



HAL
open science

Rôle du TGF-beta dans la biologie des lymphocytes Th17 déjà différenciés et leur impact dans l'inflammation chronique intestinale

Olivier Fesneau

► **To cite this version:**

Olivier Fesneau. Rôle du TGF-beta dans la biologie des lymphocytes Th17 déjà différenciés et leur impact dans l'inflammation chronique intestinale. Immunologie. Université de Lyon, 2019. Français. NNT : 2019LYSE1350 . tel-03907317

HAL Id: tel-03907317

<https://theses.hal.science/tel-03907317>

Submitted on 20 Dec 2022

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.



N° d'ordre NNT :

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° ED340
(Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire)

Spécialité de doctorat : Immunologie
Discipline : Biologie Cellulaire & Biologie Moléculaire

Soutenue publiquement le 19/12/2019, par :
Olivier FESNEAU

**Rôle du TGF-beta dans la biologie des lymphocytes Th17 déjà
différenciés et leur impact dans l'inflammation chronique
intestinale**

Devant le jury composé de :

Astier, Anne Rapporteur	Chargée de Recherche / Centre de Physiopathologie Toulouse-Purpan
Louis-Plence, Pascale Rapporteur	Chargée de Recherche / Institute for Regenerative Medicine and Biotherapy
Dardalhon, Valérie Examineur	Chargée de Recherche / Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier
Marie, Julien Directeur de thèse	Directeur de recherche / Université Lyon 1 / CRCL
Meurette, Olivier Examineur	Maître de conférences / Université Lyon 1 / CRCL
Valcourt, Ulrich Examineur	Professeur des universités / Université de Lyon 1 / LBIT

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. X. PERROT

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme C. FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y.VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord remercier chaleureusement les membres de mon jury de thèse pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse.

A madame Pascale Louis-Plence et madame Anne Astier : je vous remercie d'avoir accepté d'être rapportrices de ce manuscrit. Je vous présente également toutes mes excuses pour la date très tardive à laquelle je vous rends ce manuscrit.

A madame Valérie Dardalhon : je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse en plus de mon jury de thèse.

A monsieur Olivier Meurette : merci pour votre présence en tant qu'examineur dans mon jury de thèse.

A monsieur Ulrich Valcourt : merci d'avoir accepté de rejoindre mon jury de thèse à la dernière minute.

Je tiens également à remercier monsieur Bertrand Dubois pour sa présence lors de mon comité de suivi de thèse.

Merci à Julien pour m'avoir accepté dans son équipe en Master 2 puis dans son laboratoire pendant ces 4 années de thèse. Merci pour ton soutien et tes conseils.

Aux membres de l'équipe : Ramdane, Ossama (ou Marmotte), Alex, Sarah, Chloé, Apos, Saïdi et Hector et Nicolas : merci pour votre bonne humeur et vos blagues, votre aide et vos conseils quand j'en ai eu besoin.

Ramdane, je ne te remercie vraiment pas pour m'avoir fait découvrir l'Algérino.... Mais c'était quand même super cool de t'avoir comme voisin de bureau !

Ossama : bon courage pour tes 2 (ou 3) ans restants ! Attention aux pièces avec une seule chaise.... ;)

Alex : toujours de bonne humeur, toujours prête à donner un coup de main ! C'était super de t'avoir dans l'équipe.

Sarah tu n'es plus dans l'équipe mais tu as tellement apprécié ton séjour parmi nous que tu es réintégré d'office :D

Chloé, it was great to have you in the team ! I hope you will get your job in Australia and you won't have to leave suunnyyyboyyyyyyy again. And Jared too :D

Apos, I wish you the best for the next steps!

Saïdi, merci pour ta bonne humeur et ta disponibilité constante. Comme l'a dit Alex tu es l'un des piliers du labo.

Nicolas : toujours souriant, toujours en train de blaguer. C'est l'histoire de 2 cac...

Merci à Ambroise et Olivier pour les sorties escalades ! Et merci au groupe de grimpeurs du mur de Lyon, Quentin (training for ever + riz lentilles thon !!!!!), Severin (training for ever too !!!!!), William (one hand handstand), Olivier & Olivier, Malko, Auriane, Thibault, et tous les autres...

A mes amis de lycée Alexandre & Alexandre, Nathan, Guillaume : merci pour vos encouragements et votre soutien.

Merci à Morgane pour son soutien pendant la première partie de ma thèse.

A mes Jean-Sébastien et Lorna Grellu, que je considère comme des membres de ma famille plus que des amis : merci pour votre soutien et vos encouragements ; et surtout merci pour votre intervention et votre hébergement lorsque j'en ai eu besoin. Vous allez me manquer, et j'espère que l'on continuera de se voir ! Je vous aime !

Merci à Flora pour sa présence, ses encouragements, son soutien quotidien et son aide durant toute cette dernière année de thèse, et surtout durant la rédaction ! J'espère vraiment que l'on pourra partir tous les 2 dans quelques mois. TFE3D.

Enfin, merci à ma famille, mon frère Antoine et ma sœur Laura, mes grands-parents qui m'ont encouragé tout le long de cette thèse, mais surtout merci à mes parents pour tout ce qu'ils m'ont apporté. Je vous aime !

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES & TABLEAUX	1
LISTE DES ABBREVIATIONS	2
INTRODUCTION.....	5
I. Organisation générale de l'intestin.....	6
II. L'épithélium intestinal	8
1. Sélectivité et perméabilité de l'épithélium intestinal.....	8
2. Structure de l'épithélium intestinal	9
3. Les différents types de cellules épithéliales intestinales	11
i. Les entérocytes.....	12
ii. Les cellules de gobelets et le mucus.....	12
iii. Les cellules entéroendocrines.....	13
iv. Les cellules tuft	14
v. Les cellules de Paneth et les peptides anti-microbiens.....	14
vi. Les cellules M et les plaques de peyers.....	16
III. Le microbiote intestinal.....	17
1. Colonisation et variation au cours de la vie	17
2. Répartition des taxons au sein de l'intestin	18
3. Impact du microbiote sur l'organisme.....	20
i. Fonctions digestives.....	21
ii. Interaction avec le système immunitaire	22
iii. Fonction de protection envers les micro-organismes pathogènes	22
iv. Formation du système nerveux.....	23
v. Implication du microbiote dans les pathologies inflammatoires intestinales.....	24
IV. Les cellules hématopoïétiques impliquées dans l'immunité intestinale.....	26
1. Les Lymphocytes intra-épithéliaux	26
i. Les IEL naturels	27
ii. Les IELs induits	27
2. Les cellules dendritiques	28
i. Les cellules dendritiques CX3CR1	28
ii. Les cellules dendritiques CD103 ⁺	29
iii. Les cellules dendritiques CD103 ⁻	29
3. Les cellules innées lymphocytaires	29
i. Les cellules innées lymphocytaires de type 1 et les cellules Natural killer	30
ii. Les cellules innées lymphocytaires de type 2	30

iii.	Les cellules innées lymphocytaires de type 3	30
a.	Rôle de l'IL-17A.....	30
b.	Rôle de l'IL-22	32
4.	Les lymphocytes B et les IgA.....	33
5.	Les lymphocytes $\gamma\delta$	34
6.	Les lymphocytes T $\alpha\beta$	35
i.	Les lymphocytes T CD8	35
ii.	Les lymphocytes T $\alpha\beta$ CD4.....	35
a.	Les lymphocytes T helper 1.....	37
b.	Les lymphocytes T régulateurs	40
V.	Les lymphocytes Th17	41
1.	Mécanismes moléculaires de la différenciation Th17.....	41
i.	Initiation.....	41
ii.	Amplification de la population de Th17.....	42
iii.	Stabilisation de la population de Th17	44
2.	Autres acteurs impliqués dans la différenciation Th17.....	46
3.	L'importance du microbiote dans la différenciation Th17.....	48
4.	Plasticité des Th17.....	51
5.	Pouvoir pathogénique des Th17	53
VI.	Le Transforming Growth Factor β	55
1.	Rôle du TGF- β sur les cellules du système immunitaire	56
2.	Sécrétion et activation du TGF- β	57
i.	Sécrétion sous forme inactive	57
ii.	Activation du TGF- β	59
3.	Signalisation et régulation du TGF- β	59
i.	Voie canonique	60
ii.	Voie non canonique.....	61
iii.	Régulation de la signalisation du TGF- β	62
VII.	Problématique : Implication du TGF- β dans la biologie des Th17	62
RESULTATS		64
I.	Article 1 : Cellular stress in the context of an inflammatory environment supports TGF- β independent T Helper-17 differentiation.....	65
II.	Article 2 : Transforming growth factor beta signaling is the guardian of the stability of differentiated Th17 cells <i>in vivo</i>	88
DISCUSSION		124
I.	Rôle du TGF- β dans la différenciation des Th17	125
II.	Rôle du TGF- β dans la stabilité des Th17	126

1. L'importance des voies de signalisation non canonique du TGF- β dans le maintien du phénotype Th17	127
2. Les molécules signatures des Th17 contrôlées par le TGF- β	128
3. Source de TGF- β participant à la stabilité des Th17	129
4. L'accumulation de Th17 dans l'intestin : un phénomène multiparamétrique ?.....	130
i. TGF- β et FAS	130
ii. Recrutement de Th17 depuis la périphérie selon l'axe CCL20/CCR6	130
5. Th17 et microbiote	131
6. TGF- β et stabilité du lineage Th17	132
7. L'IFN- γ vs IL-17A dans l'inflammation intestinale	133
8. Cible thérapeutique.....	134
III. Conclusion générale	134
BIBLIOGRAPHIE	136

LISTE DES FIGURES & TABLEAUX

Figure 1 : Représentation des différents segments de l'intestin grêle et du côlon.	6
Figure 2 : Représentation des différentes couches histologiques de l'intestin.....	7
Figure 3 : Photo prise au microscope électronique de l'épithélium de l'intestin grêle et du côlon (Barker, 2014).	10
Figure 4 : Schéma représentant le renouvellement de l'épithélium intestinal dans l'intestin grêle et le côlon (Barker, 2014).....	11
Figure 5 : Évolution du microbiote au cours de la vie (Ottman et al., 2012).....	18
Figure 6 : Répartition des différents taxons au sein de l'intestin grêle et du côlon.	19
Figure 7 : Photo représentant une SFB adhérant à une cellule épithéliales murine (microscope électronique à balayage) (Ivanov et al., 2009a).....	20
Figure 8 : Représentation des effets du microbiote au sein de l'organisme.....	21
Figure 9 : Effets de l'IL-17A dans l'intestin.	32
Figure 10 : Représentation de la différenciation des sous-populations de CD4 et leurs fonctions.	36
Figure 11 : Effets de l'IFN- γ	37
Figure 12 : Représentation des mécanismes moléculaires de la différenciation des Th0 en Th1.	39
Figure 13 : Initiation de la différenciation en Th17.	42
Figure 14 : Amplification de la nouvelle population de Th17 de façon IL-21 dépendante. ...	43
Figure 15 : Stabilisation par l'IL-23 de la nouvelle population de Th17.....	44
Figure 16 : Schéma représentant l'ensemble des acteurs intervenant dans la différenciation Th17(Muranski and Restifo, 2013).	46
Figure 17 : Génération de Th17 en réponse au microbiote intestinal.	50
Figure 18 : Plasticité des TH17 en fonction de leur environnement.	53
Figure 19 : Effet du TGF- β sur les différentes cellules du système immunitaire.	57
Figure 20 : Synthèse et sécrétion du TGF- β	58
Figure 21 : Signalisation des voies canonique (gauche) et non canonique (droite) de la signalisation du TGF- β	60
Figure 22 : Schéma bilan des travaux issus de l'article 1 (Brucklacher-Waldert et al., 2017).	125
Figure 23 : Schéma bilan des travaux issus de l'article 2.	127
Tableau 1 : Présentation des différents sous-types de cellules épithéliales intestinales, leurs localisation, marqueurs et fonctions. FT : facteur de transcription. ND : Non déterminé.	12
Tableau 2 : Les différentes familles de PAM chez la souris et leurs mécanismes d'actions. Adapté de Muniz et al, 2012, Gallo et al, 2012.....	15
Tableau 3 : Altération de la composition du microbiote chez les patients souffrant de MICI. Adapté de (Zuo and Ng, 2018).....	25
Tableau 4 : Listes des différents types de IELs et leurs fonctions.....	28
Tableau 5 : Autres souches que SFB adhérentes à l'épithélium et induisant la génération de Th17 (Atarashi et al., 2015).....	50

LISTE DES ABBREVIATIONS

A

AhR : Aryl hydrocarbon Receptor
APRIL : A Proliferation Inducing Ligand
ATP : Adénosine-Triphosphate

B

BATF : B-Cell-Activating Transcription
Factor
BAFF : B cell activating factor
Bcl-2 : B-cell lymphoma 2
Bcl-6 : B cell lymphoma 6

C

CCL235 : Chemokine Ligand 25
CCR : Cancer Colorectal
CCR9 : Chemokine Receptor 9
CD : Crohn Disease
CD4 : Cluster of Differentiation 4
CG : Centre Germinatif
Cellule M : Cellule Microfold
CMH-I : Complexe majeur
d'histocompatibilité-I
CNS : Séquences non codantes conservées
CRC : Cancer du Colon
CX3CR1 : C-X3-C Motif Chemokine
Receptor 1
CXCL-9 : C-X-C Motif Chemokine Ligand
9
Cxxc1 : Cxxc finger protein1

D

DAP12 : DNAX-activation protein 12
DSS : Dextran Sulfate Sodium

E

EAE : Experimental Autoimmune
Encephalomyelitis
EAF : Epithélium Associé au Follicule

F

FGF2 : Fibroblast Growth Factor 2
FICZ : 6 formylindolo[3,2-b]carbazole
FISH : Fluorescence In Situ Hybridization
FoxP3 : Forkhead box P3

G

G2P : Glycoprotéine 2
GM-CSF : Granulocyte-Macrophage
Colony-Stimulating Factor

H

HIF1- α : Hypoxia-Inducible Factor 1-Alpha

I

IEL : Lymphocyte intra-épithéliaux
intestinaux
IFN- γ : Interféron gamma
IgA : Immunoglobuline de type A
IL : Interleukin

ILC : Cellules Innées Lymphocytaires

IRF-4 : Interferon Regulatory Factor 4

Itgβ8 : intégrine bêta-8

L

LAP : Latence Associated Protein

LB : Lymphocyte B

LGR5 : Leucine Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor 5

LT : Lymphocyte T

LTBP : Latence TGF-β Binding Protein

M

MICI : Maladies Inflammatoires Chronique de l'Intestin

Muc : Mucines

MyD88 : Myeloid Differentiation Primary Response 88

N

NK : Natural Killer

NFATc : Nuclear Factor of Activated T cells

P

PAM : Peptides Anti-microbiens

PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern

pDC : cellules dendritiques plasmacytoïdes

pH : potentiel Hydrogène

pTreg : Lymphocyte T régulateur périphérique

R

RA : acide rétinoïque

RAG : Recombination Activating Genes

Reg3γ : Regenerating islet-derived protein 3 gamma

RISC : RNA-inducer silencing complex

ROR-γt : retinoic acid receptor-related orphan nuclear receptor gamma

ROS : Reactive Oxygen Species

S

SCR3 : Stéroïdes Receptor Coactivator-3

SFB : Bactéries Segmentées Filamenteuses

shARN : short hairpin Acide Ribonucléique

SKG1 : Serum Glucocorticoïd Kinase 1

SOCS3 : Suppressor of Cytokine Signaling 3

STAT3 : Signal Transducer And Activator Of Transcription 3

T

TAL : Thymus Leukemia Antigen

tbx21 : T-Box Transcription Factor 21

TCR : T-Cell Receptor

Tfh : Lymphocytes T CD4 follicular helper

TGF-β : Transforming Growth Factor beta

Th : Lymphocyte T helper

TLR : Toll-Like Receptors

TNF-α : Tumor Necrosis Factor alpha

Treg : Lymphocyte T régulateur

TRIM33 : Tripartite Motif Containing 33

tTregs : Lymphocyte T régulateur thymique

U

UC : Colite Ulcération

V

V β 14 : chaîne Variable β numéro 14

VEGF : Vascular Endothelial Growth
Factor

W

WT : Wild-Type

X

XBP1 : X box binding protein-1

Y

YAP : Yes Associated Protein

YFP : Yellow Fluorescent Protein

Z

ZO-1 : Zona Occludens 1

ZONAB : ZO-1-Associated Nucleic Acid-
Binding

INTRODUCTION

I. Organisation générale de l'intestin

Chez les mammifères, l'intestin est composé de l'intestin grêle et du côlon. L'intestin grêle mesure environ 6 mètres chez l'homme et 20 cm chez la souris, et est divisé en 3 parties : le duodénum, le jéjunum et l'iléon (**Figure 1**). Le duodénum, commence juste après l'estomac et reçoit le chyme, qui correspond aux aliments partiellement digérés. Le duodénum a un rôle majeur dans la fin de la digestion chimique du chyme, en vue de l'absorption optimale des nutriments qui se fait principalement dans le jéjunum. Enfin, l'iléon permet l'absorption des nutriments restants, et fait la liaison avec le côlon.

Le côlon humain mesure environ 2 mètres et celui de la souris 6 cm. Les différents segments qui le composent sont le caecum, le côlon ascendant, le côlon transverse, le côlon descendant et enfin le rectum puis l'anus (**Figure 1**). Les bactéries présentes dans le caecum transforment les restes du chyme en fèces. Les autres segments du côlon absorbent l'eau et les vitamines, qui ne sont pas absorbés au niveau de l'intestin grêle. Enfin l'anus permet l'excrétion des fèces. Chez les rongeurs comme la souris le caecum est très développé et le côlon n'est pas segmenté.

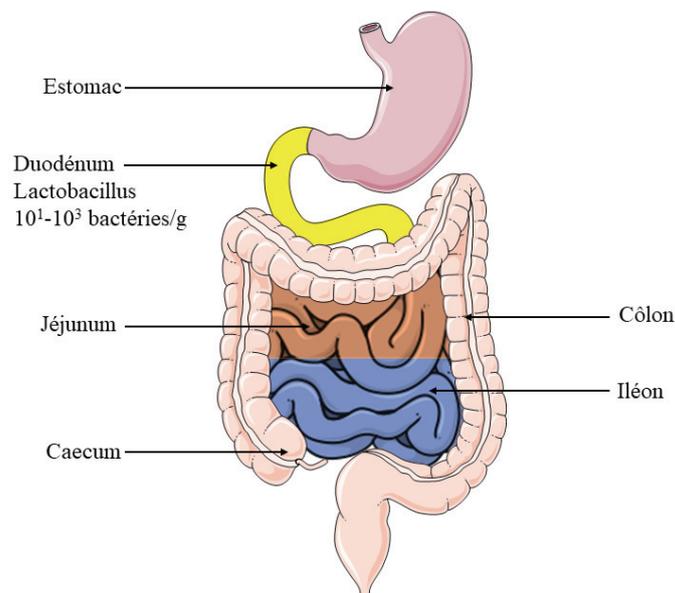


Figure 1 : Représentation des différents segments de l'intestin grêle et du côlon.

L'intestin grêle et le côlon partagent la même structure histologique, constituée de 4 couches individualisées : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculaire et la séreuse (**Figure 2**).

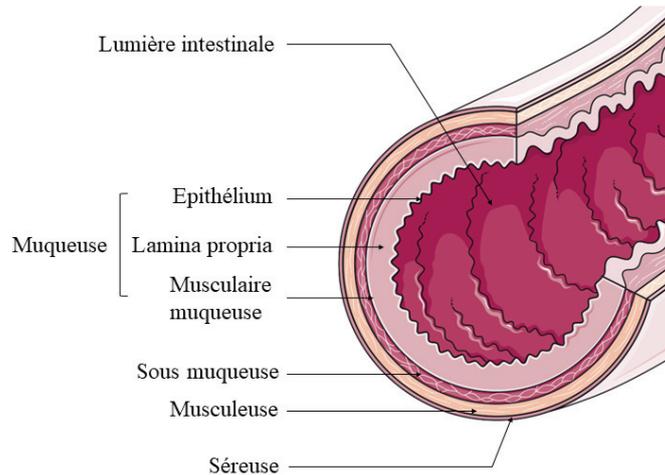


Figure 2 : Représentation des différentes couches histologiques de l'intestin.

La muqueuse se divise en 3 parties. La première est l'épithélium, en contact direct avec le milieu extérieur. L'épithélium permet l'absorption des nutriments présents dans la lumière intestinale tout en faisant office de barrière imperméable à la multitude de micro-organismes qui colonisent l'intestin. Juste derrière se trouve la lamina propria, un tissu conjonctif très riche en cellules immunitaires qui interviennent dans le contrôle de la charge microbienne et l'élimination des micro-organismes pathogènes présents dans l'intestin. Enfin la muscularis mucosæ (musculaire muqueuse) est faite de muscles lisses dont les contractions participent à l'avancée du contenu dans la lumière intestinale jusqu'à son excrétion au niveau de l'anus.

Sous la muqueuse se trouve la sous-muqueuse. C'est un ensemble de tissu conjonctif très riche en vaisseaux sanguins, qui sont responsables de l'alimentation en oxygène des cellules de la muqueuse, mais aussi de la distribution des nutriments au reste de l'organisme. Dans la muqueuse se trouvent aussi des nerfs et des vaisseaux lymphatiques, permettant l'innervation du système parasympathique principalement et le déplacement des cellules immunitaires entre la lamina propria et les ganglions mésentériques drainants l'intestin.

La troisième couche, appelée musculaire est faite de cellules musculaires lisses en couches épaisses. Les contractions de ces muscles servent aussi à la descente du contenu de l'intestin jusqu'à l'anus ou ils sont excrétés.

Enfin, la séreuse sert d'enveloppe aux éléments de l'intestin.

II. L'épithélium intestinal

1. Sélectivité et imperméabilité de l'épithélium intestinal

L'épithélium intestinal doit permettre le passage depuis la lumière intestinale des nutriments et de l'eau, tout en restant imperméable aux micro-organismes. Cette sélectivité de passage est assurée par les protéines de la famille des occludines, des claudines, et des zonula occludens qui forment les jonctions serrées. Les jonctions serrées agissent aussi de façon à maintenir un contact très fort entre les cellules épithéliales. D'autres protéines comme les desmosomes et les E-cadhérines interviennent afin de renforcer les interactions entre les cellules et maintenir l'imperméabilité de l'épithélium envers les micro-organismes (Garcia et al., 2018; Suzuki, 2013; Vancamelbeke and Vermeire, 2017). Les jonctions serrées ont également un rôle important dans le contrôle de la prolifération des cellules épithéliales en séquestrant des facteurs de transcriptions au niveau de la membrane plasmique, ce qui les empêche d'activer la prolifération et l'expansion de cellules épithéliales. Ainsi, les protéines ZO-1 (Zona Occludens 1) et ZO-2 lient les facteurs de transcriptions ZONAB (ZO-1-Associated Nucleic Acid-Binding) et YAP (Yes Associated Protein) ; et les E-cadhérines lient la β -caténine, un facteur de transcription appartenant à la voie Wnt.

Des perturbations au sein des jonctions serrées entraînent une augmentation de la perméabilité intestinale qui favorise l'entrée de bactéries au sein de l'organisme qui peut conduire à l'activation du système immunitaire et à la mise en place d'une inflammation pouvant endommager les tissus. Un grand nombre de pathologies inflammatoires de l'intestin (maladie de Crohn, colite ulcéreuse, maladie cœliaque...) sont associées à une désorganisation des jonctions serrées ainsi qu'à une perméabilité intestinale augmentée (Vancamelbeke and

Vermeire, 2017). La perturbation des jonctions serrées entraîne aussi la libération de ces facteurs de transcriptions séquestrés à la membrane plasmique, risquant de conduire à une prolifération anormale des cellules épithéliales intestinales et augmentant le risque d'apparition de cancer.

Dans le cas du cancer du côlon (CRC), des mutations ou la perte du gène *apc*, qui code pour une protéine impliquée dans la dégradation de la β -caténine, sont un des premiers éléments du processus de transformation des cellules épithéliales. Environ 80% des patients atteints de CRC ont une mutation du gène *apc* (Garcia et al., 2018; Kwong and Dove, 2009).

Des facteurs, tels que les cytokines peuvent renforcer (TGF- β , IL-17...) ou bien perturber (IFN- γ , TNF- α , IL-1 β ...) les protéines impliquées dans le maintien de la perméabilité intestinale. Plusieurs facteurs externes (alcool, tabac, stress...) et certaines espèces de micro-organismes (*Vibrio cholerae*, *Clostridium perfringens*, les souches entéro-pathogènes et entéro-hémorragiques d'*Escherichia coli*...) sont également responsables d'une augmentation de la perméabilité intestinale via une perturbation des jonctions serrées (Suzuki, 2013).

2. Structure de l'épithélium intestinal

Afin d'augmenter sa surface d'échange avec la lumière intestinale et ainsi permettre une meilleure absorption des nutriments, l'épithélium de l'intestin grêle est organisé selon une structure crypte-villosité. Au sein du côlon l'absorption, hormis pour l'eau, est moins importante et les villosités disparaissent, ne laissant que les cryptes (**Figure 3**).

