deux types cellulaires. J'ai trouvé que le facteur de transcription Ikaros est un répresseur indirect de la transcription des gènes pathogéniques (*Il3*, *Csf2*, *Ifng*, *Stat4*...) dans les cellules TCD4<sup>+</sup> naïves murines, cultivées pour induire une polarisation vers le phénotype T<sub>H</sub>17 régulateur. De plus, en absence d'Ikaros et en conditions de culture régulatrice, l'ajout d'IL-6 seul augmente l'expression de GM-CSF, facteur clé dans l'induction des maladies auto-immunes, suggérant un rôle d'Ikaros dans la régulation de cette voie. En conclusion, nos résultats suggèrent que Ikaros est nécessaire pour polariser correctement les cellules TCD4<sup>+</sup> naïves dans le programme T<sub>H</sub>17.

**Mots-clés :** Facteur de transcription, Ikaros, ROR $\gamma$ t, cellules T<sub>H</sub>17, gènes pathogéniques.

### Summary

T<sub>H</sub>17 cells are characterized by the expression of the cytokine IL-17A, as well as the transcription factor ROR $\gamma$ t. They are known to play key role in the pathogenesis of the multiple sclerosis. These cells exist in two forms: the regulating cells, immunomodulatory, and the pathogenic cells which are critical for the inflammation. Thus it is important to understand the mechanism which underlies the differentiation of naïve CD4<sup>+</sup> T cells in these two cellular types. I found that the transcription factor Ikaros is an indirect repressor of the transcription of pathogenic genes (*Il3*, *Csf2*, *Ifng*, *Stat4*...) in naïve CD4<sup>+</sup> T cells, cultured to induce a polarization toward regulatory T<sub>H</sub>17 cells. Moreover, in absence of Ikaros and in regulatory condition of culture, adding IL-6 alone increases the expression of GM-CSF, key factor to induce auto-immune diseases, suggesting a role of Ikaros in this pathway. In conclusion, our results suggest that Ikaros is necessary to polarize correctly naïve CD4<sup>+</sup> T cells in T<sub>H</sub>17 cells.

**Key words :** Transcription factor, Ikaros, ROR $\gamma$ t, T<sub>H</sub>17 cells, pathogenic genes.