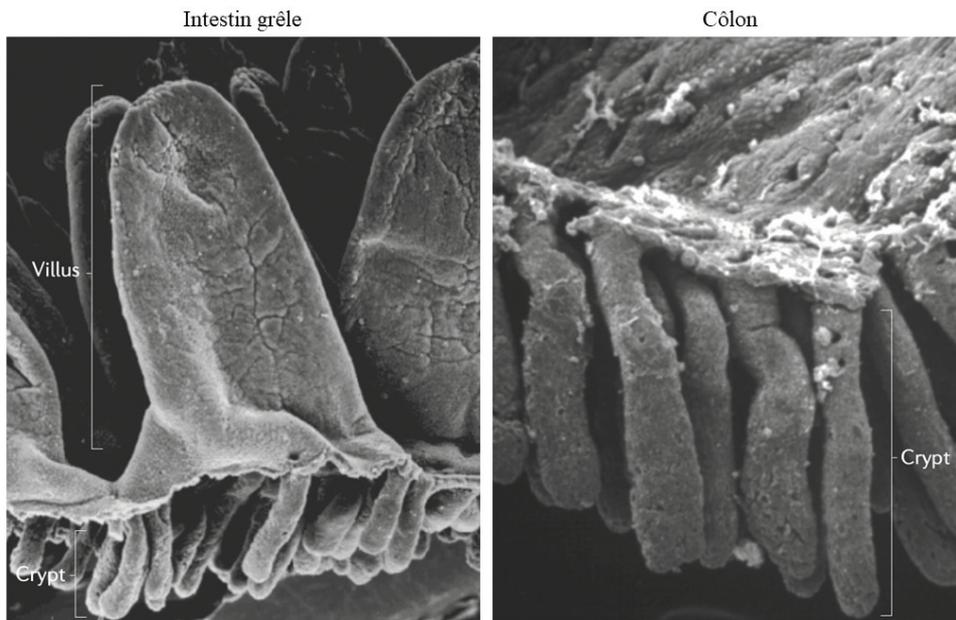


Figure 3 : Photo prise au microscope électronique de l'épithélium de l'intestin grêle et du côlon (Barker, 2014).

En raison du pH (potentiel Hydrogène) fortement acide, des enzymes digestives très actives et de la charge microbienne présente dans la lumière intestinale, plus de 300 millions de cellules épithéliales meurent et doivent être remplacé quotidiennement (Barker, 2014). Un défaut de remplacement des cellules épithéliales peut entraîner une augmentation de la perméabilité intestinale et donc donner lieu à des pathologies inflammatoires de l'intestin. Les cellules souches responsables du renouvellement de l'épithélium sont localisées au fond des cryptes, et sont caractérisées par l'expression de LGR5 (Leucine Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor 5).

Les cellules souches migrent continuellement de la base de la crypte jusqu'au sommet de la villosité. Au cours de leur migration, les cellules dérivées des cellules souches se différencient d'abord en cellules transitoires ayant un fort taux de prolifération ce qui leur permet de remplacer l'ensemble des cellules mortes; elles peuvent se différencier en l'un des 6 types d'entérocytes matures constituant l'épithélium (entérocytes, cellules de gobelet, cellules entéroendocrines, cellules tufts, cellules de Paneth (présentent uniquement dans les cryptes de l'intestin grêle) et cellules Microfold (cellules M) présentes dans les plaques de Peyer) (Kong et al., 2018). Le renouvellement complet de l'épithélium intestinal se fait en 4 à 5 jours (**Figure 4**).

L'apoptose en haut des villosités ou des cryptes (côlon) favorise le renouvellement des cellules souches. Ainsi, en cas de forte apoptose lors d'inflammation, la vitesse de renouvellement est accrue, conduisant à une hyperplasie des villosités ou des inter-digitations des cryptes

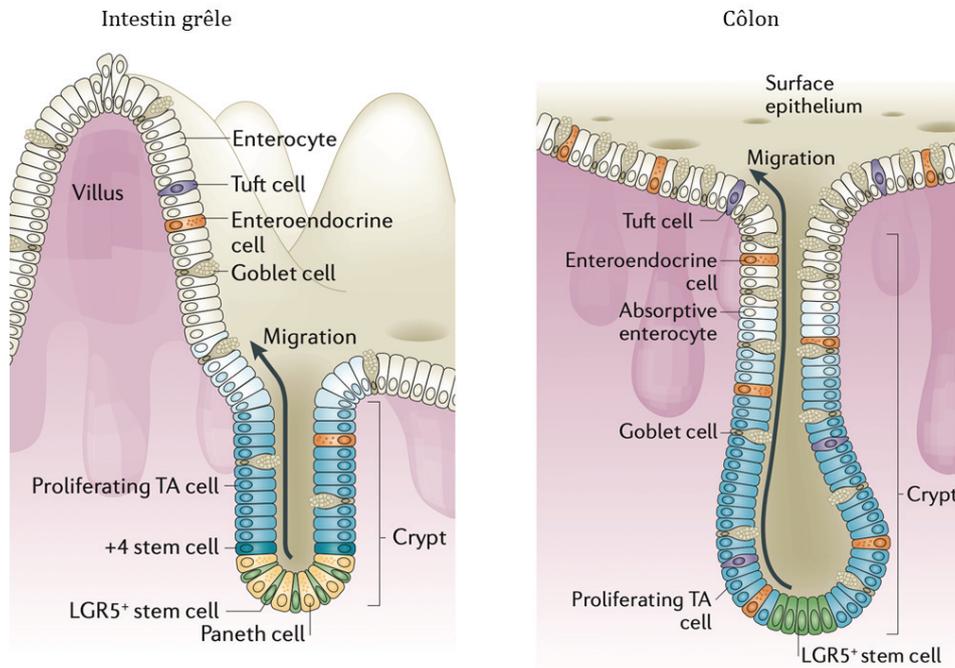


Figure 4 : Schéma représentant le renouvellement de l'épithélium intestinal dans l'intestin grêle et le côlon (Barker, 2014).

3. Les différents types de cellules épithéliales intestinales

Le rôle des différentes cellules épithéliales intestinales est multiple (**Tableau 1**). Il inclut l'absorption des nutriments, la protection et le contrôle de la charge bactérienne dans la lumière intestinale, mais aussi la présentation d'antigènes issus du microbiote aux cellules du système immunitaire et la protection contre les parasites et autres micro-organismes pathogènes.

Cellules	Localisation	Marqueur	Fonctions
Entérocytes	Villosités (intestin grêle et côlon)	ND	Absorption des nutriments, eau, minéraux et vitamines
Cellules de gobelets	Intestin grêle et côlon	Klf4 (FT)	Production de mucus Expulsion des parasites extracellulaires
Cellules entéroendocrines	Cryptes et villosités (intestin grêle et côlon)	Ngn3 (FT)	Production d'hormones régulant la digestion
Cellules tufts	Cryptes et villosités (intestin grêle et côlon)	Dclk1, pou2f3 (FT)	Sensation du contenu de la lumière intestinale Lutte contre les parasites extracellulaires
Cellules de Paneth	Cryptes (intestin grêle)	Sox9 (FT)	Production de peptides anti- microbiens
Cellules M	Plaque de Peyer (intestin grêle)	Spi-B (FT)	Transcytose d'antigènes bactériens et alimentaires

Tableau 1 : Présentation des différents sous-types de cellules épithéliales intestinales, leurs localisation, marqueurs et fonctions. FT : facteur de transcription. ND : Non déterminé.

i. Les entérocytes

Ce sont les cellules les plus représentées parmi les cellules épithéliales intestinales. Elles sont chargées de l'assimilation des nutriments. Les entérocytes permettent également le passage d'immunoglobulines de type A vers la lumière intestinale (Kong et al., 2018).

ii. Les cellules de gobelets et le mucus

Les cellules de gobelets sont situées aussi bien au sein des cryptes qu'au niveau des villosités. Elles produisent du mucus, servant de protection contre les micro-organismes en les empêchant d'arriver au contact des cellules épithéliales intestinales ; mucus qui favorise aussi la fluidité du transit. Ces cellules sont bien plus nombreuses dans le côlon que dans l'intestin grêle, où le besoin en mucus est plus grand, en raison de la plus grande quantité de micro-organismes présents et de la présence de matière fécale solide (Kong et al., 2018).

Une étude publiée dans Nature en 2012 suggère que les cellules de gobelet permettent la transcytose d'antigènes de la lumière intestinale aux cellules dendritiques CD103⁺ CX3CR1⁻

(McDole et al., 2012), connues pour induire des lymphocytes T régulateurs (Tregs) et maintenir la tolérance du système immunitaire vis-à-vis du microbiote.

Le mucus est un assemblage de glycoprotéines appelées mucines (Muc). Les mucines peuvent être membranaires (Muc1, Muc4, Muc13 et Muc16) ou sécrétées (Muc2, Muc5AC, Muc5B et Muc6) (Cornick et al., 2015). Le mucus isole l'épithélium intestinal de ce qui pourrait le dégrader et altérer ses fonctions d'absorption et de barrière. Au niveau du côlon on observe 2 couches distinctes de mucus : la première, proche de l'épithélium est fine mais dense et imperméable aux bactéries ; la seconde couche est plus large mais lâche (Johansson et al., 2008). Chez des souris *muc2^{-/-}* l'absence d'un élément de la trame du mucus entraîne le contact direct des bactéries avec l'épithélium, ce qui se traduit par une forte inflammation intestinale (Johansson et al., 2008) pouvant mener au développement de cancer (Van der Sluis et al., 2006; Velcich, 2002). Dans l'intestin grêle, le mucus protège également les cellules épithéliales intestinales des enzymes digestives et facilite le passage du chyme jusqu'au côlon (Kong et al., 2018).

Plusieurs cytokines comme l'IL-4 (Interleukin 4), l'IL-6, l'IL-13, le TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) et l'IL-1 β favorisent une production de mucus (Cornick et al., 2015). Dans un modèle d'inflammation intestinale il a été montré que l'IL-22 était également un puissant inducteur de la production de mucus, via l'activation de la voie STAT3 (Signal Transducer And Activator Of Transcription 3) dans les cellules de gobelets (Sugimoto et al., 2008).

De façon intéressante, le microbiote est aussi impliqué dans la production de mucus. En effet, des souris axéniques ont une couche de mucus plus fine que des souris avec un microbiote complet, indiquant un rôle du microbiote dans le contrôle de la production de mucus (Cornick et al., 2015). Certains métabolites issus de l'action des bactéries comme le butyrate peuvent aussi induire une production de mucus selon un mécanisme qui reste mal connu (Burgervan Paassen et al., 2009).

iii. Les cellules entéroendocrines

Ces cellules sont situées à la fois au niveau des cryptes et des villosités. Elles contribuent principalement à la digestion en produisant un grand nombre d'hormones (gastrine, cholecystokinine, neurotensine, ghrelina...) qui entraînent la sécrétion d'enzymes, d'acides

biliaires, et pancréatiques aidant à la digestion et à l'absorption des nutriments (Gribble and Reimann, 2016).

iv. Les cellules tuft

Les cellules tufts sont présentes au sein des cryptes et des villosités de l'intestin grêle et du côlon. En conditions homéostatiques ces cellules sont très peu nombreuses. En cas d'infection par un parasite, tel que *Nippostrongylus brasiliensis*, leurs nombres est accrues et elles produisent de l'IL-4, de l'IL-13 et de l'IL-25 afin d'initier une réponse de type lymphocyte T helper 2 (Th2). Un défaut de production d'IL-4 par les cellules tuft entraîne une réponse de type Th2 tardive, soulignant l'importance des cellules tuft dans la mise en place de ces réponses immunitaires (Gerbe et al., 2016).

v. Les cellules de Paneth et les peptides anti-microbiens

Ces cellules produisent des peptides antimicrobiens (PAM) après activation de Toll-Like Receptors (TLR). Les cellules de Paneth sont présentes au sein des cryptes de l'intestin grêle ; et sont les seules cellules épithéliales intestinales à migrer vers le bas des cryptes après différenciation ce qui leur permet de vivre plus longtemps (environ 6 semaines) que les autres cellules épithéliales intestinales.

Les PAMS sont des peptides toxiques pour le microbiote, et qui aident à le tenir compartimenté dans la lumière intestinale. Il existe 9 familles de PAMs décrites dans le **Tableau 2**. Les PAMs s'accumulent dans le mucus y compris du côlon ce qui permet une meilleure protection de l'épithélium. Leur production par les cellules de Paneth est principalement contrôlée par les TLR. Les TLR sont des récepteurs qui reconnaissent spécifiquement les « Pathogen Associated Molecular Pattern » (PAMPs) exprimés par les micro-organismes. La majorité des TLR utilisent la voie de signalisation MyD88 (Myeloid Differentiation Primary Response 88).

Des souris déficientes pour MyD88 ont également une déficience en Reg3 γ (Regenerating islet-derived protein 3 gamma), ce qui entraîne des difficulté à contrôler une infection par *Lysteria Monocytogenes* (Brandl et al., 2007). Certains PAMs, comme le lysozyme, la phospholipase A2 et les β -défensines sont produits chez des souris axéniques, ce qui indique que le microbiote n'est pas requis pour la production de ces PAMs. Enfin, des

cytokines comme l'IL-17A, IL-17F et l'IL-22 favorisent la production de PAMs (Ishigame et al., 2009; Zheng et al., 2008).

Famille	Protéines	Mécanisme d'action	Cible
β -défensines	β -défensine 1 à 5	Rupture de la membrane	Bactéries Gram+ Bactéries Gram - Champignons
Cathélicidines	CRAMP	Rupture de la membrane et inhibition de la néosynthèse de la paroi	Bactéries Gram+ Bactéries Gram - Champignons
Lectines de type C	Reg3 β , Reg3 γ	Formation de pore dans la membrane (Reg3 β) / Rupture de la paroi (Reg3 γ)	Reg 3 β : bactéries Gram - Reg3 γ : bactéries Gram +
Cryptdines (α -défensine)	cryptdines 1 à 19	Rupture de la membrane	Bactéries Gram+ Bactéries Gram - Champignons
Galectines	Gal3, 4, 8	Liaison au lipopolysaccharide	Bactéries Gram+ Bactéries Gram -
Lipocalines	Lipocaline 2	Liaison au sidérophores	Escherichia Coli
Lysozymes	Lysozyme	Digestion du peptidoglycane	Bactéries Gram+
Phospholipase A2	Phospholipase 2	Digestion des phospholipides de la membranes	Bactéries Gram+
RNAases	ANG4, RNAse 7	Non connu	Bactéries Gram+ Bactéries Gram - Champignons Virus

Tableau 2 : Les différentes familles de PAM chez la souris et leurs mécanismes d'actions.

Adapté de Muniz et al, 2012, Gallo et al, 2012.

vi. Les cellules M et les plaques de peyers.

Les cellules M sont uniquement présentes dans des plaques de Peyer, des structures en forme de dôme réparties aléatoirement le long de l'intestin grêle.

Les plaques de Peyer sont caractérisées par un épithélium contenant un type de cellule particulier : les cellules M, ayant une forte activité de transcytose. Les cellules M laissent passer des antigènes alimentaires ou bactériens depuis la lumière intestinale dans la plaque de Peyer où des cellules dendritiques vont les présenter aux lymphocytes T présents. Dépourvues de vaisseaux lymphatiques afférents, leur seule source d'antigènes provient donc directement de la lumière intestinale. Cela en fait des sites clés pour orchestrer les réponses immunitaires à la fois contre des micro-organismes pathogènes ; mais également pour induire une tolérance aux microorganismes commensaux et aux antigènes alimentaires. Les plaques de Peyer sont aussi les principaux sites de production d'immunoglobuline de type A (IgA).

Les plaques de Peyer sont divisées en 3 zones : la zone folliculaire qui contient les centres germinatifs (CG), très riche en lymphocytes B ; la zone inter-folliculaire entourée par le dôme sub-épithélial qui contient des LB, LT, macrophages et cellules dendritiques ; et finalement l'épithélium associé au follicule (EAF) qui remplace l'épithélium classique et permet la transcytose d'antigène.

L'EAF contient environ 10 à 15% de cellules M (Ohno, 2016), dont le nombre semble dépendant du microbiote. Comparé au reste de l'épithélium intestinal, l'EAF comprend moins de cellules de gobelet et de cellules de Paneths, favorisant un contact des micro-organismes avec les cellules M. Il existe plusieurs récepteurs impliqués dans la transcytose effectuée par les cellules M :

- La glycoprotéine 2 (G2P), est spécifique des cellules M et reconnaît des composants des pilis de type I exprimés à la surface des bactéries Gram-négatives comme *Escherichia Coli* ou *Salmonella Enterica* (Hase et al., 2009).

- Le récepteur Dectin-1 permet le passage de complexes IgA/antigènes depuis la lumière intestinale vers la poche des cellules M.

- La protéine prion cellulaire peut servir de point d'entrée à *Brucella Arbotus* (Nakato et al., 2012) en interagissant avec les cellules M, et l'intégrine- β -1 exprimée à la fois sur le pôle apical et basal des cellules M semble être utilisé par *Yersinia Pseudotuberculosis* (Clark et al., 1998).

III. Le microbiote intestinal

L'ensemble de l'organisme des mammifères est colonisé par un ensemble de 500 à 1000 espèces de micro-organismes différents, principalement des bactéries, mais aussi des virus et des champignons. Leur localisation est principalement au niveau du tractus digestif, de la peau, du vagin, et des poumons.

L'ensemble de ces micro-organismes forme le microbiote, et la majorité des espèces qui le composent ont une relation bénéfique avec l'organisme, sous forme de commensalisme. Le microbiote est essentiel au bon fonctionnement de l'organisme mais est aussi une source évidente d'antigènes exogènes capable d'induire une activation du système immunitaire

1. Colonisation et variation au cours de la vie

Pendant la grossesse le fœtus est considéré comme exempt de micro-organisme. La colonisation a lieu au moment de la naissance. Lors d'un accouchement par voie basse le nouveau-né est colonisé par le microbiote vaginal, c'est-à-dire principalement des *Lactobacillus*. Lors d'une césarienne la colonisation sera plus faible et ne comprendra que les micro-organismes de l'épiderme (Neu and Rushing, 2011).

La composition du microbiote va ensuite s'enrichir et varier au cours avec l'âge (**Figure 5**). Le microbiote des jeunes bébés contient beaucoup de *Bifidobacterium longum*, des bactéries impliquées dans la fermentation du lait (Yatsunenko et al., 2012). La proportion de ces bactéries diminue au cours des années et le microbiote des personnes âgées est principalement composé de *Firmicutes* (Ottman et al., 2012).

Le régime alimentaire a également un impact important sur le microbiote. Un régime riche en protéines animales et graisses saturées est associé à des bactéries de type *Bacteroides* ; tandis qu'un régime riche en carbohydrates et sucres simple favorise le développement des *Prevotella* (Wu et al., 2011). Chez la souris, le passage d'une alimentation normale à une alimentation riche en graisse entraîne la diminution des *Bacteroidetes* et l'augmentation des *Firmicutes* et des *Proteobacteria* (Hildebrandt et al., 2009), espèces associées à l'obésité.

Les traitements antibiotiques affectent grandement le microbiote. L'élimination brutale de certaines souches favorise la croissance et l'expansion d'espèces résistantes aux antibiotiques. Ces déséquilibres de composition du microbiote appelés dysbiose, peuvent donner un avantage à des bactéries pathogènes telles que *Salmonella typhimurium*, *Clostridium difficile* ou *Citrobacter rodentium* (Ferreira et al., 2014).

Les dysbioses causées par la prise d'antibiotiques affectent durablement la composition du microbiote intestinal et peuvent influencer le devenir de pathologies inflammatoires intestinales (Keeney et al., 2014).

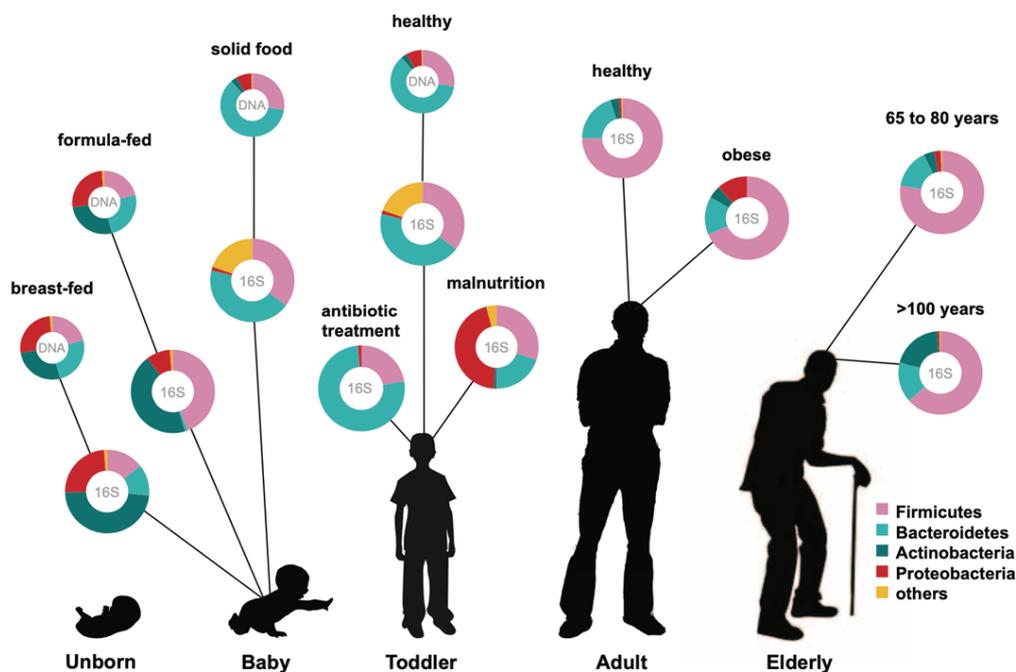


Figure 5 : Évolution du microbiote au cours de la vie (Ottman et al., 2012).

La composition du microbiote varie tout au long de la vie, influencée par des facteurs tels que l'alimentation ou la prise d'antibiotiques.

2. Répartition des taxons au sein de l'intestin

Les principaux micro-organismes colonisant l'intestin sont principalement des *Firmicutes* et des *Bacteroidetes*. La composition des bactéries intestinales ainsi que sa richesse (diversité et quantité) varient selon le segment intestinal (**Figure 6**).

L'intestin grêle est un environnement riche en nutriments. Les espèces qui le colonisent sont principalement des souches anaérobies facultatives, se divisant rapidement et capable de métaboliser les carbohydrates simples. Cependant l'intestin grêle est aussi très riche en PAMs et en acides.

Le duodénum est la partie de l'intestin grêle où la quantité (environ 10^1 à 10^3 bactéries/gramme de contenu) et la diversité (principalement des *Lactobacillaceae*) sont moindres.

Le jéjunum est moins riche en acides biliaires, et donc plus propice à la colonisation par les micro-organismes (environ 10^4 à 10^5 bactéries/gramme de contenu). Les principales espèces qui s'y développent sont des *Lactobacillaceae* et des *Streptococcaceae*.

Enfin, l'iléon est le segment de l'intestin grêle où il y a le plus de bactéries (10^8 bactéries/gramme de contenu). On y trouve les bactéries segmentées filamenteuses (SFB) appartenant à la famille des *Clostridiaceae*. Les SFB ont la capacité d'adhérer aux cellules épithéliales afin de se développer malgré le transit rapide de l'intestin grêle (**Figure 7**) (Ivanov et al., 2009a) L'iléon abrite également d'autres espèces comme les *Enterobacteriaceae*, les *Clostridiceae* et les *Streptococcaceae* (Donaldson et al., 2016).

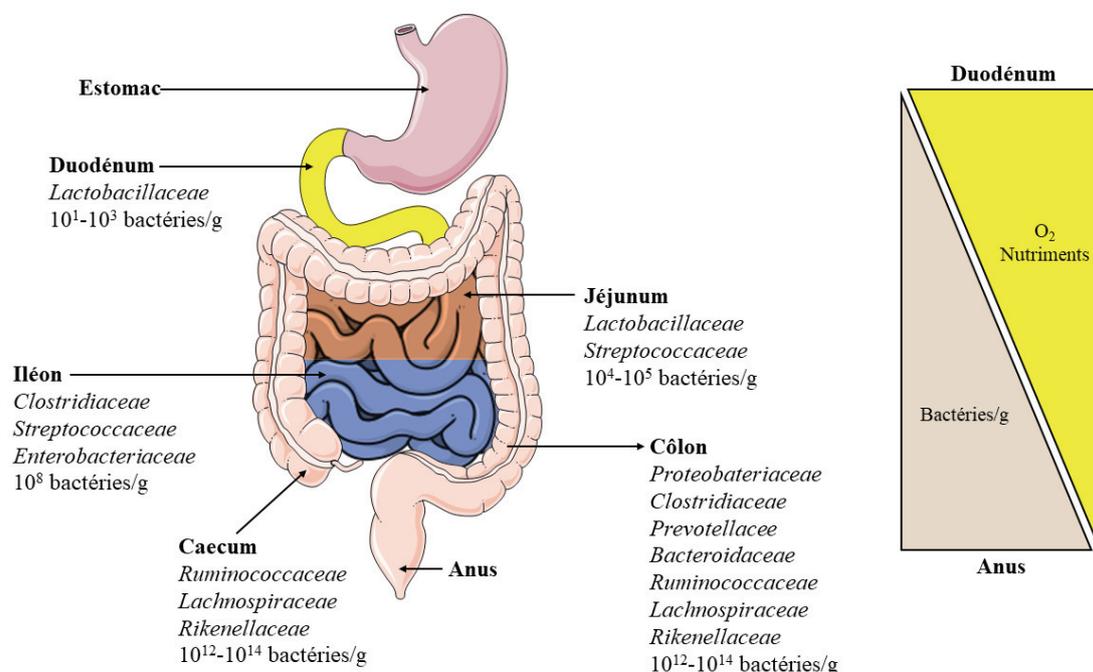


Figure 6 : Répartition des différents taxons au sein de l'intestin grêle et du côlon.

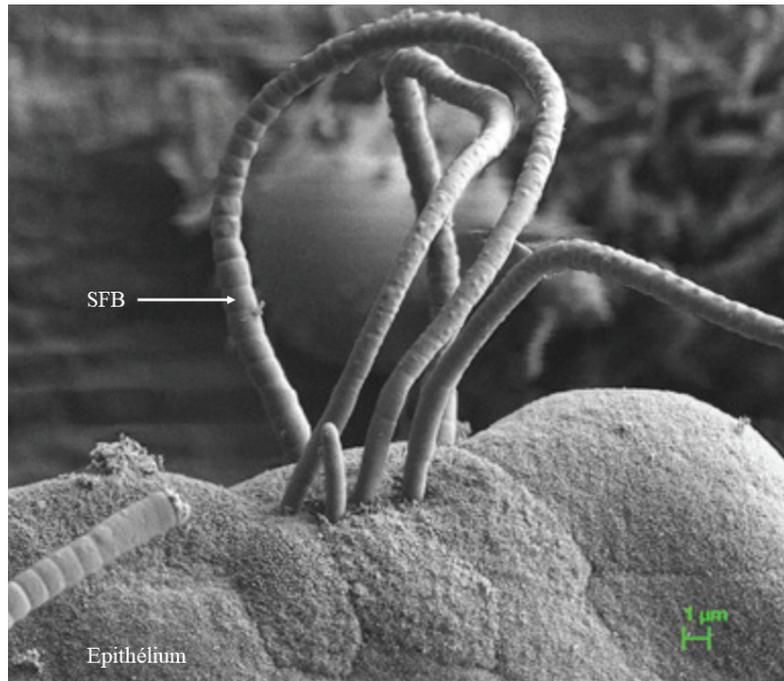


Figure 7 : Photo représentant une SFB adhérant à une cellule épithéliale murine (microscope électronique à balayage) (Ivanov et al., 2009a).

Malgré un taux d'oxygène très faible dans la lumière du côlon, la diversité et la quantité de micro-organismes qui s'y trouve sont bien plus importantes que dans tout l'intestin grêle (environ 10^{12} à 10^{14} bactéries par gramme de fèces sont présentes au sein du côlon humain). Cela s'explique par un transit plus long, la voie descendante du transit, associé à une absence d'acides biliaires. Ces conditions favorisent le développement de taxons anaérobies stricts qui dégradent les polysaccharides complexes selon un processus de fermentation. Le caecum, très développé chez les rongeurs, est colonisé par les *Ruminococcaceae* et les *Lachnospiraceae* alors que chez l'homme une majorité de *Proteobacteriaceae* et de *Clostridiaceae* est retrouvée. Le reste du côlon abrite une très grande diversité d'espèces bactériennes (Donaldson et al., 2016).

3. Impact du microbiote sur l'organisme

Le microbiote intestinal est une aide essentielle à la digestion, protège l'hôte contre les micro-organismes pathogènes, induit la génération de populations clés du système immunitaire intestinal et joue un rôle dans le développement du système nerveux (**Figure 8**).

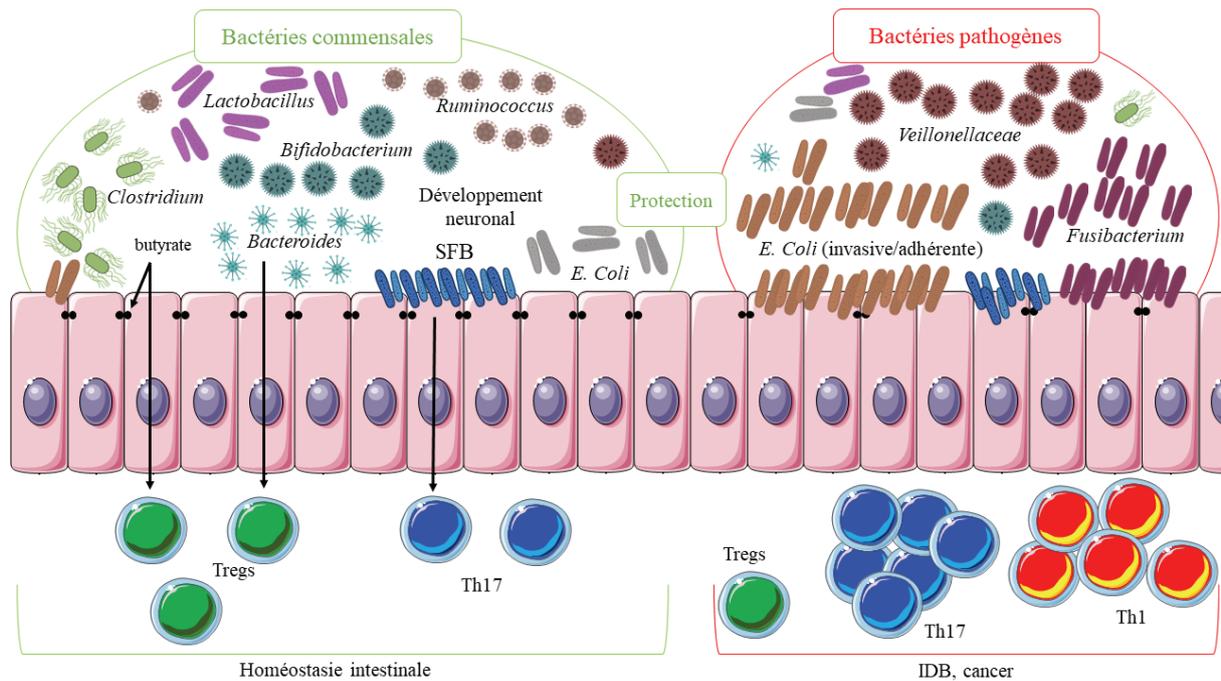


Figure 8 : Représentation des effets du microbiote au sein de l'organisme.

Des bactéries commensales comme les *Clostridium*s, et les *Bifidobacterium* aident à la digestion. Ils produisent du butyrate qui renforce les jonction serrées et l'étanchéité de l'épithélium. Les *Clostridium*s et les *Bacteroides* induisent la formation de Tregs qui permettent une tolérance du système immunitaire envers le microbiote. Les SFB sont responsables de la génération de Th17 qui aident au contrôle de la charge microbienne et à la lutte contre certains agents pathogènes. En cas de dysbiose la diversité du microbiote est perdue, ainsi que les effets bénéfiques apportés par les souches disparues. On observe alors une diminution du nombre de Treg et une augmentation des réponses Th1/Th17 envers le microbiote ce qui conduit à une inflammation chronique intestinale. Des bactéries pathogènes comme *Fusobacterium*s participent à la transformation des cellules épithéliales en cellules cancéreuses.

i. Fonctions digestives

Une des principales fonctions du microbiote est d'aider à la digestion des nutriments. Les espèces présentes dans l'intestin grêle, comme les *Lactobacillus* participent à la dégradation des carbohydrates simples.

Dans le côlon, en l'absence d'oxygène les bactéries utilisent la fermentation pour dégrader les polysaccharides complexes et les fibres alimentaires qui ne sont pas digérées dans l'intestin grêle. Les métabolites issus de ce processus peuvent donner lieu à des vitamines clés telles que les vitamines K et B12 produites par les *Bifidobacterium* (Nicholson et al., 2012) et qui ne peut pas être synthétisées par les cellules eukaryotes. D'autres espèces comme

Ruminococcus bromii sont responsables de la production d'acides gras à chaînes courtes comme le butyrate, le propionate et l'acétate.

Le butyrate est principalement utilisé par les cellules épithéliales comme source d'énergie ; mais renforce aussi l'imperméabilité de l'épithélium en entraînant la production de protéine comme ZO-1 et claudine-1 (Morrison and Preston, 2016). Plusieurs études ont également mis en évidence un rôle anti-inflammatoire du butyrate.

ii. Interaction avec le système immunitaire

Par les produits générés lors de la dégradation digestive, le microbiote va influencer les acteurs du système immunitaire. Le butyrate, l'acétate et le propionate ont également un effet sur le système immunitaire. Des transferts de ces métabolites dans des souris dépourvues de microbiote entraînent une augmentation du nombre de lymphocytes T régulateurs périphériques (pTregs) (Sefik et al., 2015). Les pTregs peuvent également être induit par des *Clostridium* et des *Bacteroides* (Sefik et al., 2015). Ces cellules régulatrices assurent une tolérance du système immunitaire essentielle, envers le microbiote, ce qui permet de maintenir l'homéostasie intestinale et d'éviter une inflammation chronique lors du passage d'antigènes microbiens de la lumière intestinale vers la lamina propria.

Le microbiote influence aussi la différenciation d'autres lymphocytes T (LT), comme les lymphocytes T helper 17 (Th17). Les bactéries segmentées filamenteuses (SFB) sont impliquées dans la différenciation de LT naïf en Th17 qui ont un rôle important dans le contrôle du microbiote intestinal et l'intégrité de l'épithélium (Ivanov et al., 2009a); mais également la lutte contre des pathogènes tels que *Citrobacter rodentium* ou *Salmonella typhimurium* (Dubin and Kolls, 2008).

iii. Fonction de protection envers les micro-organismes pathogènes

Le microbiote nous protège indirectement et directement des micro-organismes pathogènes.

Indirectement, via la capacité de certains taxons à induire la différenciation de cellules comme les Th17, ou en induisant la production de PAMs qui sont des molécules toxiques ciblant les bactéries à proximité des cellules épithéliales.

Le microbiote protège directement des micro-organismes pathogènes de plusieurs façons. Les nutriments et l'espace sont limités au sein du système digestif ; ce qui empêche une prolifération et une colonisation excessive des bactéries de l'intestin. De ce fait, il est très difficile pour un nouveau taxon de s'expandre au sein d'un intestin déjà colonisé par une multitude d'espèces. Cela fait du microbiote la première ligne de défense de l'hôte envers les micro-organismes pathogènes ; et des souris axéniques ou germ-free sont plus sensibles que des souris normales aux infections par *Citrobacter rodentium* (Kamada et al., 2013), *Salmonella typhimurium* ou *Clostridium difficile* (Ng et al., 2013). Ce rôle protecteur du microbiote s'appelle la « colonization resistance » et a été décrit il y a plusieurs dizaines d'années (Van der Waaij et al., 1971).

Afin d'augmenter leur compétitivité dans la lutte intestinale, plusieurs souches de micro-organismes ont évolué afin de gagner un avantage par rapports aux autres espèces du microbiote. Certaines bactéries produisent des molécules bactéricides appelées bactéricines, qui constitueraient un frein supplémentaire à l'établissement des micro-organismes pathogènes dans l'intestin. Ainsi, certaines souches de *Lactobacillus* protègent les souris d'infection de *Listeria monocytogenes* via leur production de la bactéricine Abp118 (Corr et al., 2007). Les métabolites bactériens jouent aussi un rôle dans la protection contre les pathogènes. Les métabolites comme l'acide butyrique ont également un rôle protecteur envers l'hôte, en inhibant la croissance de bactéries pathogènes comme *Salmonella Typhimurium* et *Clostridium difficile* (Pickard et al., 2017).

iv. Formation du système nerveux

Depuis quelques années, il apparaît que le microbiote semble impliqué dans le développement du cerveau et le comportement.

Chez l'homme, une dysbiose du microbiote intestinal a également été associée à certains troubles neurologiques comme l'autisme, l'anxiété et la dépression (Ma et al., 2019). D'autres

études sont requises afin de comprendre précisément l'impact du microbiote dans ces phénomènes et éventuellement développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Par ailleurs, il est impossible de définir si la dysbiose observée est une cause ou une conséquence des pathologies.

v. Implication du microbiote dans les pathologies inflammatoires intestinales

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) telles que les maladies inflammatoires de Bowel regroupant la colite ulcéreuse (UC) et la maladie de Crohn (CD) sont principalement caractérisées par une activation anormale du système immunitaire contre le microbiote. Des dysbioses semblent être des éléments clés dans l'initiation ou de la progression de ces pathologies. Ainsi, le transfert de microbiote de patients humains souffrant de MICI dans des souris saines génère des colites de type Th17/Th1 dépendante (Britton et al., 2019).

Les patients souffrant de MICI ont un microbiote moins riche que les personnes saines, avec la disparition de certains taxons dont des *Clostridium*, des *Bifidobacterium* ou des *Bacteroides* (**Tableau 3**) (Manichanh, 2006). Un appauvrissement en *Clostridium* s'accompagne d'une diminution de la production de butyrate et donc d'une diminution des protéines impliquées dans les jonctions serrées et l'étanchéité de l'épithélium. Les bactéries présentes dans la lumière intestinale peuvent ainsi arriver plus facilement dans la lamina propria, et activer le système immunitaire. Une diminution des *Clostridium* entraîne également une diminution de la génération des Tregs, et une perte de la tolérance du système immunitaire envers le microbiote, favorisant ainsi une inflammation induite par l'entrée massive de bactéries.

L'inflammation favorise le développement de taxons ayant un potentiel inflammatoire. Chez les patients souffrant de MICI, on observe une augmentation des bactéries adhérentes et invasives comme *Escherichia Coli* ou appartenant à la famille des *Fusobacteria* (Belkaid and Hand, 2014; Zuo and Ng, 2018). En cas d'inflammation l'oxyde d'azote produit par les cellules immunitaires est utilisé par *Escherichia Coli* afin de proliférer de façon importante (Winter et al., 2013). La prolifération de bactéries adhérentes au sein d'un épithélium perméable augmente fortement l'activation du système immunitaire et crée une boucle d'amplification, conduisant à une inflammation chronique.

Bactéries diminuées en cas de MICI	Bactéries augmentées en cas de MICI
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Proteobacteria</i>
<i>Clostridium</i>	<i>Escherichia Coli</i> (souches adérantes)/invasive)
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	<i>Fusobacterium</i>
<i>Roseburia</i>	<i>Ruminococcus gnavusa</i>
<i>Suturella</i>	<i>Pasteurellaceae</i>
<i>Bacteroides</i>	<i>Veillonellaceae</i>

Tableau 3 : Altération de la composition du microbiote chez les patients souffrant de MICI. Adapté de (Zuo and Ng, 2018).

Depuis plusieurs années l'inflammation chronique est considérée comme un terrain fertile au développement de cancers (Grivennikov, 2013; Grivennikov et al., 2010). Les dysbioses du microbiote sont également associées aux cancer colorectaux (CCR) (Arthur et al., 2012; Marchesi et al., 2016).

Chez les patients atteint de CCR, on observe un enrichissement en *Fusobacterium nucleatum* comparativement aux sujets sains (Yu et al., 2017). Les souris APC^{min/+} présentent une forte incidence de CCR en raison de la mutation d'un allèle du gène *apc*. L'introduction massive par gavage de *Fusobacterium nucleatum* isolées d'adénomes de patients atteint de CCR augmente la vitesse d'apparition des tumeurs, suggérant que ces bactéries joueraient un rôle dans la progression tumorale (Kostic et al., 2013). Les *Fusobacterium nucleatum* expriment l'adhésine FadA qui se lie aux cellules épithéliales via l'E-cadhérine. La liaison FadA/E-cadhérine libère la β -caténine, favorise ainsi la prolifération anormale des cellules épithéliales (Rubinstein et al., 2013). L'E-cadhérine et la β -caténine étant impliquées dans le maintien de la perméabilité intestinale, il est possible que l'adhésion de *Fusobacterium nucleatum* à l'épithélium perturbe sa perméabilité et favorise une inflammation chronique locale qui favorise la transformation cellulaire.

IV. Les cellules hématopoïétiques impliquées dans l'immunité intestinale

1. Les Lymphocytes intra-épithéliaux

Les lymphocytes intra-épithéliaux intestinaux (IELs) sont essentiellement des lymphocytes T composés à 60% de lymphocytes T TCR $\gamma\delta$ et de de lymphocytes T 40% $\alpha\beta$, qui évoluent entre les cellules qui composent l'épithélium intestinal (Hoytema van Konijnenburg et al., 2017). Les IELs expriment à la fois CCR9 (Chemokine Receptor 9) ce qui leur permet de migrer à proximité de l'épithélium intestinal en suivant le gradient de CCL25 (Chemokine Ligand 25) ; et l'intégrine $\alpha\beta7$ (ou CD103) qui leur permet d'adhérer à l'épithélium en interagissant avec l'E-cadhérine exprimée par les entérocytes. La grande majorité d'entre eux, surtout au niveau de l'intestin grêle, exprime, avec ou sans la molécule CD4 (Cluster of Differentiation 4) ou l'heterodimère CD8 α,β , l'homodimère CD8 $\alpha\alpha$, qui reconnaît la molécule TAL (Thymus leukemia antigen). TAL est une molécule de CMH-I (Complexe majeur d'histocompatibilité-I) non classique, exprimée par les cellules épithéliales intestinales. Une fois implantés dans l'épithélium, les IELs y résident et ne re-circulent pas au sein de l'organisme comme le démontrent des expériences de parabiose chez la souris (Van Kaer and Olivares-Villagómez, 2018). Les IELs ont un phénotype de cellules T activés (CD69⁺, CD44⁺) et sécrètent de l'IFN- γ (Interféron gamma), de l'IL-2 et de l'IL-17 ainsi que des granzymes et perforines. Ces cellules sont ainsi capables d'éliminer rapidement les bactéries franchissant l'épithélium (Hoytema van Konijnenburg et al., 2017). Ils participent aussi au contrôle du microbiote en produisant des PAMs comme RegIII γ . Leur fonction n'est pas limitée au contrôle de l'invasion microbienne. Ils produisent du TGF- β (Transforming Growth Factor beta) et d'IL-10, ce qui leur confère un effet régulateur sur les autres lymphocytes T localisés dans les couches plus profondes de l'intestin telles que la lamina propria (Denning et al., 2007; Kühl et al., 2009). Les IELs sont hétérogènes et ont été classés en IELs naturels et IELs induits (**Tableau 4**). Les IELs naturels acquièrent leur phénotype activé dans le thymus alors que les induits sont activés post-sélection thymique par des antigènes périphériques.

i. Les IEL naturels

Les IELs dits naturels expriment un TCR $\gamma\delta$ (T-Cell Receptor $\gamma\delta$) ou TCR $8\alpha\beta$, en association avec l'homodimère CD8 $\alpha\alpha$ ou non, mais jamais avec l'hétérodimère CD8 $\alpha\beta$ ou la molécule CD4. Ils sont générés au niveau du thymus à partir de précurseurs contenus au niveau des cellules doubles négatives, voire doubles positives, après un contact TCR CMH peptide de forte affinité (Gangadharan et al., 2006). Ces cellules migrent ensuite directement dans l'épithélium intestinal où elles s'implantent via leur expression de CCR9 et de l'intégrine CD103. Leur développement dépend du TGF- β , comme le démontre l'absence de ces cellules chez la souris TGF- β 1 KO. (Konkel and Chen, 2011). Ces IELs partagent des molécules exprimées sur les NK (Natural Killer) comme CD16, CD122, DNAX-activation protein 12 (DAP12) ou NK1.1. Les TCR $\alpha\beta^+$ CD8 $\alpha\alpha^+$ expriment un répertoire T varié et leur présence au sein de l'épithélium est largement dépendante du microbiote. Ainsi des souris axéniques présentent une diminution de ces cellules dans l'épithélium. Le rôle des IELs TCR $\alpha\beta^+$ CD8 $\alpha\alpha^+$ n'est pas clair ; mais des analyses transcriptomiques ont révélé que ces lymphocytes ont un profil de type régulateur (Denning et al., 2007).

ii. Les IELs induits

Les IELs induits sont des LT TCR $\alpha\beta^+$ CD4 $^+$ ou TCR $\alpha\beta^+$ CD8 $\alpha\beta^+$ qui migrent au sein de l'épithélium intestinal après avoir été activés dans les ganglions mésentériques ou dans la lamina propria. Leur activation conduit à l'expression de l'homodimère CD8 $\alpha\alpha$. L'acquisition du CD8 $\alpha\alpha$ se fait en diminuant l'expression du facteur de transcription ThPOK impliqué dans l'expression du lineage CD4 et en sur-exprimant Runx3, qui intervient dans l'expression du lineage CD8. Contrairement aux cellules naturelles, ce groupe d'IELs présente un répertoire T très restreint. Une étude suggère que les Tregs qui migrent au sein de l'épithélium peuvent perdre l'expression de FoxP3 (Forkhead box P3) et se mettent à exprimer l'homodimère CD8 $\alpha\alpha$. Ces IELs dérivés de Tregs semblent jouer un rôle dans la tolérance alimentaire (Sujino et al., 2016).

Origine	Sous-type de IELs	Fonction
Naturels	TCR $\alpha\beta^+$ CD8 $\alpha\alpha^+$	Régulateur ?
	TCR $\gamma\delta^+$ CD8 $\alpha\alpha^{+/-}$	Pro-inflammatoire en condition précoce puis anti-inflammatoire en cas d'inflammation chronique Participent à la réparation de l'épithélium
Induits	TCR $\alpha\beta^+$ CD4 $^+$	Réponse contre les microorganismes pathogènes
	TCR $\alpha\beta^+$ CD4 $^+$ CD8 $\alpha\alpha^+$	Rôle dans la tolérance alimentaire
	TCR $\alpha\beta^+$ CD8 $\alpha\beta^+$	Réponse de type Th1, sécrétion de granzyme B
	TCR $\alpha\beta^+$ CD8 $\alpha\beta^+$ CD8 $\alpha\alpha^+$	Fonction non déterminée

Tableau 4 : Listes des différents types de IELs et leurs fonctions.

2. Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques de l'intestin sont présentes dans les plaques de Peyer, la lamina propria et les ganglions mésentériques. Les cellules dendritiques contribuent à la présentation antigénique aux lymphocytes T et à l'induction de Tregs qui permettent une tolérance au microbiote et aux aliments. Les cellules dendritiques sont également responsables de la mise en place du tropisme intestinal des lymphocytes T activés dans les ganglions mésentériques. Il existe différents types de cellules dendritiques intestinales définies sur la base de l'expression de CX3CR1 (C-X3-C Motif Chemokine Receptor 1), et de CD103 notamment.

i. Les cellules dendritiques CX3CR1

Ces cellules dendritiques ont la capacité d'envoyer des dendrites entre deux cellules épithéliales pour atteindre la lumière intestinale et pour capturer des antigènes (Niess, 2005). Ces cellules largement dépourvues de molécules de co-stimulation, ont une faible capacité d'activation des lymphocytes T et les conduisent à un état d'anergie assurant une tolérance alimentaire et microbienne contre les antigènes présents dans la lumière (Schulz et al., 2009). Il est à noter que ces cellules sont difficilement classables selon les études comme de pures cellules dendritiques et que certaines études les considèrent comme des cellules dites myéloïdes exprimant CX3CR1 en faisant une forme de macrophage.

ii. Les cellules dendritiques CD103⁺

Ces cellules CCR7⁺ migrent de la lamina propria et des plaques de Peyer aux ganglions mésentériques, poussées par le gradient établi par les chimiokines CCL21/CCL19, exprimées dans les ganglions (Jang et al., 2006). Cette population est divisée en deux groupes comprenant les cellules CD11b⁺ CD8 α ⁻ qui contribuent activement à la génération de Th17; et les cellules CD11b⁻ CD8 α ⁺ qui favorisent un lineage plus Th1 par leur production d'IL-12 (Liang et al., 2016). Cette sous-population semble aussi hétérogène car une fraction produit de l'acide rétinoïque (RA) et est capable de fournir une source bioactive de TGF- β grâce à leur expression de l'intégrine bêta-8 (Itg β 8), favorisant la tolérance et la différenciation en Treg (Boucard-Jourdin et al., 2016; Coombes et al., 2007).

iii. Les cellules dendritiques CD103⁻

Il a d'abord été suggéré que seules les cellules dendritiques CD103⁺ étaient responsables du tropisme des lymphocytes activés dans les ganglions mésentériques vers l'intestin, en induisant notamment l'expression de CCR9 (Annacker et al., 2005; Johansson-Lindbom et al., 2005) Cependant, une étude a montré que les cellules CD103⁻ joueraient également un rôle dans ce tropisme intestinal (Cerovic et al., 2013). Il est à noter que les cellules CD103⁻ deviennent des cellules CD103⁺ sous l'action du TGF- β (Bain et al., 2017).

3. Les cellules innées lymphocytaires

Les cellules innées lymphocytaires (ILCs) sont des cellules résidentes (Gasteiger et al., 2015), très présentes au sein des muqueuses dont l'intestin et qui n'expriment pas de TCR (Vivier et al., 2018).

Les ILCs ont été divisées en 3 types en fonction des facteurs de transcription qu'elles expriment. Les ILC3 jouant un rôle majeur dans l'homéostasie intestinale, cette population sera davantage détaillée.

i. Les cellules innées lymphocytaires de type 1 et les cellules Natural killer

Les ILC1 expriment T-bet un facteur de transcription caractéristique du lineage Th1, qui leur permet de produire de forte quantité d'IFN- γ et de GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor) (Fuchs et al., 2013; Vivier et al., 2018). Le groupe des ILC1 comprend également les NK, qui expriment le facteur de transcription Eomes. Contrairement aux autres ILC1, les NK sont plus circulantes et possèdent une forte activité cytotoxique (Vivier et al., 2018).

ii. Les cellules innées lymphocytaires de type 2

Les ILC2 expriment les facteurs de transcription GATA-3 et ROR- γ t (retinoic acid receptor-related orphan nuclear receptor gamma). Elles sont impliquées dans la défense de l'organisme contre les parasites tels que les helminthes. De façon similaire au Th2, ces cellules produisent de l'IL-5 et de l'IL-13 (Vivier et al., 2018). Dans un modèle de colite induite par DSS (Dextran Sulfate Sodium) l'IL-33 stimulerait la production d'amphiréguline par ILC2s afin d'aider la réparation des dommages causés à l'épithélium intestinal (Monticelli et al., 2015).

iii. Les cellules innées lymphocytaires de type 3

Les ILC3, expriment ROR- γ t et interviennent dans la défense de l'organisme contre les bactéries extracellulaires et le confinement du microbiote dans la lumière intestinale, mais aussi dans le maintien de l'intégrité de l'épithélium intestinal (Vivier et al., 2018). Les ILC3 produisent de l'IL-17A et de l'IL-22.

a. Rôle de l'IL-17A

L'IL-17A permet la bonne localisation de protéines impliquées dans les jonctions serrées comme l'occludine ; et participe donc au maintien de l'imperméabilité de l'épithélium intestinal (Lee et al., 2015). L'IL-17A entraîne également la production de PAMs (Ishigame et al., 2009) dans la lumière intestinale afin de contrôler la charge de micro-organismes à proximité de

l'épithélium. En cas de dommages causés aux cellules épithéliales, l'IL-17A agit avec le facteur de croissance FGF2 (Fibroblast Growth Factor 2) afin de restaurer l'intégrité de l'épithélium (Song et al., 2015). Dans le cas de colites induites par traitement au DSS, une absence de l'IL-17A aggrave les symptômes (Lee et al., 2015; Ogawa et al., 2004; Song et al., 2015). Les souris *Abcd1*^{-/-} développant spontanément une inflammation intestinale présentent également des symptômes plus graves lorsque le récepteur de l'IL-17A est neutralisé (Maxwell et al., 2015).

L'IL-17A a également un fort pouvoir inflammatoire, dû à sa capacité d'induire la production de cytokines comme le GM-CSF, l'IL-6, l'IL-1 β , l'IL-23, le TNF- α (Monin and Gaffen, 2018). En plus de ces cytokines, l'IL-17A entraîne la production de chimiokines telles que CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL8, mais aussi de l'IL-8 qui vont permettre le recrutement de neutrophiles (Flannigan et al., 2017). Les neutrophiles participent à l'élimination des micro-organismes par phagocytose, à l'aide d'enzymes antibactériennes ou de « Reactive Oxygen Species» (ROS), et peuvent produire de grande quantité d'IL-6 (Mantovani et al., 2011). Un défaut de recrutement des neutrophiles s'accompagne d'une augmentation de certaines bactéries, comme les bactéries segmentées filamenteuses (SFB) (Flannigan et al., 2017), responsable de la génération des Th17 au sein de l'iléon. Une autre chimiokine induite par l'IL-17A est CCL20, qui permet le recrutement des cellules exprimant CCR6 c'est-à-dire les Th17 et les ILC3 (Monin and Gaffen, 2018).

Plusieurs études ont décrit des effets pro-tumoraux de l'IL-17A. Il a été montré que des souris APC^{min} développent moins de polypes lorsqu'elles sont déficientes pour l'IL-17A (Chae et al., 2010) ou pour l'IL-17RA (Wang et al., 2014a). Au niveau des cellules épithéliales l'IL-17A entraîne l'activation d'Nf κ b et induit la production d'IL-6. L'IL-6 est connue pour ses effets pro-tumoraux et agit sur les cellules épithéliales de façon à induire leur survie et prolifération via STAT3 (Wang et al., 2014a). L'IL-17A, en agissant avec le TNF- α favorise l'acquisition d'un phénotype immunosuppresseur des cellules myéloïdes recrutées, ce qui réduit l'efficacité des réponses antitumorales et aide à la croissance tumorale (Veglia et al., 2018). L'IL-17A induit également l'expression de métalloprotéases (1, 3, 9, 12, 13) qui participent au remodelage de la matrice extracellulaire et à la croissance de la tumeur. Enfin l'IL-17A entraîne la production de VEGF (Vascular Endothelium Growth Factor) qui favorise l'angiogenèse et la dissémination tumorale (De Simone et al., 2013) (**Figure 9**).

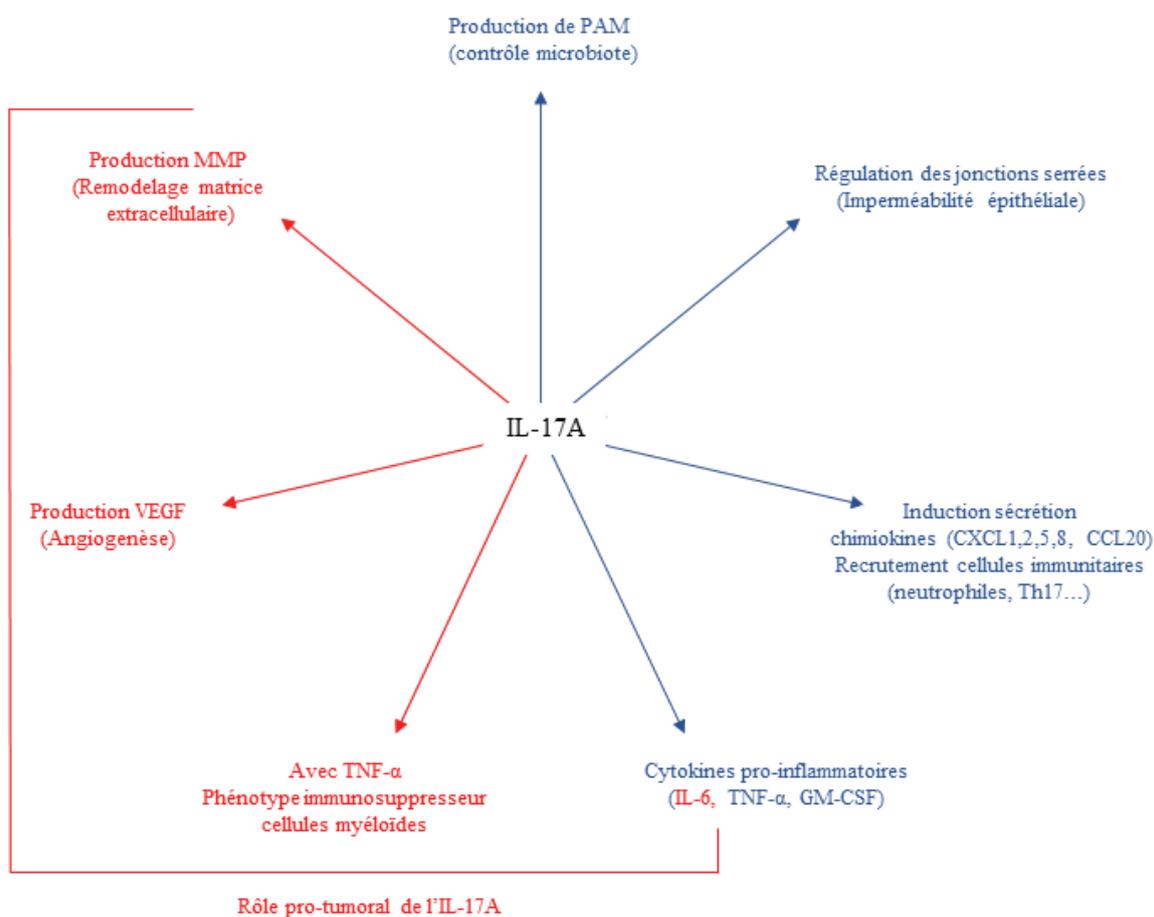


Figure 9 : Effets de l'IL-17A dans l'intestin.

L'IL-17A participe au maintien de l'homéostasie en induisant la production de PAMs par les cellules épithéliales afin de contrôler la charge bactérienne dans la lumière intestinale. L'IL-17A renforce les jonctions serrées entre les cellules épithéliales afin de garantir l'imperméabilité de l'épithélium. L'IL-17A induit également la production de chimiokines comme CXCL1 ou CCL20 qui permettent le recrutement de cellules myéloïdes comme les neutrophiles ou les cellules exprimant CCR6.

L'IL-17A peut avoir une action pro-tumorale, notamment en induisant STAT3 dans les cellules épithéliales. En agissant avec le TNF- α , l'IL-17A permet l'acquisition d'un phénotype immunosuppresseur des cellules myéloïdes qui diminuent alors l'efficacité des réponses antitumorales. Enfin l'IL-17A peut favoriser la dissémination de la tumeur en aidant au remodelage de la matrice extracellulaire via l'induction de métalloprotéases ; ou bien en favorisant l'angiogenèse en induisant la production de VEGF.

b. Rôle de l'IL-22

L'IL-22 est produite en réponse à l'IL-23 (Zheng et al., 2008). La signalisation de l'IL-22 implique les voies, STAT3, AKT, p38 ou des MAPKinases (Parks et al., 2016). Au niveau intestinal, l'IL-22 a un rôle majeur dans le maintien de la barrière intestinale. Elle induit la

production de mucus et la production de PAMs (REGIII γ , REGIII β , SA100A8 et 9...) afin de tenir les bactéries compartimentées dans la lumière intestinale (Zheng et al., 2008). Enfin, quand l'épithélium est endommagé IL-22 augmente la prolifération et la résistance à l'apoptose des cellules épithéliales afin de restaurer sa fonction de barrière.

Les ILC3 peuvent être divisés en 3 sous types sur la base de l'expression de NKP46 et l'expression jointe de T-bet (Hepworth et al., 2013). Les ILC 3 qui expriment T-bet peuvent sécréter de l'IFN- γ et leur présence semble dépendante du microbiote intestinal (Klose et al., 2013).

Les ILC3 NKP46⁻ expriment la molécule de CMH-II sont capables de capturer et présenter des peptides du microbiote présent dans la lamina aux LT. Dépourvu de molécules de co-stimulation CD80 et CD86 elles instaurent une anergie des LT. En effet des souris avec une délétion de la molécule de CMH-II dans les ILC3 présentent des réponses de types Th17/Th1 exacerbées ; ainsi qu'une inflammation intestinale qu'un traitement antibiotique supprime (Hepworth et al., 2013).

En raison des cytokines qu'elles produisent, les ILCs 3 peuvent être impliquées dans les MICI (Artis and Spits, 2015).

4. Les lymphocytes B et les IgA

Dans l'intestin, les Lymphocytes B (LB) se différencient en plasmocytes et sécrètent des IgA qui vont aider à contrôler et maintenir la charge microbienne à distance de l'épithélium intestinal. L'intestin grêle contient plus de plasmocytes que le colon, et donc plus d'IgA (Bunker et al., 2015).

La différenciation des LB en plasmocytes peut être lymphocyte T dépendante ou lymphocyte T indépendante. La différenciation lymphocyte T dépendante se fait dans les centres germinatifs des plaques de Peyer ou des ganglions mésentériques avec l'aide des lymphocytes T CD4 follicular helper (Tfh). Les Tfh sont caractérisés par l'expression du facteur

de transcription B cell lymphoma 6 (Bcl6), expriment CD40 Ligand et sécrètent de l'IL-21 (Crotty, 2014) et leur différenciation est bloquée par le TGF (McCarron and Marie, 2014).

La différenciation lymphocyte T indépendante a lieu dans les ganglions mésentériques et les follicules lymphoïdes isolés (Tezuka et al., 2011; Tsuji et al., 2008). Elle se fait en présence entre autre de cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) qui expriment les molécules APRIL (A Proliferation Inducing Ligand) et BAFF (B cell activating factor) (Tezuka et al., 2011). Dans les deux cas des facteurs externes tels que le TGF- β , l'acide rétinoïque et l'IL-10 sont nécessaires. Les lymphocytes B sécrètent des IgAs qui sont des dimères d'immunoglobulines agissant aussi bien sur les micro-organismes commensaux que pathogènes.

En se liant aux bactéries, les IgAs peuvent perturber certaines de leurs fonctions comme la mobilité (Forbes et al., 2008) et les piéger dans le mucus (Boullier et al., 2009) ce qui augmente l'efficacité des PAMs. Les IgAs réduisent également la capacité d'adhésion des bactéries aux cellules épithéliales en reconnaissant les domaines de liaisons que les micro-organismes utilisent pour se fixer sur l'épithélium ; ou en interférant avec la sécrétion de molécules leur permettant de traverser l'épithélium (Forbes et al., 2011). Enfin le complexe IgA/bactérie peut retourner dans les plaques de Peyer via le récepteur Dectin-1 exprimé par les cellules M (Rochereau et al., 2013) afin de moduler la réponse du système immunitaire envers le microbiote (Boullier et al., 2009). Une déficience en IgA entraîne une dysbiose intestinale (Suzuki et al., 2007) et une susceptibilité accrue à certaines pathologies comme les MICI.

5. Les lymphocytes $\gamma\delta$

Les LT $\gamma\delta$ sont fortement présents au niveau des muqueuses. Dans l'intestin, une partie des $\gamma\delta$ est située dans l'épithélium (voir partie IELs), et une autre dans la lamina propria.

Les LT $\gamma\delta$ de la lamina propria ont un répertoire TCR restreint de type $\gamma 2(4)\delta$ et $\gamma 6\delta 1$ et peuvent être divisés en 2 sous-populations sur la base de CCR6, CD27 et CD44. Les cellules CCR6⁺ CD27⁻ CD44^{high}, expriment ROR- γ t et produisent de l'IL-17A et de l'IL-17F. Ces cellules sont exclusivement générées dans le thymus pendant le développement embryonnaire. En effet des souris RAG^{KO} (Recombination Activating Genes) irradiées puis reconstituées avec de la moelle osseuse de souris sauvage sont incapables de développer des LT $\gamma\delta$ producteurs

d'IL-17 (Haas et al., 2012). Les cellules CCR6⁻ CD27⁺ CD44⁻ expriment T-bet et sécrètent de l'IFN- γ (Haas et al., 2012; Ribot et al., 2009).

Activées par des cytokines inflammatoires comme l'IL-23 ou l'IL-1 β (Shibata et al., 2007) (Sutton et al., 2009) ces cellules sont importantes pour la réponse innée. En cas d'infection par *Escherichia Coli* les $\gamma\delta$ 1 produisent de l'IL-17 qui recrute les neutrophiles (Shibata et al., 2007). Lors d'une infection par *Listeria Monocytogenes* les cellules CCR6⁻ CD27⁺ CD44⁻ migrent dans la lamina propria et participent à l'élimination de la bactérie en produisant à la fois de l'IL-17A et de l'IFN- γ (Sheridan et al., 2013).

Les $\gamma\delta$ participent également à la réparation de l'épithélium intestinal lorsque celui-ci est endommagé. Dans un modèle de DSS il a été montré que les $\gamma\delta$ font partie des premières cellules à réparer les dommages causés à l'épithélium du côlon en produisant de grandes quantités d'IL-17 (Lee et al., 2015). Ces données sont en faveur du potentiel réparateur des $\gamma\delta$ au niveau de l'intestin.

6. Les lymphocytes T $\alpha\beta$

i. Les lymphocytes T CD8

Les lymphocytes T $\alpha\beta$ CD8 sont générés au niveau du thymus. Après leur activation et leur expansion dans les organes lymphoïdes secondaires ces cellules acquièrent, pour une grande partie, des fonctions cytotoxiques leur permettant d'éliminer les cellules porteuses de l'antigène responsable de leur activation. Elles sont aussi dotées d'une capacité de production de cytokines notamment pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ , le TNF- α voire le GM-CSF.

ii. Les lymphocytes T $\alpha\beta$ CD4

Générés dans le thymus comme les lymphocytes T CD8, les lymphocytes T CD4 permettent l'organisation de réponses adaptatives. Leur activation et leur expansion clonale se fait dans les organes lymphoïdes secondaires en réponse à l'engagement de leur TCR par un complexe CHMH-II/peptides, des molécules de co-stimulation et de l'IL-2. Les LT CD4 peuvent se différencier en différents sous-types sur la base des cytokines qui composent l'environnement, des conditions métaboliques et de la force du signal TCR (**Figure 10**).

Les différents sous-types des CD4 sont les Th1, les Th2, les Th9, les Th17, les Th22, les Tregs et les Tfh. Seuls les Th1, les Tregs et les Th17 seront détaillés.

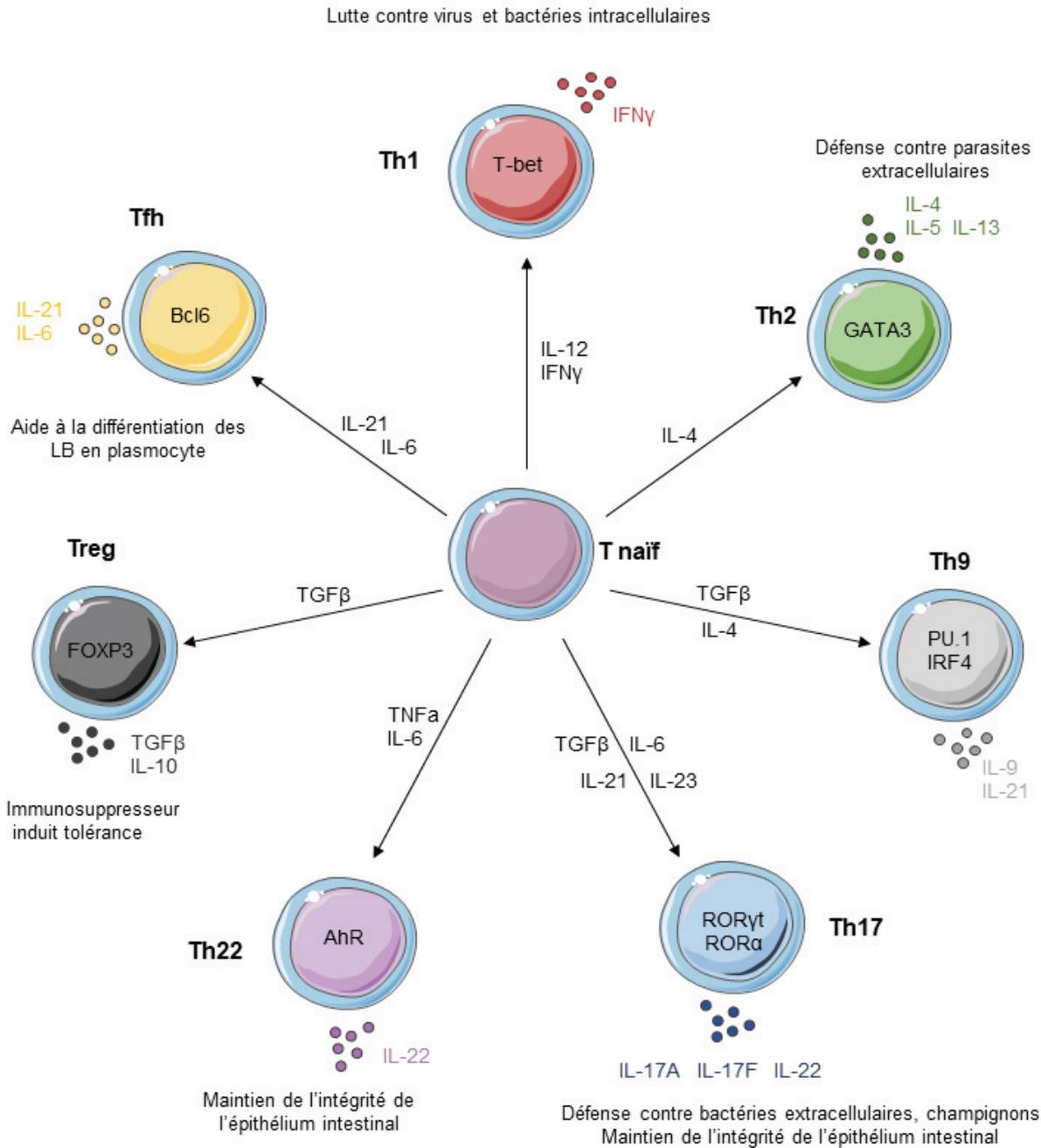


Figure 10 : Représentation de la différenciation des sous-populations de CD4 et leurs fonctions. L'interaction CD4 naïf/CPA n'est pas représentée sur ce schéma bien qu'elle soit requise pour initier la différenciation.

a. Les lymphocytes T helper 1

Les Th1 sont impliqués dans les réponses de type 1, c'est-à-dire la défense de l'organisme contre les virus, les bactéries intracellulaires mais également dans les réponses antitumorales. Ils sont caractérisés par l'expression du facteur de transcription T-bet, et expriment le récepteur aux chimiokines CXCR3 dont les ligands sont CXCL-9 (C-X-C Motif Chemokine Ligand 9), CXCL-10 et CXCL-11. L'axe CXCR3-CXCL9/10/11 permet aux Th1 de migrer rapidement au sein des sites inflammatoires. La cytokine signature des Th1 est l'IFN- γ dont l'expression est directement contrôlée par T-bet.

L'IFN- γ est une cytokine pro-inflammatoire ayant de multiples effets (**Figure 11**).

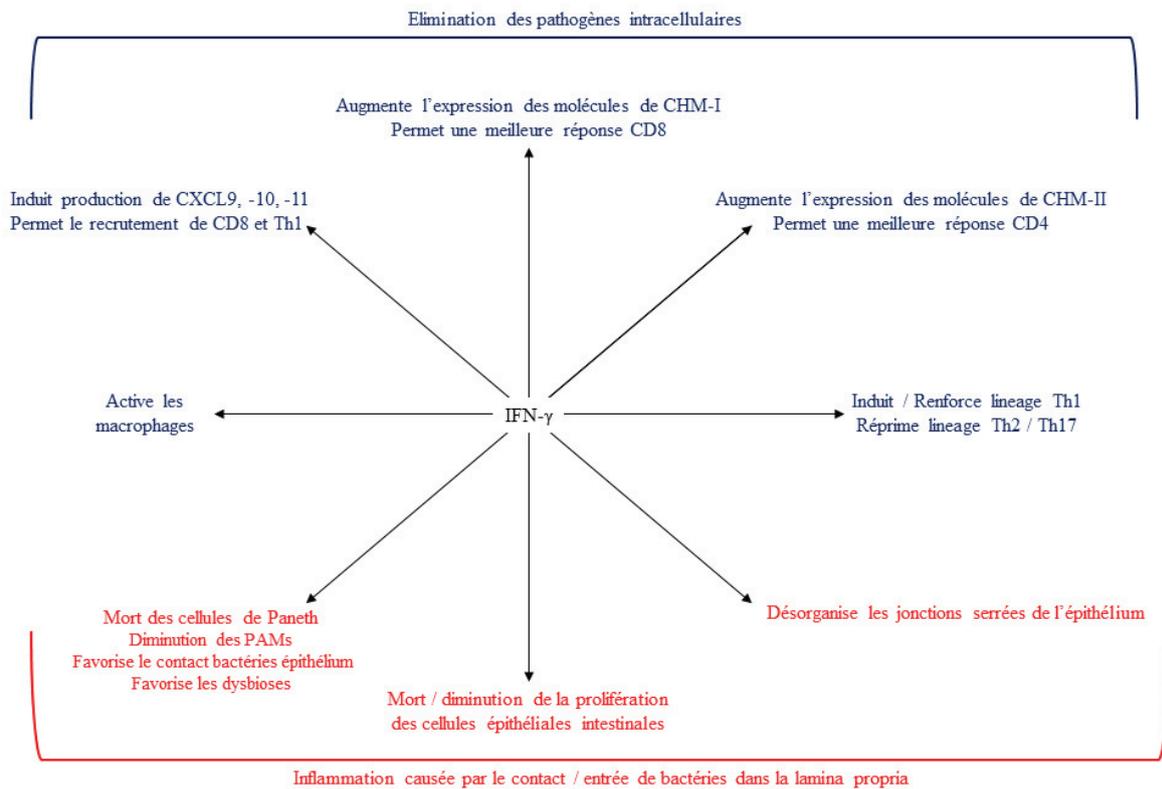


Figure 11 : Effets de l'IFN- γ .

L'IFN- γ permet une meilleure réponse Th1 en induisant la sécrétion de chimiokines qui permettent leur recrutement au sein des sites infectieux. L'IFN- γ augmente l'expression des molécules de CMH nécessaires à l'activation des lymphocytes, et active les macrophages participant à l'élimination des micro-organismes.

L'IFN- γ peut aussi avoir des effets néfastes, comme entraîner la mort des cellules épithéliales et perturber les jonctions serrées ce qui augmente la perméabilité intestinale, favorise l'entrée de bactéries dans la lamina propria et amplifie l'inflammation.

L'IFN- γ active les macrophages impliqués dans les réponses de type Th1 ; et augmente l'expression des molécules de CHM-I. L'augmentation des molécules de CHM-I permet une meilleure activation et une meilleure réponse des CD8. L'expression des molécules de CMH-II est également augmentée par l'IFN- γ . L'IFN- γ active la voie STAT1, ce qui entraîne la production de chimiokines comme CXCL-9, CXCL-10 et CXCL-11 qui permettent le recrutement via CXCR3 des Th1 et des CD8 au niveau des sites inflammatoires (Mikhak et al., 2006). L'expression des molécules de CMH-II est également augmentée par l'IFN- γ , ce qui permet une meilleure activation des CD4. Finalement, L'IFN- γ permet la différenciation et renforce le lineage Th1, et réprime les lineages Th2 et Th17 (Afkarian et al., 2002; Lighvani et al., 2001).

Les biopsies de patients souffrants de MICI sont enrichies en IFN- γ , ce qui souligne l'implication des Th1 dans ces pathologies. Dans un modèle de colite induite par DSS, des souris IFN- $\gamma^{-/-}$ développent des symptômes moins sévères que des souris sauvages (Nava et al., 2010).

L'IFN- γ entraîne la mort des cellules de Paneth (Raetz et al., 2013), ce qui diminue la concentration de PAMs et favorise le contact entre les bactéries et les cellules épithéliales. Une diminution des PAMs peut favoriser la croissance de certaines bactéries et conduire à l'apparition de dysbioses, qui sont associées au développement de MICI.

De plus, l'IFN- γ , tout comme le TNF- α perturbe les jonctions serrées de l'épithélium (Utech et al., 2005; Wang et al., 2005) nécessaires à l'imperméabilité de l'épithélium intestinal. L'importance du TNF- α dans les pathologies inflammatoires intestinales est soulignée par l'utilisation d'anticorps anti-TNF pour traiter les patients souffrants de maladie de Crohn (Shi and Ng, 2018).

Enfin il a été observé que des cellules épithéliales exposées longtemps à l'IFN- γ sont plus sensibles à l'apoptose et prolifèrent moins (Nava et al., 2010). Une mort importante des cellules épithéliales et une augmentation de la perméabilité intestinale favorisent grandement l'entrée de bactéries dans la lamina propria et donc la mise en place d'une inflammation intestinale.

L'engagement du TCR de CD4 naïfs en présence d'IL-12 entraîne leur différenciation en Th1, et est amplifié par l'IFN- γ que les cellules différenciées produisent. L'IFN- γ active la voie STAT1 ce qui conduit à l'expression de *tbx21* (T-Box Transcription Factor 21), le gène de T-bet (Afkarian et al., 2002; Lighvani et al., 2001). T-bet active la production d'IFN- γ en se liant directement sur le promoteur et sur 2 séquences non codantes hautement conservées (CNS) du

gène de l'IFN- γ (Shnyreva et al., 2004). T-bet active également la transcription de l'IL-12R β , ce qui rend les Th1 plus sensibles à l'IL-12. L'IL-12 active STAT4, qui avec T-bet favorise l'expression de l'IFN- γ d'un point de vue épigénétique (Aune et al., 2009). Enfin T-bet induit l'expression du facteur de transcription Runx3, et ils se lient ensemble sur le promoteur de l'IFN- γ , renforçant son expression (Djuretic et al., 2007). T-bet possède également la capacité d'inhiber GATA-3, qui favorise la différenciation Th2. Le duo T-bet/Runx3 réprime aussi l'expression de l'IL-4 (Djuretic et al., 2007). Finalement T-bet bloque le phénotype Th17 en interagissant avec Runx1 et l'empêchant d'activer le gène *rorc*, codant pour ROR- γ t, un des facteurs de transcription majeur des Th17 (Lazarevic et al., 2011) (**Figure 12**).

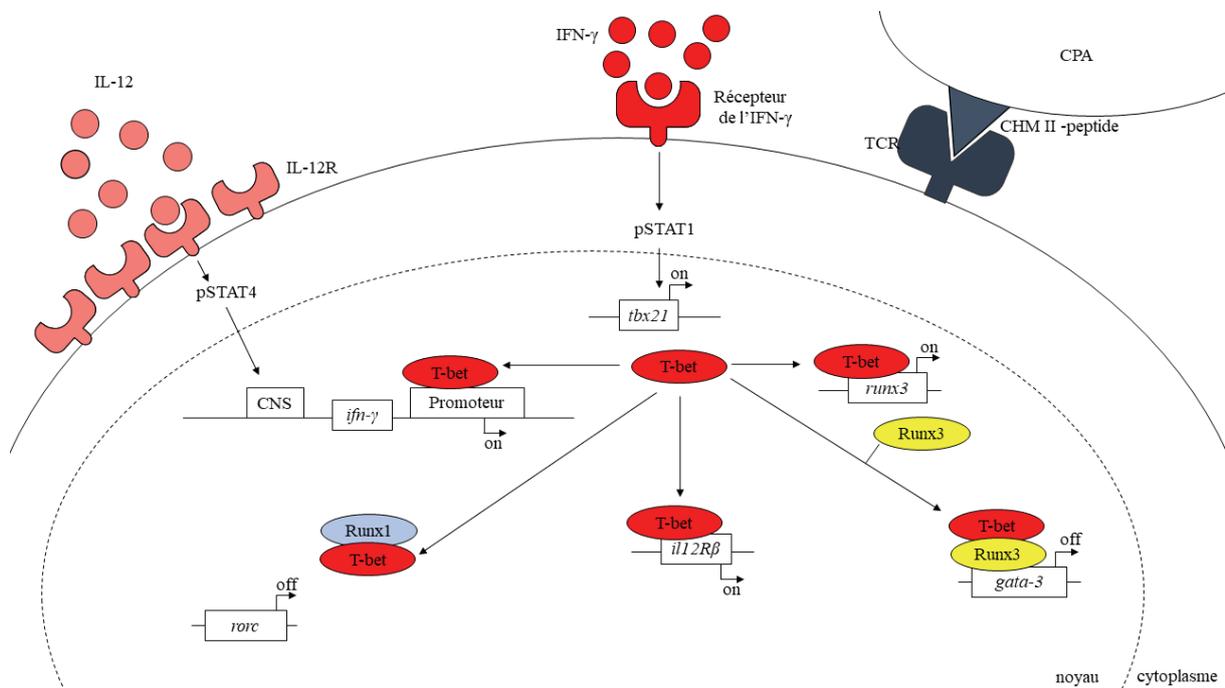


Figure 12 : Représentation des mécanismes moléculaires de la différenciation des Th0 en Th1. L'IFN- γ active la voie STAT1 qui conduit à la transcription du gène *tbx21* et l'expression du facteur de transcription T-bet caractéristique des Th1. T-bet contrôle l'expression de l'IFN- γ en se liant directement sur le promoteur du gène. T-bet entraîne aussi l'expression du récepteur à l'IL-12. L'IL-12 active la voie STAT4 qui aide à la production d'IFN- γ . Les lignées Th2 et Th17 sont réprimés par T-bet.

Plusieurs études ont mis en évidence une forte réponse Th1 dans différents modèles d'inflammation intestinale. Ainsi la neutralisation de CXCL10 impliqué dans le recrutement des Th1 exprimant CXCR3 atténue les symptômes (Singh et al., 2008). De plus des animaux l'IFN- $\gamma^{-/-}$ ne développent quasiment pas d'inflammation intestinale sous DSS (Ito et al., 2006).

b. Les lymphocytes T régulateurs

Les Tregs sont des cellules immunosuppressives, caractérisées par le facteur de transcription FoxP3 et de CD25, la chaîne de haute affinité du récepteur de l'IL-2. Au niveau de l'intestin les Treg représentent 30 à 40% des lymphocytes T CD4. Les Tregs intestinaux ont soit une origine thymique (tTregs) soit périphériques (pTregs).

Ces deux populations ont longtemps été proposées comme impliquées dans la régulation de l'alternance au microbiote intestinal. Cependant, des approches génétiques basées sur l'invalidation des régions conservées non codante du promoteur de Foxp3 spécifique de la différenciation thymique ou extra thymique ont fortement questionné le rôle des deux populations. L'absence du développement de pTreg n'entraîne pas d'inflammation intestinale comme attendue si la tolérance au microbiote était perdue (Josefowicz et al., 2012). Par ailleurs l'analyse (épi)génétique démontre que les tTregs constituent la majeure partie des Tregs de l'intestin incluant le colon (Cebula et al., 2013) suggérant que ces cellules seraient essentielles au maintien de la tolérance T au microbiote. Cependant les conclusions, notamment au niveau du côlon, de ces travaux ont été questionnées par la mise en évidence d'un grand nombre Tregs exprimant le facteur de transcription ROR γ t. Si Tregs ROR- γ t^{neg} sont majoritaires dans l'intestin grêle, où ils contribueraient une tolérance aux antigènes alimentaire (Kim et al., 2016), les Treg ROR- γ t⁺ résident en grand nombre dans le côlon; et leur différenciation est largement dépendante du microbiote. La colonisation de l'intestin de souris axéniques avec uniquement des souches de *Clostridium* ou de *Bacteroides* entraîne une augmentation du nombre de Tregs ROR- γ t⁺ dans le côlon (Sefik et al., 2015). Leur développement a récemment été démontré comme dépendant de c-Maf (Xu et al., 2018).

Des transferts de métabolites bactériens comme le butyrate, l'acétate et le propionate dans des souris sans dépourvues de microbiote entraînent une augmentation du nombre de Tregs, renforçant l'importance du microbiote dans la génération de Tregs intestinaux (Smith et al., 2013). D'autres métabolites permettent la génération de pTregs. La vitamine A, dégradée en acide rétinoïque par des cellules dendritiques CD103⁺ est un puissant inducteur de la différenciation Treg dans l'intestin grêle (Coombes et al., 2007).

Différents modes d'action des Treg appliquées *in vitro* ou *in vivo* dans le contrôle de la pathologie auto-immune ont été transposées à la tolérance au microbiote. Ce jour aucun mode

ne semble être prédominant suggérant qu'un ensemble de mécanismes plus qu'un mécanisme précis conduisent à la tolérance des LT dans l'intestin

V. Les lymphocytes Th17

Les Th17 sont caractérisés par l'expression des facteurs de transcriptions ROR- γ t (Ivanov et al., 2006) et ROR- α (Yang et al., 2008a). Ils sont fortement présent dans la lamina propria de l'intestin et du côlon, mais aussi au sein des plaques de Peyer (Hirota et al., 2013). Ils expriment le récepteur CCR6 qui permet leur recrutement au niveau des muqueuses et des sites inflammatoires riche en CCL20. Les Th17 sont impliqués dans la défense de l'organisme contre les bactéries extracellulaires et les champignons, mais participent également au maintien de l'intégrité de l'épithélium intestinal. Ils produisent majoritairement de l'IL-17A, de l'IL-17F et de l'IL-22.

1. Mécanismes moléculaires de la différenciation Th17

La différenciation des Th17 se fait en 3 étapes : une première étape d'initiation avec l'induction des facteurs de transcriptions caractéristiques du lineage Th17, une étape d'amplification de la nouvelle population, et enfin une étape de stabilisation du phénotype Th17.

i. Initiation

Les premières études *in vitro* ont montré que la présence d'IL-6 et de TGF- β entraîne la différenciation de Th0 en Th17 (Bettelli et al., 2006; Ivanov et al., 2006). Le TGF- β induit l'expression de FoxP3, le facteur de transcription caractéristique des Tregs; mais entraîne aussi la dégradation du complexe SKI/SMAD4 qui réprime l'expression ROR- γ t (Zhang et al., 2017), le facteur de transcription principal des Th17. SMAD4 réprime également ROR- α , un autre facteur de transcription majeur des Th17 (Yang et al., 2008b). Le TGF- β bloque l'induction de SOCS3 (Suppressor of Cytokine Signaling 3) qui régule la voie STAT3 (Qin et al., 2009). L'IL-

6 entraîne la phosphorylation de STAT3. pSTAT3 inhibe l'expression de FoxP3 et va se lier sur les promoteurs de ROR- γ t et de ROR- α , ce qui permet leur expression (Durant et al., 2010; Yang et al., 2008a).. L'importance de STAT3 dans les premières étapes de la différenciation en Th17 est soulignée par le fait que des souris STAT3^{-/-} sont déficientes en Th17 (Zhou et al., 2007). (**Figure 13**).

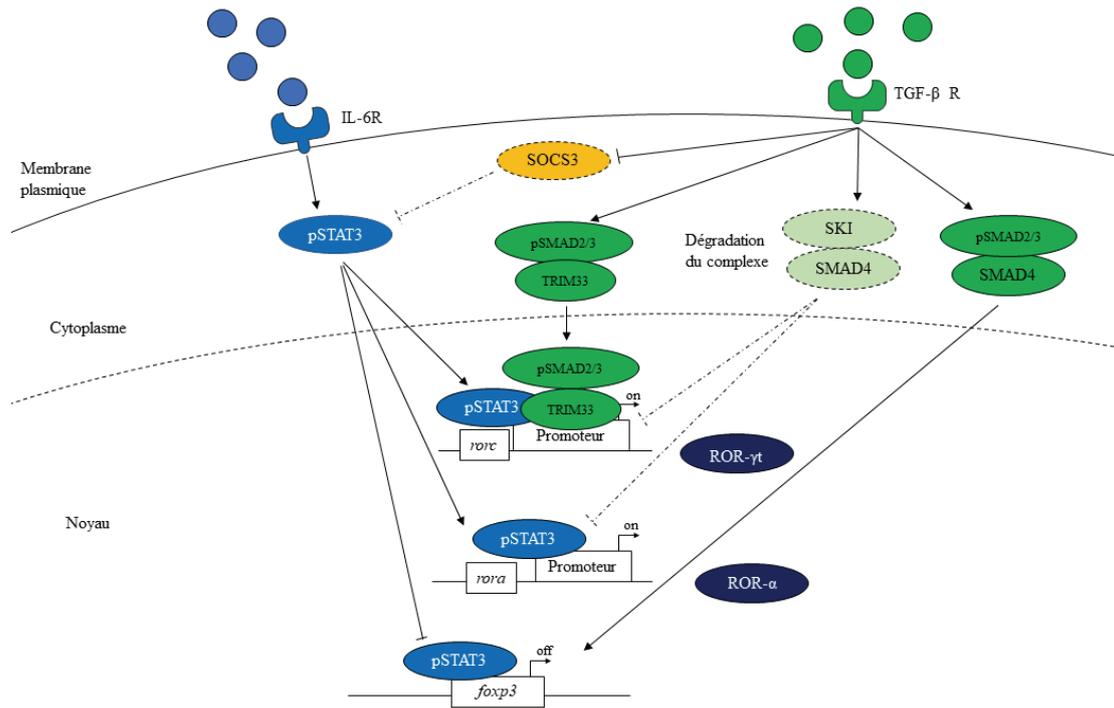


Figure 13 : Initiation de la différenciation en Th17.

La stimulation de Th0 avec du TGF- β entraîne la transcription de *foxp3* via la voie SMAD2/3-SMAD4. L'activation de la voie du TGF- β entraîne aussi la dégradation du complexe SKI-SMAD4 impliqué dans la répression de *rorc* et *rora*. La liaison de l'IL-6 sur son récepteur active la phosphorylation de STAT3 qui réprime la transcription de FoxP3 induite par le TGF- β . pSTAT3 se lie également sur les promoteurs *rorc* et *rora* afin d'entraîner leurs transcriptions. L'action de pSTAT3 est renforcé par le TGF- β qui permet la répression de SOCS3, un régulateur de la voie STAT3. L'engagement du TCR du Th0 est requis mais non représenté sur ce schéma.

ii. Amplification de la population de Th17

pSTAT3 se lie sur le promoteur de l'IL-21 et active son expression (Zhou et al., 2007) en même temps que l'expression de l'IL-21 récepteur (IL-21R). L'IL-21 agit de façon autocrine sur les Th17 et entraîne leur amplification (Wei et al., 2007); en plus de renforcer le lineage Th17 (**Figure 14**). *In vitro*, des Th0 déficients pour l'IL-21 cultivés en présence de TGF- β et

d'IL-6 ne se différencie que très peu en Th17, mais l'ajout d'IL-21 dans le milieu restaure la production d'IL-17 (Nurieva et al., 2007).

En absence d'IL-6, le TGF- β et l'IL-21 sont suffisants pour induire des Th17 (Korn et al., 2007; Nurieva et al., 2007). pSTAT3 renforce également le lineage Th17 en se fixant aussi sur les promoteurs de l'*il17a*, de l'*il17f* et de l'*il21* et en aidant à leur transcription; mais aussi en se liant sur les CNS des gènes *ccr6*, *il23r* et *il6ra* (Durant et al., 2010).

Contrairement aux autres populations de lymphocytes, l'IL-2 n'entraîne pas la prolifération des Th17 mais réprime l'expression de ROR- γ t et donc leur développement (Kryczek et al., 2007).

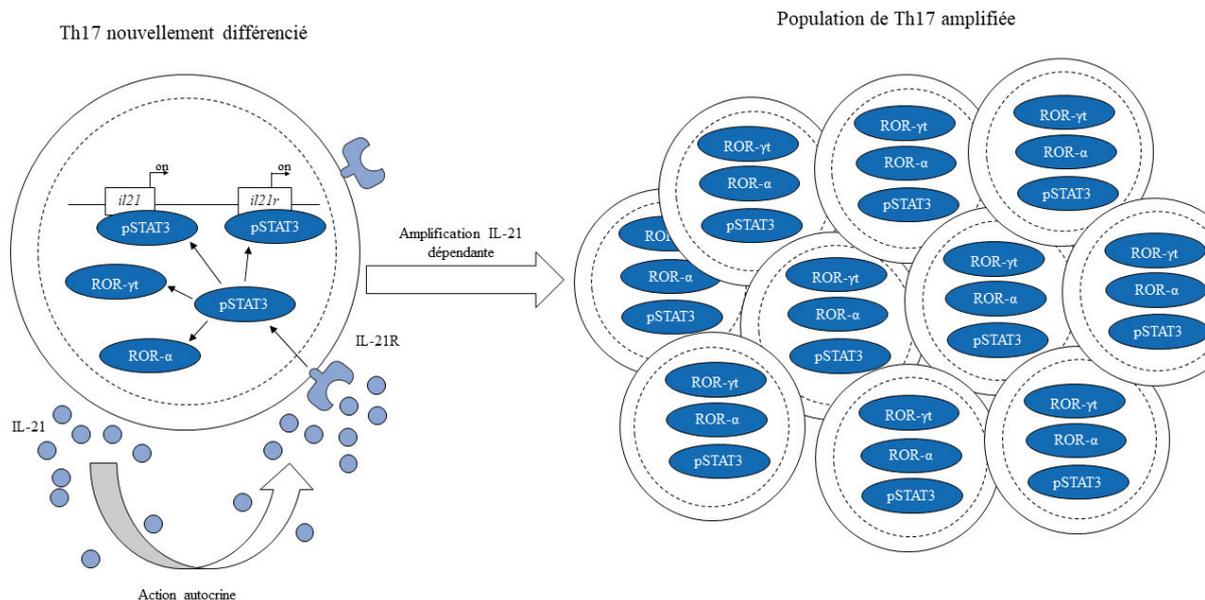


Figure 14 : Amplification de la nouvelle population de Th17 de façon IL-21 dépendante. pSTAT3 active la production de l'IL-21 qui agit sur les Th17 de façon autocrine et entraîne leur amplification. pSTAT3 étant impliqué dans l'expression de ROR- γ t et de ROR- α , l'IL-21 renforce le lineage Th17. La participation de pSTAT3 dans la transcription des gènes de l'IL-17A, de l'IL-17F, de CCR6, de l'IL-6R et de l'IL-23R n'est pas représentée sur le schéma.

iii. Stabilisation de la population de Th17

La dernière étape de la différenciation des Th0 en Th17 est une étape de stabilisation du phénotype nouvellement acquis. L'IL-23R est fortement impliqué dans ce phénomène, car plusieurs jours après avoir été générés *in vitro* les seuls Th17 qui produisent de l'IL-17 sont ceux exprimant l'IL-23R (Stritesky et al., 2008). De plus la stimulation de Th17 différenciés en présence de TGF- β et d'IL-6 avec de l'IL-23 entraîne une augmentation de la production d'IL-17 (Lee et al., 2009). Malgré son importance dans le maintien de la production d'IL-17, il a été montré que l'IL-23 seule, ou que les combinaisons IL-23/IL-6 et IL-23/TGF- β ne sont pas capables d'induire des Th17 *in vitro* (Bettelli et al., 2006).

L'IL-23R n'est pas exprimé par les T naïf et son expression est contrôlée par plusieurs facteurs dont ROR- γ t, et les cytokines qui active la voie STAT3, c'est-à-dire l'IL-21 et l'IL-6. La liaison de l'IL-23R active également la voie STAT3 ce qui renforce cette voie et entraîne une boucle d'amplification de l'expression des facteurs de transcriptions ROR- γ t et ROR- α mais aussi de l'expression de l'IL-23R ; conduisant au renforcement du lineage Th17. L'IL-23 participe également à la transcription des gènes *il17a*, *il17f*, *il21* et *cfs2* (Codarri et al., 2011; Lee et al., 2009; Teng et al., 2015; Zheng et al., 2007) (**Figure 15**).

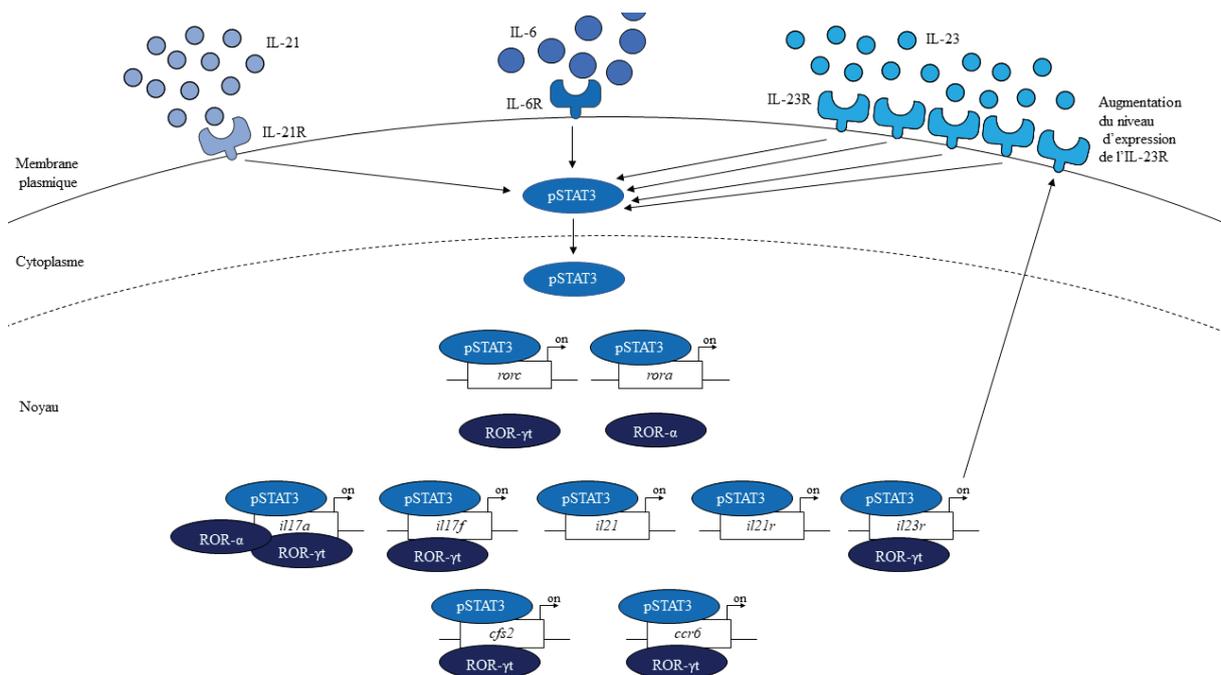


Figure 15 : Stabilisation par l'IL-23 de la nouvelle population de Th17.

pSTAT3 et ROR- γ t induisent l'expression de l'IL-23R. L'IL-23R active pSTAT3 ce qui crée une boucle d'amplification de l'expression de ROR- γ t et ROR- α , mais aussi de l'expression de l'IL-23R et des gènes signatures des Th17 comme l'IL-17A, l'IL-17F, CCR6. L'induction du TGF- β 3 par l'IL-23 n'est pas représenté.

La signalisation de l'IL-23 entraîne également l'expression d'AhR (Aryl hydrocarbon Receptor) dont le ligand est FICZ (6 formylindolo[3,2-b]carbazole). *In vitro* l'expression d'AhR et la présence de son ligand FICZ sont requis pour la production d'IL-22. L'ajout de FICZ dans des cultures de Th17 augmente également la production d'IL-17. Cependant la sur-expression d'AhR dans des CD4⁺ ne conduit pas à leur différenciation en Th17 ; et des lymphocytes AhR^{-/-} sont capables de produire de l'IL-17A (Veldhoen et al., 2008).

Enfin, il a été montré que l'IL-23 entraîne la production de TF- β 3 par les Th17 (Lee et al., 2012).

Des facteurs autres que ROR- γ t et STAT3 sont impliqués l'expression de l'IL-23R, et ont un impact positif sur le développement de Th17.

- RBPJ est une protéine de la voie Notch connue pour réguler positivement la régulation de Th17 (Yosef et al., 2013). Des Th17 déficients pour RBPJ (IL17^{CRE} RBPJ^{flx/flx} Rosa^{RFP}) n'expriment pas l'IL-23R et n'induisent qu'une pathologie modérée dans un modèle d'EAE (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis) (Meyer zu Horste et al., 2016).
- Le facteur de transcription JunB semble aussi avoir un rôle important dans le contrôle de l'expression de l'IL-23R, car l'utilisation de shARN (short hairpin Acide Ribonucléique) de JunB après différenciation de cellules en Th17 entraîne une diminution de l'expression du niveau d'ARNm de l'*il23r* (Hasan et al., 2017).
- De fortes concentrations de sel augmentent l'expression de la tyrosine kinase « Serum Glucocorticoid Kinase 1 » (SKG1) à la surface des Th17 ; un transporteur de Na⁺. SGK1 permet l'expression de l'IL-23R par les Th17 et réprime FoxO1 (Wu et al., 2013), un inhibiteur de l'IL-23R et de ROR- γ t (Lainé et al., 2015). Des souris ayant

un régime riche en sel ont plus de Th17 au sein de l'intestin grêle et du côlon que des souris avec un régime normal (Wei et al., 2017).

2. Autres acteurs impliqués dans la différenciation Th17

Bien que le TGF- β et l'IL-6 suffisent pour induire l'expression de ROR- γ t / ROR- α et donc suffisent à la différenciation de Th0 en Th17 *in vitro*, d'autres molécules interviennent afin de permettre une différenciation en Th17 plus efficace (**Figure 16**).

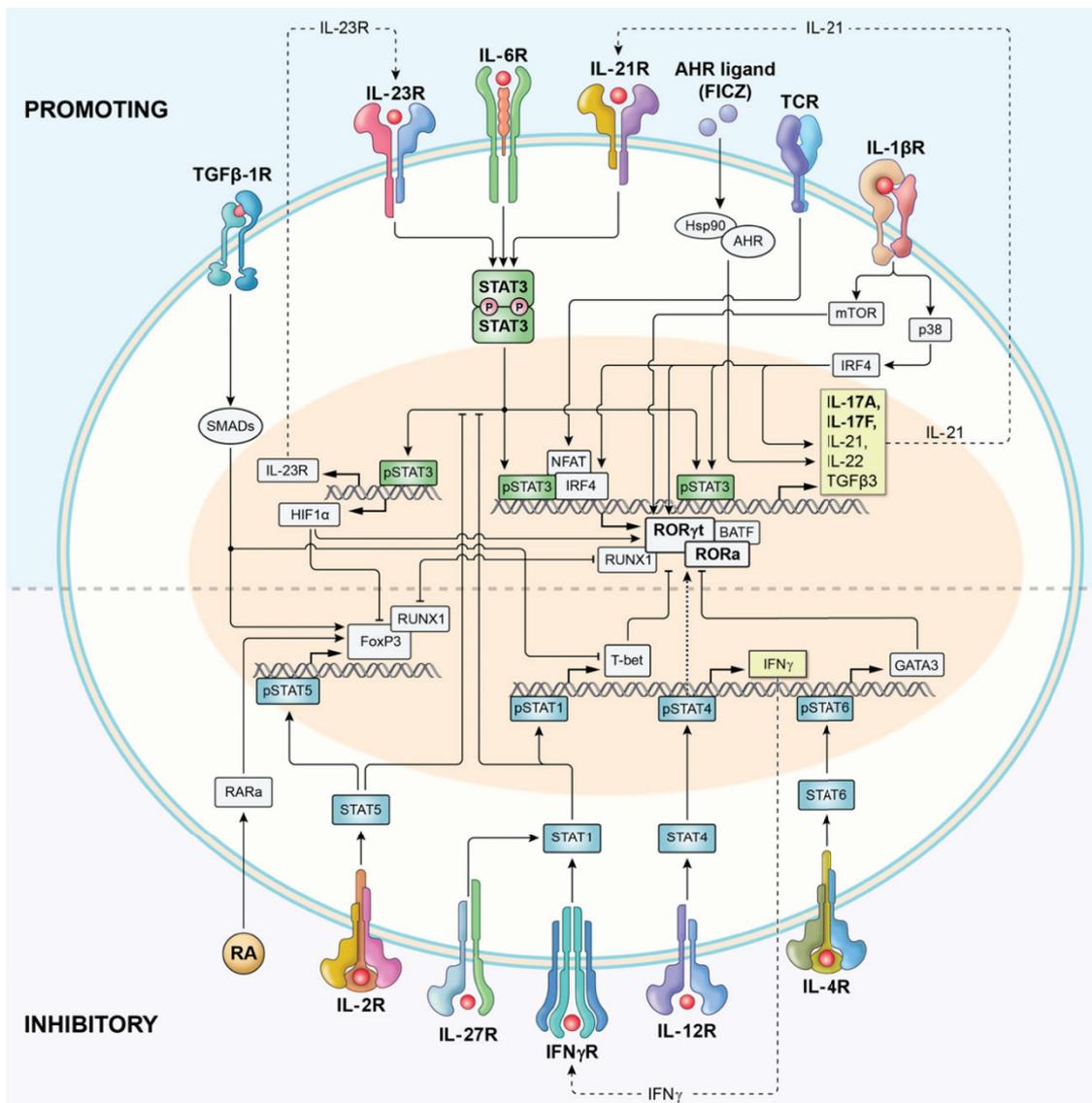


Figure 16 : Schéma représentant l'ensemble des acteurs intervenant dans la différenciation Th17 (Muranski and Restifo, 2013).

La différenciation Th17 commence quand le TCR est engagé en présence de TGF- β et de cytokines induisant STAT3 (IL-6, IL-21 ou IL-23). Le TGF- β active FoxP3 et permet la dégradation du complexe SKI/SMAD4 impliqué dans la répression du gène *rorc*. L'IL-1 β entraîne l'activation d'IRF4, et le TCR l'expression de NFAT qui aident à la transcription de *rorc* et *rora*. STAT3 entraîne aussi l'activation de HIF1- α qui inhibe FoxP3. L'IL-21 agit de façon autocrine afin de permettre l'amplification de la nouvelle population de Th17. L'IL-23 permet la stabilisation du lineage en renforçant la voie STAT3, et AhR permet la production d'IL-22. L'IFN- γ et l'IL-12, en activant les voies STAT1 et STAT4 répriment le lineage Th17 ; tout comme l'IL-4 et la voie STAT6. Enfin l'IL-2 et l'acide rétinoïque favorisent l'expression de FoxP3.

pSTAT3, un des facteurs clé de la différenciation des Th17 permet également l'expression de HIF1- α (Hypoxia-Inducible Factor 1-Alpha) qui participe directement à l'activation transcriptionnelle de ROR- γ t ; mais aussi à la dégradation de FoxP3 favorisant ainsi la différenciation en Th17 au détriment de la génération de Tregs. Une fois ROR- γ t exprimé, il peut former un complexe avec HIF1- α et p300, une histone acétyltransférase qui contribue à l'ouverture de la chromatine au niveau de gènes signature des Th17 comme l'*ill7a*. L'activité d'acétylation de p300 se fait également sur ROR- γ t ce qui permet de maintenir sa stabilité (Wu et al., 2015).

L'IL-1 β , produite par les APC en réponse à une détection de PAMPs, joue un rôle important dans la première étape de la génération des Th17, en particulier dans l'intestin. L'intestin est riche en acide rétinoïque, connu pour inhiber fortement la différenciation de Th17 via l'activation la voie STAT5 qui génère des Tregs induits. L'IL-1 β entraîne une diminution de l'expression de STAT5, et va donc permettre une meilleure induction de ROR- γ t via la voie IL-6/STAT3 (Basu et al., 2015). L'IL-1 β et le facteur de transcription Aiolos inhibent l'effet répresseur de l'IL-2 sur l'expression de ROR- γ t et de l'IL-23R, et favorise donc la génération de Th17 au détriment des Tregs (Kryczek et al., 2007). L'IL-1 β induit aussi l'expression d'IRF4 ; qui augmente la production d'IL-21 et permet une meilleure expansion des Th17.

L'engagement du TCR est requis pour la différenciation de tous les CD4. Un engagement du TCR de faible affinité et des signaux de co-stimulation modestes favorisent la différenciation de Th0 en Th17 (Bouguermouh et al., 2009; Purvis et al., 2010). Cela permet l'expression du facteur de transcription des cellules T activées (Nuclear Factor of Activated T cells ou NFATc) qui aide à la transcription de l'*ill7* (Gomez-Rodriguez et al., 2009). L'engagement du TCR induit également l'expression des co-facteurs de transcription IRF4 et BATF qui agissent avec pSTAT3 pour induire l'expression ROR- γ t (Ciofani et al., 2012) ; mais

aident également à l'ouverture de la chromatine au niveau des promoteurs des gènes *il17*, *il21* et *il22* (Schraml et al., 2009).

Le sel n'est pas le seul composant de l'alimentation qui peut avoir un impact sur la génération de Th17. Des souris ayant un régime riche en glucose ont plus de Th17 que des souris ayant un régime normal, et sont plus sensibles à des pathologies impliquant des réponses Th17 telles que l'EAE ou les colites induites par transfert adoptif de lymphocytes T (Zhang et al., 2019). Les auteurs ont montré qu'une forte concentration de glucose induit la production de ROS, et ces molécules vont permettre l'activation du TGF- β latent. Le TGF- β actif agit ensuite avec l'IL-6, entraînant une forte différenciation de Th0 en Th17. Une inhibition des ROS (Reactive Oxygen Species) s'accompagne d'une diminution des Th17 (Atarashi et al., 2015; Zhang et al., 2019), soulignant leur importance dans la génération des Th17.

3. L'importance du microbiote dans la différenciation Th17

Dans l'intestin, le développement des Th17 est microbiote dépendant, puisque des souris germ-free ne présentent que très peu, voire pas de Th17 dans l'intestin (Veldhoen et al., 2008). Cependant, toutes les bactéries ne sont pas capables d'induire des Th17, et une différence de composition de flore intestinale peut entraîner une différence importante de Th17 (Ivanov et al., 2009a).

Les bactéries segmentées filamenteuses (SFB) sont des bactéries gram positives et appartiennent à la flore commensale de l'intestin. Les SFB sont principalement situées au niveau de l'iléon et sont présentes aussi bien chez la souris que chez l'homme (Chen et al., 2018). Ces bactéries sont les premières bactéries décrites comme responsables de la génération de Th17. L'adhésion des SFB aux cellules épithéliales entraîne une sécrétion d'IL-23 qui va agir sur les ILC3 et induire leur sécrétion d'IL-22. L'IL-22 va activer STAT3 dans les cellules épithéliales intestinales et entraîner la production des protéines sérums amyloïdes A1 et A2 (SAA et SAA2) (Sano et al., 2015). Ces protéines sont captées par les cellules dendritiques CX3CR1⁺ qui vont à leur tour produire de l'IL-1 β , de l'IL-6 et de l'IL-23. Ces cytokines agissent avec le TGF- β fortement présent dans la lamina propria pour induire la différenciation de Th0 en Th17. Il est crucial que les cellules dendritiques présentent aux Th0 des antigènes

issus d'SFB pour induire leur différenciation en Th17 (Goto et al., 2014). Les Th17 induit en présence d'antigènes provenant des bactéries SFB expriment un TCR fait de la chaîne variable β numéro 14 (V β 14) (Yang et al., 2014) ; et produisent d'importantes quantités d'IL-17A et d'IL-22.

D'autres micro-organismes sont capables d'induire des Th17. Des souris germ-free gavées avec des échantillons de fèces humain développent une forte réponse Th17. En traitant ces souris avec différents antibiotiques Atarashi et collègues ont pu mettre en évidence que plusieurs souches bactériennes étaient capables d'induire des Th17 (**Tableau 5**). Certaines de ces bactéries ont été observées au contact de l'épithélium par Fluorescence In Situ Hybridization (FISH). La levure *Candida Albicans* responsable de la génération de Th17 est également un microorganisme adhérant aux cellules épithéliales intestinales. Enfin, le gavage de souris germ-free par *Citrobacter rodentium*, ou *Escherichia Coli O157* (deux souches adhérant aux cellules épithéliales intestinales) entraîne une forte réponse Th17. Cependant ces mêmes souches mutées de façon à être incapable d'adhérer aux cellules épithéliales intestinales ne sont pas capable d'induire des Th17 (Atarashi et al., 2015). Cela suggère que le contact cellules épithéliales/microorganismes est au moins aussi important que le type de microorganismes pour la génération de Th17 intestinaux.

Souches	
<i>Clostridium bolteae</i>	<i>Eubacterium</i> sp
<i>Clostridium cf. saccharolyticum</i>	<i>Erysipelotrichaceae</i> bacterium
<i>Clostridium symbiosum</i>	<i>Subdoligranulum</i> sp
<i>Clostridium hathewayi</i>	<i>Ruminococcus bromii</i>
<i>Ruminococcus obeum</i>	<i>Firmicutes</i> bacterium
<i>Ruminococcus gnavus</i>	<i>Bacteroides dorei</i>
Butyrate-producing bacterium SSC/2	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>Lactis</i>
<i>Clostridium</i> sp.	<i>Bifidobacterium breve</i>
<i>Coprobacillus</i> sp.	

Tableau 5 : Autres souches que SFB adhérentes à l'épithélium et induisant la génération de Th17 (Atarashi et al., 2015).

L'adhésion de bactéries aux cellules épithéliales intestinales entraîne l'expression de gènes impliqués dans la production d'espèces chimiques oxygénés (ROS) comme Nos2 et Duoxa2 en plus de la production de SAA1 et 2 (Atarashi et al., 2015). Ces molécules jouent un rôle important dans la différenciation de Th0 en Th17 car elles permettent le passage du TGF- β de sa forme latente à sa forme active, le rendant ainsi disponible pour les cellules (Zhang et al., 2019). L'inhibition de ces molécules bloque la génération de Th17 (Atarashi et al., 2015; Zhang et al., 2019), soulignant leur potentiel dans la génération de Th17 (**Figure 17**). Les bactéries sécrètent d'importantes quantités d'ATP (Adénosine-Triphosphate). La culture de CD4 naïfs en présence d'ATP et de cellules dendritiques entraîne la différenciation des CD4 en Th17. Les cellules dendritiques CD11c⁺ CD70^{high} expriment les récepteurs P2Y et P2X, dont l'engagement par ATP induit leur production d'IL-6, d'IL-23 et de TGF- β qui conduit à la génération de Th17 (Atarashi et al., 2008).

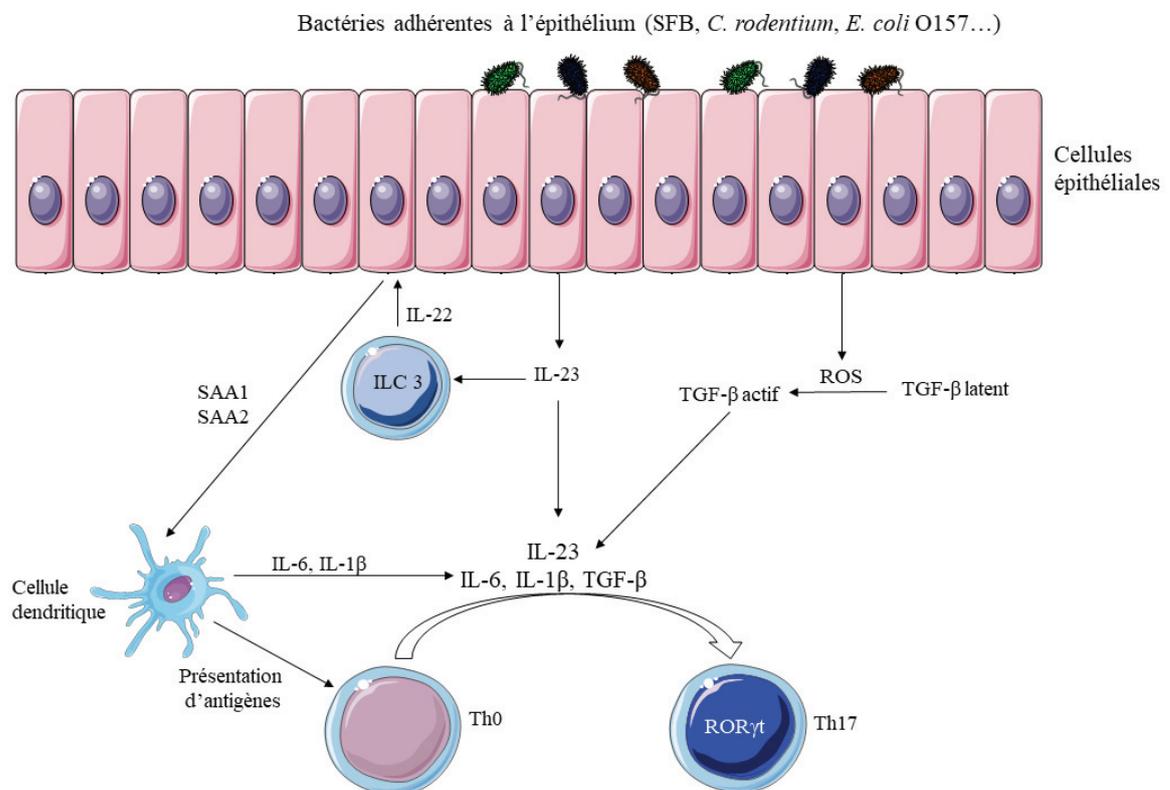


Figure 17 : Génération de Th17 en réponse au microbiote intestinal.

Lorsque des bactéries s'attachent à l'épithélium les cellules épithéliales produisent des ROS qui activent le TGF- β latent présent dans l'intestin ; et de l'IL-23 qui va agir sur les ILC3. Les ILC3 répondent aux cellules épithéliales

en produisant de l'IL-22 qui entraîne la production de SAA1 et 2. Les cellules dendritiques détectent les SAA1 et 2, et sécrètent de l'IL-6 et de l'IL-1 β . Le TGF- β actif, l'IL-6, l'IL-1 β et l'IL-23 permettent la différenciation de Th0 en Th17.

Tous les micro-organismes adhérents à l'épithélium n'induisent pas la même population de Th17. Une récente étude a mis en évidence que l'infection de souris par *Citrobacter rodentium* induit des Th17 « inflammatoires » produisant peu d'IL-17A mais beaucoup de d'IFN- γ et d'IL-22 alors que les Th17 générés en réponse à SFB sécrètent de grandes quantités d'IL-17A et de d'IL-22. De plus l'analyse transcriptomique des 2 types de Th17 révèle que ceux induits en réponse à SFB ont un niveau plus élevé de régulateurs de la croissance cellulaire et de l'apoptose comparé aux Th17 des souris infectées par *Citrobacter rodentium*. Le métabolisme des 2 populations est également différent, et les Th17 inflammatoires sont capables d'utiliser la voie de glycolyse afin d'augmenter leurs apports énergétiques. Enfin, les Th17 générés en réponse aux SFB ne sont pas capables de défendre l'organisme en cas d'infection par *Citrobacter rodentium* (Omenetti et al., 2019). Ces données indiquent des rôles distincts des Th17 en fonction des micro-organismes qui les induisent.

4. Plasticité des Th17

Bien que le lineage Th17 soit fortement stabilisé par le TGF- β et de l'IL-23, une stimulation prolongée des Th17 avec de l'IL-23 seule entraîne une diminution de la production d'IL-17 et une augmentation de la production d'IFN- γ (Lee et al., 2009), suggérant que ces cellules ont une plasticité élevée.

A l'aide d'un modèle de « fate mapping » des Th17 (souris IL-17^{CRE} Rosa26) il a été mis en évidence qu'*in vivo* le changement de phénotype des Th17 est en partie dicté par les cytokines présentes dans le milieu (Hirota et al., 2011). Lors d'infection par *Candida albicans*, les Th17 maintiennent leur production d'IL-17A et ne font pas d'IFN- γ . Cependant, en cas d'inflammation chronique comme l'EAE, les Th17 perdent leur capacité à produire de l'IL-17A et sécrètent de l'IFN- γ , mais expriment également des gènes associés aux Th1 comme *Tbx21*, *Il2rb1* et *Il2rb2*. Les auteurs ont pu mettre en évidence que le changement de phénotype des Th17 était dû à l'effet de l'IL-23 puisque que lors de l'infection par *Candida albicans* très

peu d'ARNm de l'IL-23 a été détecté, et dans le modèle d'EAE des souris déficientes pour l'IL-23 ne produisent que très peu d'IFN- γ .

In vitro l'IFN- γ et l'IL-12 participent aussi à l'acquisition d'un phénotype de Th1 par les Th17. (Lee et al., 2009; Lexberg et al., 2010). Lorsque les Th17 sont cultivés en présence d'IL-12 ils perdent très rapidement leur capacité à produire de l'IL-17 et ne font plus de l'IFN- γ (Lee et al., 2009). Des Th17 *ex vivo* ne sont pas sensibles à l'IL-12, mais leur stimulation avec de l'IFN- γ permet l'expression de l'IL-12R β 2. L'effet combiné de l'IL-12 et de l'IFN- γ permet l'expression du facteur de transcription T-bet ainsi que la production d'IFN- γ dans les Th17 (Lexberg et al., 2010).

Il y a quelques années les Th17 ont également été décrit comme capables d'acquérir un phénotype de type régulateur et d'exprimer FoxP3, qui leur permet de participer à la régulation du système immunitaires dans certaines conditions (Esplugues et al., 2011; Gagliani et al., 2015; McGeachy et al., 2007). En cas d'inflammation aigue de l'intestin les Th17 acquièrent un phénotype « régulateur », et ont un profil qui fait ressortir une expression élevée d'IL-10 et d'Ahr. En comparaison, les Th17 générés en cas d'EAE ont un profil plus inflammatoire (Esplugues et al., 2011). Richard Flavell et son équipe ont mis en évidence le fait que ces « Th17 régulateurs » interviennent lors d'infection par *Staphylococcus aureus*, *Nippostrongylus brasiliensis* ; mais qu'ils sont aussi capables de prévenir des colites induites par transfert de lymphocytes T. L'étude révèle également que le développement des Th17 régulateur est dépendant de la présence de du TGF- β 1 et de FICZ, le ligand d'Ahr (Gagliani et al., 2015).

Enfin il a été rapporté que lors d'infections parasitaires, comme par *Nippostrongylus brasiliensis*, les Th17 peuvent acquérir un phénotype de type Th2, et sécréter de l'IL-4 à la place de l'IL-17 (Gagliani et al., 2015; Panzer et al., 2012). Les mécanismes menant à cette repolarisation sont encore peu connus, mais il est possible que l'IL-4 joue un rôle via la voie STAT6.

Les Th17 sont donc une population ayant une plasticité élevée, capable d'acquérir un phénotype inflammatoire ou bien régulateur en fonction de leur environnement (**Figure 18**).

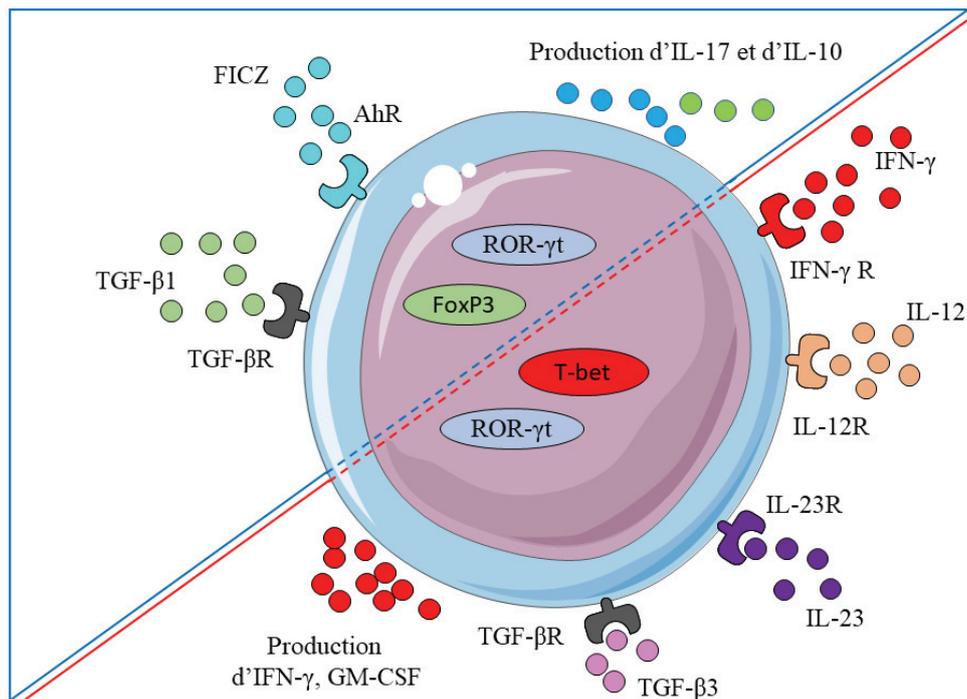


Figure 18 : Plasticité des TH17 en fonction de leur environnement.

Dans un milieu riche en TGF-β1 et en AhR ligand les Th17 acquièrent l'expression de FoxP3 en plus de ROR-γt. Ils produisent alors de l'IL-10 et de l'IL-17 et peuvent contrôler le système immunitaire.

En présence de grande quantité de d'IFN-γ ; d'IL-12, d'IL-23 et de TGF-β3 les Th17 co-expriment T-bet en plus de ROR-γt. Dans ce cas ils contribuent à l'inflammation et sécrètent de grandes quantité d'IFN-γ et peu d'IL-17.

5. Pouvoir pathogénique des Th17

Les Th17 sont associés a de nombreuses pathologies inflammatoires chroniques intestinales, ainsi qu'a plusieurs maladies auto-immunes (sclérose en plaque, polyarthrite rhumatoïde, lupus...). Des biopsies du côlon provenant de patients atteints de MICI ont révélé un enrichissement en Th17, capable de produire à la fois de l'IL-17A mais aussi de l' IFN-γ (Ueno et al., 2018). La capacité de produire à la fois de l'IL-17A et de l'IFN-γ est associée à un phénotype pathogénique des Th17, qui sont dit Th17-Th1. Ces cellules participent fortement aux pathologies intestinales.

La présence de TGF-β n'est pas obligatoire pour induire des Th17. *In vitro* un cocktail d'IL-6, d'IL-1β et d'IL-23 suffit à générer des Th17 (Ghoreschi et al., 2010; Lee et al., 2012). Il a récemment été montré que cette génération de Th17 en absence de TGF-β était dépendante

de SCR3 (Stéroïdes Receptor Coactivator-3), et des souris CD4^{CRE} Scr-3^{flx/flx} ne développent que très peu de Th17 (Tanaka et al., 2018a).

En absence de TGF- β , le facteur de transcription JunB est induit par l'IL-6 et agit de façon à faciliter la liaison de BATF (B-Cell-Activating Transcription Factor), d'IRF-4 (Interferon Regulatory Factor 4) et de pSTAT3 sur les gènes *rorc* et *il17a* afin d'entraîner la différenciation en Th17 (Hasan et al., 2017). L'absence de TGF- β au moment de la différenciation crée une population de Th17 ayant un fort pouvoir pathogène, responsable d'une pathologie plus agressive dans un modèle d'EAE (Ghoreschi et al., 2010; Lee et al., 2012). Ces Th17 générés en absence de TGF- β sont caractérisés par une forte expression du gène de l'*il23r* mais aussi de gènes associés au lineage Th1 tels que *tbx21*, *stat4*, *gzm1* et *csf2* alors que la différenciation de Th17 en présence de TGF- β favorise l'expression de *maf*, *ahr* et *il-10* (Lee et al., 2012).

En plus de son rôle dans la stabilisation du phénotype des Th17, l'IL-23R est considéré comme un important régulateur de leur pouvoir pathogène. *In vitro*, des Th17 stimulés avec de l'IL-23 après différenciation perdent capacité à produire de l'IL-17 et sécrètent de l'IFN- γ (Lee et al., 2009). Dans un modèle d'EAE, des Th17 générés en condition TGF- β 1 + IL-6 + IL-23 entraîne une EAE plus sévère que celle causée par des Th17 générés avec du TGF- β et de l'IL-6 (Lee et al., 2012). De plus, l'IL-23 entraîne la production de TGF- β 3 par les Th17. Les Th17 différenciés en présence de TGF- β 3 induisent une pathologie plus grave que les Th17 générés en présence de TGF- β 1 dans un modèle d'EAE. Le TGF- β 1 et le TGF- β 3 partagent le même récepteur, mais le TGF- β 3 active les protéines SMAD1 et SMAD5. Le rôle de ces protéines au sein de la biologie des Th17 est mal connu et mériterait d'être étudié.

Une concentration élevée de sel favorise le développement de Th17 en aidant à l'expression de l'IL-23R. Cependant, dans un modèle d'EAE des animaux ayant eu un régime riche en sel développent une forme plus agressive de la pathologie que les animaux ayant eu un régime normal (Kleinewietfeld et al., 2013; Wu et al., 2013). Ces symptômes semblent être dus à un plus grand nombre de Th17, dont le phénotype est pathogénique (Wei et al., 2017).

L'IL-23 active la voie STAT3, et des gènes comme *prdm1* codant pour le facteur de transcription Blimp1. Blimp1 renforce l'expression de l'IL-23R ce qui favorise l'acquisition d'un phénotype pathogénique. L'absence de Blimp1 dans les Th17 entraîne une EAE modérée et une diminution de la capacité des cellules à produire à la fois de l'IL-17A et de l'IFN- γ ou

de l'IL-17A et du GM-CSF (Jain et al., 2016). *In vitro* il a été montré que des Th17 *ex vivo* stimulés avec de l'IFN- γ et l'IL-12 augmentent leur niveau d'expression de T-bet, produisent plus d'IFN- γ et moins d'IL-17A (Lexberg et al., 2010) ;

La co-expression de ROR- γ t et de T-bet dans les Th17 n'est pas suffisante pour induire une production importante d'IL-17A et d'IFN- γ ; et des Th17 2D2 (exprimant un TCR spécifique du peptide de la myéline murin) générés en présence d'IL-6, d'IL-1b et d'IL-23 mais Tbx21^{-/-} n'induisent pas de pathologie dans un modèle d'EAE. La production d'IFN- γ requiert l'action de T-bet et du facteur de transcription Runx1 dont l'expression est induite par l'IL-12. T-bet et Runx1 se lient directement sur le promoteur de l'INF- γ afin de permettre son expression (Wang et al., 2014b).

Récemment, il a été montré que la molécule Fas a un rôle important dans l'acquisition du phénotype Th1 par les Th17. La délétion spécifique de Fas dans une population de Th17 (IL17^{CRE} Rosa Fas^{flx/flx}) déjà différenciée entraîne une augmentation importante des Th17, ainsi que leur capacité à produire de l'IFN- γ , la cytokine signature du lineage Th1. Les auteurs montrent que la liaison Fas/Fas ligand permet la séquestration de STAT1 au sein de DISC, à la membrane plasmique. Cela empêche la phosphorylation de STAT1 puis sa translocation dans le noyau où il peut se lier à pSTAT3 et perturber son action afin de favoriser le programme Th1. De façon intéressante, la délétion de Fas n'a pas d'impact sur la production d'IL-17A (Meyer zu Horste et al., 2018).

VI. Le Transforming Growth Factor β

Le TGF- β est une cytokine multifonctionnelle et ubiquitaire hautement conservée, présente en grande quantité dans l'intestin des mammifères. Elle intervient dans la différenciation cellulaire, la prolifération, la migration, la survie, l'apoptose, l'embryogénèse, la modulation de l'inflammation et la réparation tissulaire. Dans l'intestin le TGF- β est produit par les cellules épithéliales, et les cellules du système immunitaires en particuliers les cellules dendritiques et les Tregs. Les Th17 peuvent également sécréter du TGF- β (Bauché and Marie, 2017; Kashiwagi et al., 2015; Lee et al., 2012).

Il existe 3 isoformes du TGF- β : le TGF- β 1, le TGF- β 2 et le TGF- β 3. Ces 3 isoformes partagent le même récepteur mais ont des effets biologiques différents. Des souris déficientes en TGF- β 1 meurent à l'âge de 3 semaines à cause d'une auto-immunité générale, indiquant que le TGF- β 1 agit principalement sur les cellules du système immunitaire (Shull et al., 1992). Le TGF- β 2 et le TGF- β 3 sont plutôt impliqués dans le développement osseux et vasculaire (Bauché and Marie, 2017). Le TGF- β 3 peut être produit par les Th17 et semble avoir un impact sur et leur pathogénicité (Lee et al., 2012).

1. Rôle du TGF- β sur les cellules du système immunitaire

Le TGF- β a une action inhibitrice sur de nombreuses cellules du système immunitaire comme les cellules dendritiques et les macrophages dont il bloque la prolifération et diminue l'expression des molécules de CMH, ce qui entraîne une diminution de l'activation des LT. Il inhibe également la prolifération et la fonction cytotoxique des NK (Ghiringhelli et al., 2005) et des LT CD8 (Thomas and Massagué, 2005), l'expansion des LB et leur capacité à produire des immunoglobulines de type A (Cazac).

Le TGF- β influence la différenciation des Th0. Il réprime l'expression des facteurs de transcription T-bet et GATA-3, et donc la différenciation en Th1 et en Th2 (Gorelik et al., 2000, 2002). A l'inverse il permet la génération de Th9 en présence d'IL-4 (Dardalhon et al., 2008). De plus le TGF- β est impliqué dans la différenciation de Tregs en périphérie (Chen et al., 2003; Schlenner et al., 2012) et des Th17 en présence d'IL-6 (Bettelli et al., 2006) (**Figure 19**). Une concentration élevée de TGF- β favorise la différenciation en Treg, et une concentration plus faible est associée au développement de Th17.

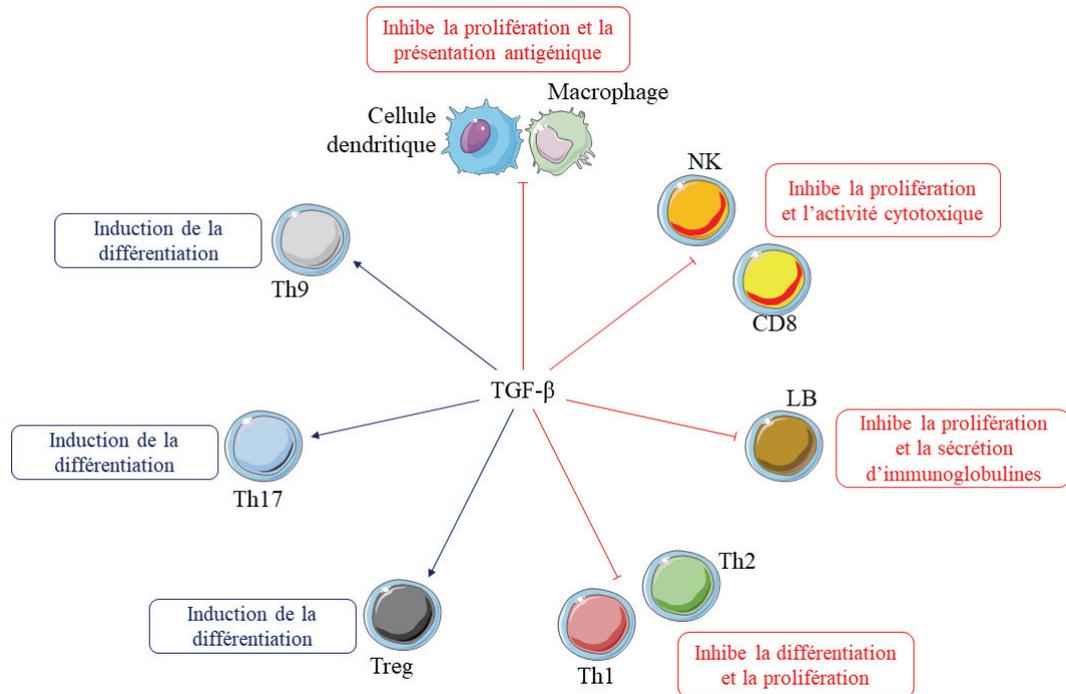


Figure 19 : Effet du TGF- β sur les différentes cellules du système immunitaire.

Le TGF- β inhibe les fonctions et la prolifération des cellules comme les Th1, Th2, CD8, NK, macrophages et cellules dendritiques. Il permet la différenciation de Tregs, Th17 et Th9.

2. Sécrétion et activation du TGF- β

i. Sécrétion sous forme inactive

Les 3 isoformes du TGF- β sont synthétisées sous forme inactives appelées pré-pro TGF- β . Le pré-pro TGF- β est constitué d'un peptide signal en région N-terminale, d'une séquence appelé LAP (Latence Associated Protein) puis du TGF- β mature en région C-terminale. Le peptide signal permet l'envoi du complexe au réticulum endoplasmique où il sera clivé par une protéine de type furine (Pesu et al., 2008). Il se forme un dimère LAP- TGF- β appelé pro TGF- β . LAP entoure le TGF- β et masque le site de liaison à son récepteur, rendant la protéine inactive (Travis and Sheppard, 2014). Lors de sa sécrétion le pro- TGF- β peut se lier à la protéine LTBP (Latence TGF- β Binding Protein) qui permet son stockage au sein du milieu extracellulaire (Worthington et al., 2015) (**Figure 20**).

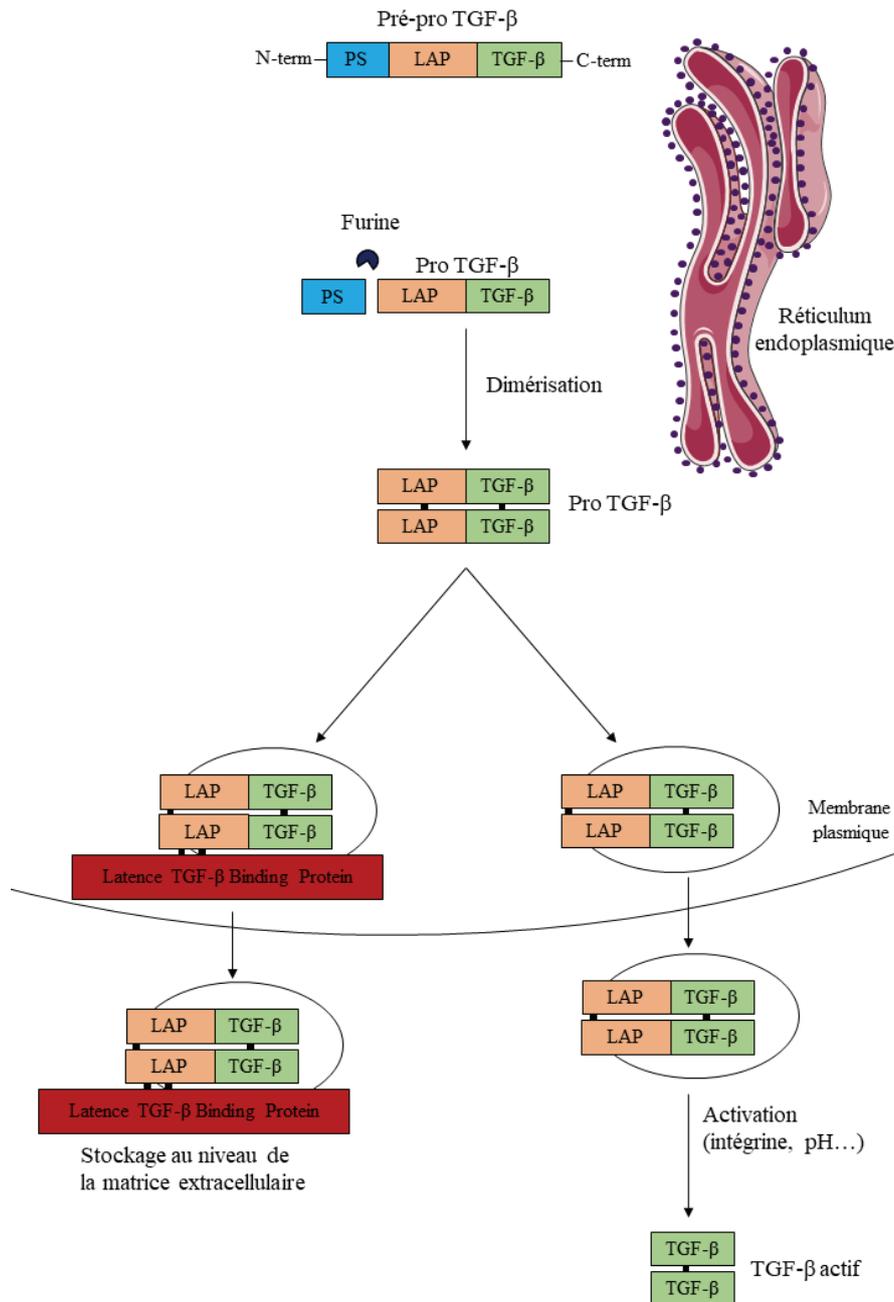


Figure 20 : Synthèse et sécrétion du TGF-β.

Le TGF-β est synthétisé sous forme de pré-pro-TGF-β, constitué d'une peptide signal, d'une région de latence (LAP) et de la cytokine mature. Le peptide signal situé en N-terminal permet l'envoi du pré-pro-TGF-β au réticulum endoplasmique où il sera clivé par une furine. Il se forme alors un dimère de LAP-TGF-β mature. LAP entoure le TGF-β mature et masque son site de fixation au TGF-β RII. Le complexe LAP-TGF-β peut être sécréter dans le milieu extracellulaire seul ou associé à la protéine « Latence TGF-β Binding Protein » ce qui va permettre son stockage au sein de la matrice extracellulaire. Des facteurs comme l'intégrine-β8, le pH ou les métalloprotéases clive le complexe LAP- TGF-β mature, rendant la cytokine capable de se lier sur son récepteur.

ii. Activation du TGF- β

L'activation du TGF- β correspond au clivage de LAP et du TGF- β , afin de rendre accessible le site de fixation au TGF- β RII. Plusieurs facteurs peuvent intervenir dans ce phénomène, comme les intégrines et les métalloprotéases mais aussi les conditions physico-chimiques du milieu.

Dans l'intestin les cellules dendritiques CD103⁺ et les Tregs expriment l'itg β 8 et sont les principaux activateurs du TGF- β . Des souris dont les cellules hématopoïétiques n'expriment pas l'itg β 8 souffrent à l'âge de 10 mois d'une forte inflammation du côlon, démontrant l'importance de l'itg β 8 et du TGF- β dans le maintien de l'homéostasie intestinale (Worthington et al., 2011, 2015). L'itg β 8 reconnaît et lie la séquence RDG sur LAP et agit avec la métalloprotéase MMP14 afin de cliver LAP et libérer le TGF- β . Des inhibiteurs des protéases bloquent l'activation du TGF- β . Les intégrines $\alpha\beta$ 5 et $\alpha\beta$ 6 peuvent activer le TGF- β . Ces molécules sont reliées aux filaments d'actine du cytosquelette et se lient à LAP via le motif RGD. Les mouvements du cytosquelette sont transmis par les intégrines à LAP et entraînent la libération du TGF- β (Wipff et al., 2007). D'autres molécules comme la thrombospondine 1 sont capables d'activer le TGF- β . La thrombospondine 1 se lie au peptide LAP ce qui perturbe les liaisons LAP-TGF- β et permet la libération de la cytokine (Travis and Sheppard, 2014). Enfin les conditions physico-chimiques du milieu peuvent entraîner une activation du TGF- β . La présence de ROS (Zhang et al., 2019) ou un pH acide (Lyons, 1988) entraînent une dénaturation protéique de LAP, ce qui libère le TGF- β et le rend disponible pour les cellules avoisinantes.

3. Signalisation et régulation du TGF- β

Le récepteur au TGF- β est fait de 2 sous unités : le TGF- β RI et le TGF- β RII. Le TGF- β se lie sur le TGF- β RII qui s'auto-phosphoryle et forme un dimère avec le TGF- β RI. Lors de l'assemblage des 2 sous unités le TGF- β RII phosphoryle le TGF- β RI. Plusieurs voies peuvent ensuite être activées par la phosphorylation du TGF- β RI : la voie canonique des protéines SMAD, ou bien les voies non canoniques indépendantes des protéines SMAD (**Figure 21**).

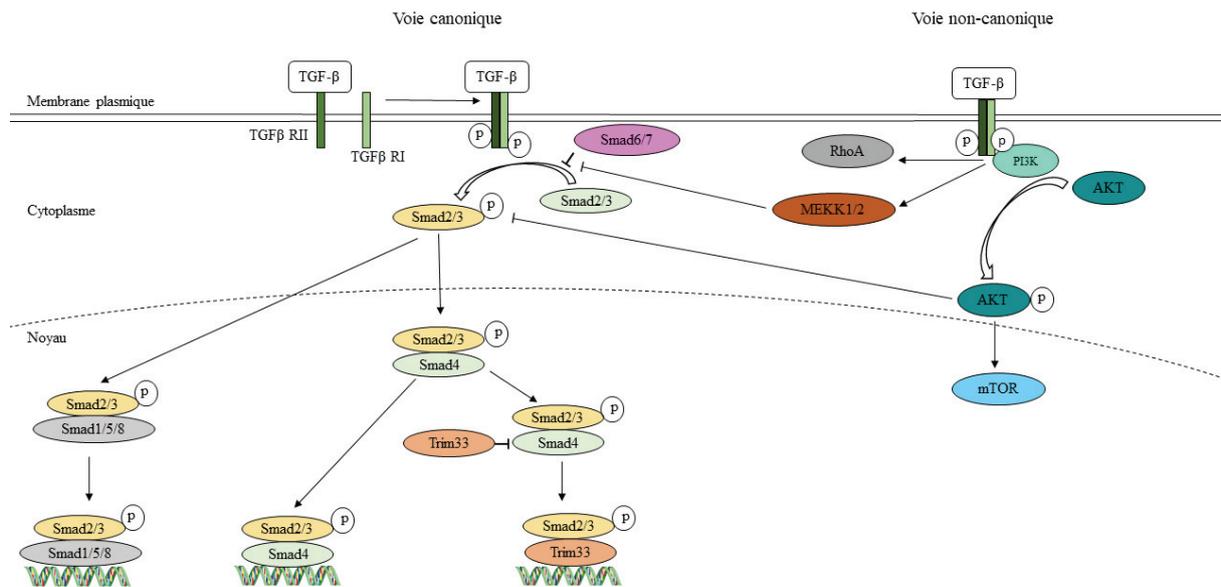


Figure 21 : Signalisation des voies canonique (gauche) et non canonique (droite) de la signalisation du TGF- β .

Le récepteur au TGF- β est fait de 2 sous-unités : le TGF- β RI et le TGF- β RII. Le TGF- β se lie sur TGF- β RII qui va s'auto-phosphoryler puis phosphoryler et s'associer au TGF- β RI. Lors de l'activation des voies canonique le TGF- β RI phosphorylé active la protéine R-SMAD2/3 qui peut ensuite migrer dans le noyau et former un complexe avec SMAD4 pour activer la transcription de gènes cibles. Dans le noyau la protéine TRIM33 peut prendre la place de SMAD4 et activer la transcription de gènes différents. SMAD2/3 peut également interagir avec les protéines SMAD1/5/8.

L'activation des voies non canonique passe par la voie PI3K/AKT, RhoA ou des MAPkinase comme les protéines MEKK1 et MEKK2. Parmi les gènes cibles du TGF- β se trouvent les I-SMAD qui sont les protéines SMAD6 et 7. Elles régulent négativement la signalisation du TGF- β en bloquant l'activation des R-SMAD ou en déphosphorylant le TGF- β RI. Certains acteurs de la voie de signalisation non canonique (MEKK1,2, AKT) bloquent l'activation de SMAD2/3.

i. Voie canonique

Une fois activé le TGF- β RI phosphoryle les protéines R-SMAD qui sont associées au récepteur. Les R-SMAD sont les protéines SMAD1, 2, 3, 5 et 8. La phosphorylation des R-SMAD entraîne leur dissociation du récepteur. Les protéines SMAD2/3 ou SMAD1/5/8 interagissent ensuite avec la protéine SMAD4 via leur motif MH2. Les complexes SMAD2/3-SMAD4 et SMAD1/5/8-SMAD4 migrent ensuite dans le noyau où ils se lient à l'ADN grâce aux motifs MH1 et activent la transcription de gènes cibles de SMAD4. SMAD4 peut interagir

avec la protéine SKI, et le complexe SKI/SMAD4 réprime ROR- γ t. Des souris CD4^{CRE} SMAD4^{flx/flx} ont plus de Th17 que des souris WT (Zhang et al., 2017).

Dans le noyau la protéine TRIM33 (Tripartite Motif Containing 33) peut entraîner en compétition avec SMAD4 et de lier sur le complexe SMAD2/3 à sa place. Le complexe SMAD2/3-TRIM33 entraîne la transcription de gènes différents des gènes cible de SMAD4. Ce complexe est impliqué dans l'acquisition d'un phénotype pathogénique des Th17, en réprimant l'expression de du gène de l'IL-10 (Tanaka et al., 2018b).

ii. Voie non canonique

Les voies non canoniques impliquent les protéines comme PI3K/AKT, ERK, les MAPkinases ou encore RhoA (Zhang, 2009). Plusieurs de ces molécules sont impliquées dans la biologie des Th17.

In vitro, la différenciation de Th17 entraîne l'augmentation de molécules comme AKT lors de la première 1h de différenciation, et de mTOR au bout de 24h. De plus, l'ajout d'inhibiteur de ces molécules dans les cultures inhibe la différenciation Th17 suggérant un rôle important de ces molécules dans la génération de Th17 (Hasan et al., 2015). Les auteurs décrivent également une forte augmentation de p38 une molécule impliquée dans la voie de MAPKinase. Cependant ces résultats sont en contradiction avec ceux d'une autre étude qui montre que des T déficients en p38 se différencient aussi en Th17 comme les T normaux (Huang et al., 2012).

Toutes les molécules des voies de signalisation non canonique n'agissent pas en faveur de la différenciation Th17. Parmi les MAPKinases interviennent les protéines MEKK2 et MEKK3 dont les gènes sont *map3k2* et *map3k3*. Des souris LCK^{CRE} *map3k2*^{flx/-} *map3k3*^{-/-} ont plus de Th17 que des souris WT, suggérant un effet négatif de ces protéines dans la différenciation Th17 (Chang et al., 2011). Les auteurs ont montré que MEKK2 et MEKK3 induisaient la phosphorylation des R-SMAD qui régulent l'activation des voies canonique du TGF- β . Une diminution de l'activation des protéines des voies canoniques entraîne une diminution de l'expression de ROR- γ t, car le complexe SKI/SMAD4 n'est pas dégradé et continue de réprime le gène *rorc* (Zhang et al., 2017).

L'ensemble des voies de signalisation du TGF- β , constitue un réseau complexe, et leur implication dans la biologie des Th17 n'est pas encore totalement clair. D'autres études sont nécessaires afin de déterminer avec précision quels sont les acteurs et les mécanismes moléculaires de ces voies impliqués dans la biologie des Th17.

iii. Régulation de la signalisation du TGF- β

Parmi les gènes cible des protéines SMAD se trouvent les gènes codant pour les protéines SMAD6 et SMAD7, qui sont dites I-SMAD. Les I-SMAD régulent la voie du TGF- β en via compétition avec les R-SMAD pour leur fixation sur le TGF- β RI mais également en induisant un dé-phosphorylation du récepteur (Miyazawa and Miyazono, 2017).

Les voies non canoniques interviennent aussi dans le contrôle de la signalisation du TGF- β . Les protéines MEKK2 et MEKK3 participent à la phosphorylation des R-SMAD et (Chang et al., 2011), et la protéine AKT empêche la phosphorylation de SMAD3 et sa translocation dans le noyau (Zhang, 2009), bloquant donc à la régulation de la voie canonique du TGF- β .

VII. Problématique : Implication du TGF- β dans la biologie des Th17

Le rôle du TGF- β dans la biologie des lymphocytes Th17 n'est pas clair. Les premières études *in vitro* ont démontré que la présence de TGF- β et d'IL-6 était nécessaire à la génération de ces cellules (Ivanov et al., 2006; Mangan et al., 2006; Veldhoen et al., 2008). *In vivo*, des souris dont les CD4 ne répondent pas au TGF- β (CD4^{CRE} TGF- β RII^{flx/flx}) sont incapables de générer des Th17 (Hasan et al., 2015; Zhang et al., 2017), ce qui semble confirmer le besoin de TGF- β dans la différenciation Th17. Les Th17 sont capable de produire du TGF- β 1. Le co-transfert de cellules souches hématopoïétique de souris sauvages et de souris dont les lymphocytes sont incapables de produire du TGF- β 1 (CD4^{CRE} TGF- β 1^{n/flx}) montre une très faible génération de Th17 dans les cellules ne sécrétant pas de TGF- β 1 (Gutcher et al., 2011). Ces données démontrent l'importance du rôle intrinsèque du TGF- β 1 dans la différenciation de

Th17. Au niveau moléculaire, de récentes études ont mis évidence le fait que le TGF- β permet l'expression de ROR- γ t et ROR- α , le facteur de transcription caractéristique des Th17 de façon directe via la liaison de TRIM33 sur *rora* (Tanaka et al., 2018b); mais aussi indirecte en dégradant le complexe SKI/SMAD4 impliqué dans la répression de *rorc* et *rora*.

Si ces données sont en faveur d'un rôle indispensable TGF- β du dans la différenciation de Th17, d'autres études sont en faveur du contraire. Plusieurs groupes ont montré qu'en l'absence de TGF- β un cocktail d'IL-6, d'IL-1 β et d'IL-23 est suffisant pour induire la différenciation de Th0 en Th17 *in vitro* (Bettelli et al., 2006; Ghoreschi et al., 2010; Lee et al., 2012). Ces données laissent suggérer que dans certaines conditions la présence de TGF- β pourrait ne pas être requise pour la différenciation Th17. L'article 1, auquel j'ai contribué cherche à déterminer quelles sont ces conditions.

Dans des modèles d'EAE les Th17 obtenus en absence de TGF- β induisent des pathologies plus sévères que des Th17 générés en présence de TGF- β (Ghoreschi et al., 2010). Le rôle important du TGF- β 1 a été mis en évidence dans la différenciation des Th17 (Gutcher et al., 2011), mais le TGF- β 3 peut également générer ces cellules (Lee et al., 2012). De plus, les Th17 obtenus en présence de TGF- β 3 montrent un pouvoir pathogène plus important en cas d'EAE (Lee et al., 2012). S'il semble clair que le TGF- β a le pouvoir d'influencer les Th17 au moment de leur différenciation, nous disposons de peu d'informations à propos du rôle du TGF- β dans la biologie des lymphocytes T déjà différenciés. Les résultats présentés au sein de l'article 2 ont pour but de déterminer comment le TGF- β influence la biologie des Th17 déjà différenciés.

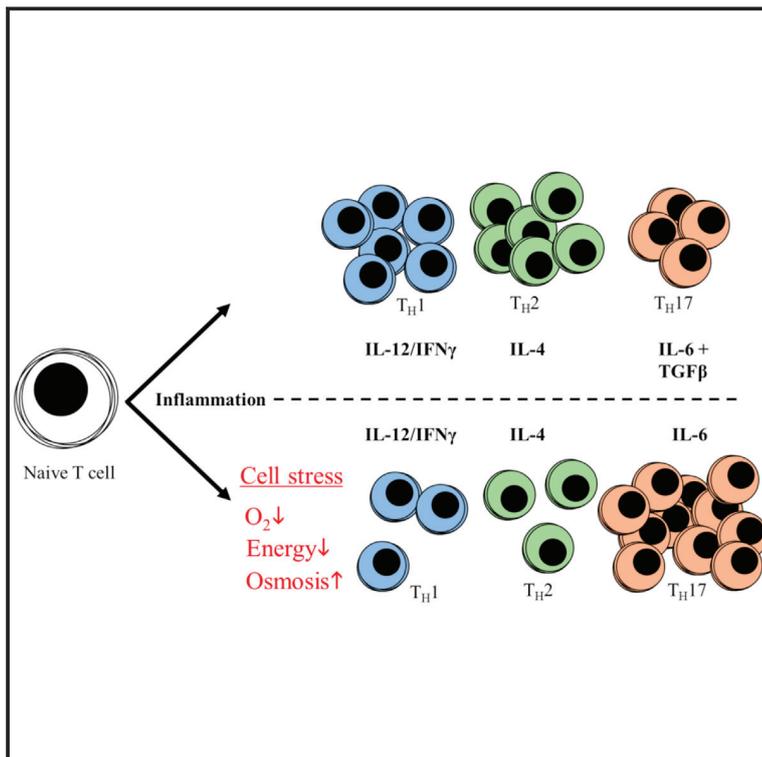
RESULTATS

I. **Article 1 : Cellular stress in the context of an inflammatory environment supports TGF- β independent T Helper-17 differentiation**

Cell Reports

Cellular Stress in the Context of an Inflammatory Environment Supports TGF- β -Independent T Helper-17 Differentiation

Graphical Abstract



Authors

Verena Brucklacher-Waldert, Cristina Ferreira, Marisa Stebegg, Olivier Fesneau, Silvia Innocentin, Julien C. Marie, Marc Veldhoen

Correspondence

marc.veldhoen@medicina.ulisboa.pt

In Brief

Brucklacher-Waldert et al. show how environmental conditions resulting in cellular stress, such as low metabolite levels, specifically enhance Th17 cell differentiation. Under inflammatory conditions, this stress can substitute for TGF- β signaling resulting in de novo Th17 cell differentiation.

Highlights

- Limited metabolite availability results in cellular stress
- Cellular stress enhances Th17 cell polarization
- Cellular stress induces de novo Th17 cell differentiation
- Cellular stress can substitute for TGF- β in Th17 cell differentiation

Accession Numbers

E-MTAB-5692



Cellular Stress in the Context of an Inflammatory Environment Supports TGF- β -Independent T Helper-17 Differentiation

Verena Brucklacher-Waldert,^{1,8} Cristina Ferreira,^{1,2,8} Marisa Stebegg,¹ Olivier Fesneau,^{3,4,5,6} Silvia Innocentin,¹ Julien C. Marie,^{3,4,5,6,7} and Marc Veldhoen^{1,2,9,*}

¹Laboratory for Lymphocyte Signalling and Development, The Babraham Institute, Cambridge CB22 3AT, UK

²Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, Instituto de Medicina Molecular, Av. Professor Egas Moniz, Lisbon 1649-028, Portugal

³Immunology Virology and Inflammation Department, Cancer Research Center of Lyon UMR INSERM1052, CNRS 5286 28 rue Laennec, Lyon 69373, Cedex 08, France

⁴Université Lyon 1, Lyon 69000, France

⁵Centre Léon Bérard, Lyon 69008, France

⁶Labex DEVweCAN, Lyon 69008, France

⁷TGF β and Immuno-Evasion Group, German Cancer Research Center (DKFZ), 69120 Heidelberg, Germany

⁸These authors contributed equally

⁹Lead Contact

*Correspondence: marc.veldhoen@medicina.ulisboa.pt

<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2017.05.052>

SUMMARY

T helper-17 (Th17) cells are associated with inflammatory disorders and cancer. We report that environmental conditions resulting in cellular stress, such as low oxygen, glucose, and isotonic stress, particularly enhance the generation of Th17 cells. Pharmacological inhibition of cell stress reduces Th17 cell differentiation while stress inducers enhance the development of Th17 cells. The cellular stress response results in Th17 cell development via sustained cytoplasmic calcium levels and, in part, XBP1 activity. Furthermore, in an inflammatory environment, conditions resulting in cell stress can bring about de novo Th17 cell differentiation, even in the absence of transforming growth factor β (TGF- β) signaling. In vivo, cell stress inhibition enhances resistance to Th17-mediated autoimmunity while stress-exposed T cells enhance disease severity. Adverse metabolic environments during inflammation provide a link between adaptive immunity and inflammation and may represent a risk factor for the development of chronic inflammatory conditions by facilitating Th17 cell differentiation.

INTRODUCTION

T cell function is tightly controlled by factors encountered in the micro-environment and specifically tailored to successfully orchestrate a response against invading microorganisms and their products. The set of instructions for antigen-inexperienced CD4⁺ T cells to differentiate into several defined T helper (Th) lineages, each with specific job descriptions (Veldhoen,

2009), has largely focused on cytokines as well as strength of signaling from the T cell receptor and co-receptors (Zygmunt and Veldhoen, 2011). Several Th subsets are now well defined, including Th1, Th2, follicular helper T cells (Tfh), regulatory T cells (Treg), and Th17 cells. Although the strict divide between subsets has been blurred in recent years, each T cell subset is characterized by transcription factors important for lineage differentiation and maintenance as well as the production of particular cytokines, chemokines, and the expression of cell surface receptors.

Th17 cells are directly implicated in a variety of inflammatory diseases, autoimmune disorders, and cancers (Brucklacher-Waldert et al., 2014; Grivnenkov et al., 2012; Kryczek et al., 2009; Veldhoen, 2009). They are characterized by the expression of interleukin (IL)-17 and transcription factors of the retinoic acid receptor (RAR)-related orphan receptor (ROR) family, ROR α and ROR γ t. The differentiation of Th17 cells appears to uniquely require the presence of two cytokines—IL-6 and transforming growth factor β (TGF- β) (Veldhoen et al., 2006a). The pro-inflammatory cytokine and acute phase protein IL-6, although IL-21 can substitute in some cases (Korn et al., 2007), is required to initiate the Th17 differentiation program but only in the presence of TGF- β (Bettelli et al., 2006; Mangan et al., 2006; Veldhoen et al., 2006a). IL-6, via its receptor and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signaling, is now well known to be important for murine and human Th17 differentiation (de Beaucoudrey et al., 2008; Harris et al., 2007; Ma et al., 2008; Stockinger and Veldhoen, 2007). Due to the largely anti-inflammatory and cell-cycle inhibitory nature of TGF- β , its role in Th17 cell differentiation remained controversial (Acosta-Rodriguez et al., 2007; Wilson et al., 2007), however, it can contribute to human Th17 cell differentiation as well (Manel et al., 2008; O'Garra et al., 2008; Volpe et al., 2008; Yang et al., 2008). The role of TGF- β in Th17 cell differentiation is not well understood. Although TGF- β signaling



via the TGF- β R-complex is important (Veldhoen et al., 2006a, 2006b), the downstream signaling components, SMAD2, SMAD3, and SMAD4 (Derynck and Zhang, 2003) have been shown to be non-essential for Th17 cell development (Ghoreschi et al., 2010; Hahn et al., 2011; Ichiyama et al., 2011). The description of Th17 cells generated in the absence of TGF- β signaling underscored that an alternative pathway for Th17 cell development, without the involvement of TGF- β , may exist (Ghoreschi et al., 2010).

Th17 cells are enriched at sites of chronic inflammation, such as arthritic synovia, and the local environment in the synovia has been reported to be able to enhance their differentiation (Egan et al., 2008; Nistala et al., 2010). Similarly, chronic inflammatory conditions are required in the Th17 cell-dependent mouse model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) to sustain autoimmunity (Veldhoen et al., 2006b). Th17 cells are also found in many tumor infiltrates (Grivennikov et al., 2012; Kryczek et al., 2009), suggesting that microenvironments with altered metabolite availability such as found in tumors (DeBerardinis et al., 2008), may preferentially recruit Th17 cells or support the Th17 cell lineage differentiation program. In line with this hypothesis, changes in the local environment have recently been shown to influence Th17 cells (Dang et al., 2011; Kleinewietfeld et al., 2013; Shi et al., 2011; Wu et al., 2013).

How alterations in the local environment may influence the differentiation of naive CD4⁺ T cells into the Th17 cell lineage is not well understood. The rate of biomolecule synthesis in all cells, which impacts on cell differentiation, survival, and ability to secrete products, is known to be synchronized with nutrient availability (Kaufman et al., 2002). The coordination between metabolite availability and requirement takes place in the endoplasmic reticulum (ER). Imbalance between nutrient availability and biomolecule demand can result in cellular stress such as ER-stress. The ER-stress response, or unfolded protein response (UPR), is initiated to restore ER function, upon viral infection, hypoglycemia, hypoxia, and osmotic disturbance thereby enabling cell survival (Kaufman et al., 2002). In this paper, we show that reduction in availability of metabolites such as glucose and oxygen and increased ionic pressure can enhance Th17 cell differentiation. This is in stark contrast to other Th effector cell subsets as well as Treg cell differentiation, the polarization of which are either inhibited or not affected under these conditions. We show that the decrease in availability of metabolites ultimately results in cellular-stress and increased and sustained levels of cytoplasmic calcium. Inhibition of cellular stress signaling branches highlighted the importance of cell stress in enhancing Th17 cell differentiation under altered environmental conditions. Furthermore, we provide evidence that cellular stress can be responsible for de novo differentiation of Th17 cells in an inflammatory context, even in the absence of TGF- β signaling, with enhanced plasticity toward Th1-like cells. Our data indicate that inflammatory environments in combination with cellular stress are very conducive to the differentiation of Th17 cells, thereby potentially tipping the balance toward a more severe inflammatory response accompanied by aggravated immunopathology.

RESULTS

Reduced Glucose Metabolism Enhances Th17 Cell Differentiation

To address how conditions of altered metabolite availability may affect Th cell generation and function, we cultured naive CD4⁺ T cells under conditions of limited glucose metabolism with the help of the glucose analog and competitive inhibitor 2-deoxyglucose (2DG). Th1, Th2, and iTreg cell differentiation, analyzed by signature cytokine and transcription factor expression levels, was dose-dependently inhibited by 2DG, ultimately resulting in cell death at concentrations above 1 mM (Figures 1A, 1B, and S1A). In stark contrast, Th17 cell differentiation, analyzed via IL-17 and ROR γ t transcripts and protein, was dose-dependently enhanced in the presence of 2DG, without marked effects on survival or proliferation (Figures 1A, 1B, and S1B and data not shown). We did not observe Treg cell polarization under Th17 cell differentiation conditions in the presence of 2DG (Figure S1C) and confirmed the dose-dependent inhibition of glycolysis by 2DG via the inhibition of lactate production (Figure S1D). 3-Bromopyruvic acid (BrPA), an aerobic glycolysis inhibitor acting via inhibition of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Cardaci et al., 2012), had a very similar effect to 2DG on Th cell differentiation. It inhibited the polarization and cell viability of Th1 and Treg cells while robustly increasing Th17 cell polarization (Figure 1C).

IL-2 is a T cell autologous factor required for proliferation and survival of most T lymphocytes but inhibits Th17 cell polarization (Laurence et al., 2007). Its inhibition under adverse metabolic conditions could explain the inhibition of Th1, Th2, and Treg cells while enhancing Th17 cell polarization. However, upon Th cell subset polarization from naive precursors in the presence of 2DG or BrPA IL-2, transcript and protein levels were found boosted in all Th subsets compared with controls (Figures 2A, 2B, and S2A). IL-2 neutralization during Th17 cell differentiation did not alter 2DG's ability to enhance Th17 cell development (Figure 2C). A consequence of reduced glucose metabolism could be the surface expression level of the high-affinity IL-2 receptor (IL-2R α , CD25) (Datema and Schwarz, 1978). The presence of IL-2R α was dose-dependently inhibited by 2DG and BrPA in all Th subsets, in contrast to CD69 expression (Figures 2D and S2B). Conform reduced presence of the IL-2R α on the cell surface upon T cell activation, the IL-2 response mediated by phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)5 was 2DG dose-dependently reduced in Th17 cells (Figure S2C). Because IL-2 is an important factor in Th1, Th2, and iTreg cell differentiation as well as for T cell survival (Moriggi et al., 1999), the reduced IL-2 responsiveness could explain the high sensitivity to cell death upon co-culture with 2DG of these Th subsets.

Although the glycolysis inhibitor BrPA had similar Th17 cell enhancing effect as 2DG, we wished to establish if 2DG-induced reduction in glycosylation capacity alone was responsible for enhanced Th17 cell polarization. The addition of mannose, an alternative source for sugar residues and major component of sugar moieties in glycoproteins, during naive T cell polarization cultures improved T cell viability and IL-2R α expression levels

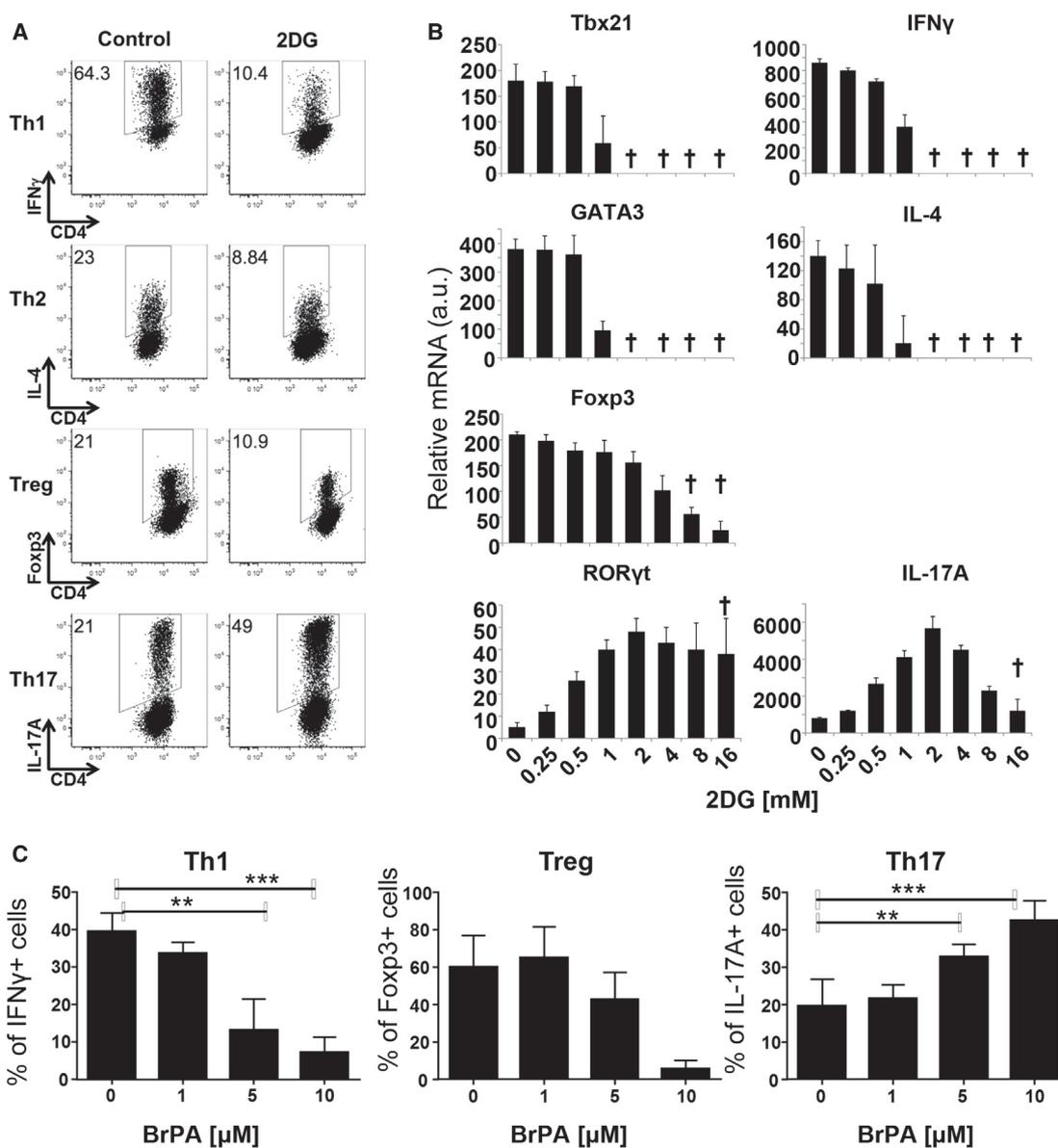


Figure 1. Reduced Glucose Accessibility Enhances Th17 Cell Differentiation

Naive mouse CD4⁺ T cells were cultured on anti-CD3/CD28-coated wells for 3 days under indicated Th subset polarization conditions in the absence or presence of 2DG (A and B) or BrPA (C).

(A) Naive T cells were cultured under indicated Th cell subset conditions in the presence or absence of 1 mM 2DG and were stained intracellularly for indicated cytokines or Foxp3.

(B) mRNA expression analysis by real-time PCR after 72 hr of culture of indicated Th subsets with concentration range, 0.25–16 mM, of 2DG for indicated gene products. Ct values were normalized to Hprt and the relative expression is displayed. †Indicates over 50% cell death.

(C) Naive T cells were cultured under indicated Th cell subset conditions in the presence or absence of indicated concentrations of BrPA upon which polarization toward Th1 (left), Treg (middle), or Th17 (right) cells was assessed by intracellular flow cytometry. Data are representative of six (A) or three (B and C) experiments. Error bars represent SD of pooled data (n = 4–6).

but did not counteract the effects of 2DG on Th17 cell polarization (Figure S2D and data not shown). 2-Fluoro-2-deoxy-glucose (2FDG), a glucose analog with reduced effects on glycosylation compared with 2DG (Datema et al., 1980), was similarly able to increase cell viability as well as boost Th17 cell differentiation

(Figure S2D). Furthermore, exogenous mannose did not reduce the inhibitory effect of 2DG on polarization of other Th subsets (Figure S2E). These data indicated that reduced glucose availability boosts Th17 cell differentiation and inhibits the polarization and survival of other known Th cell subsets.

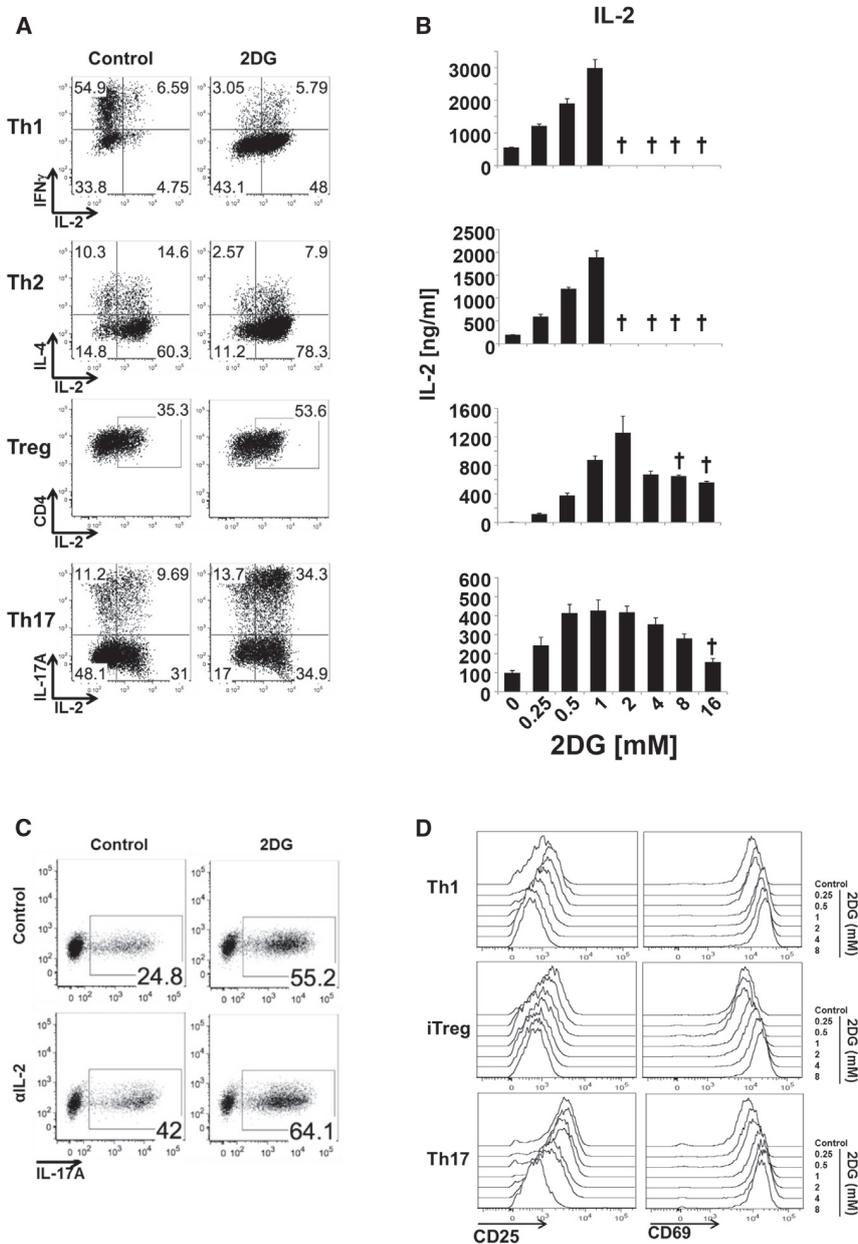


Figure 2. Limited Glucose Metabolism Reduces IL-2R Expression

Naive mouse CD4⁺ T cells were cultured on anti-CD3/CD28-coated wells for 72 hr under indicated Th subset polarization conditions.

(A) Indicated Th cells cultured in the presence or absence of 1 mM 2DG were stained intracellularly for indicated cytokines and IL-2.

(B) IL-2 mRNA expression analysis by real-time PCR of indicated Th subsets with concentration range, 0.25–16 mM, of 2DG for indicated gene products. Ct values were normalized to Hprt and the relative expression is displayed. †Indicates over 50% cell death.

(C) Naive T cells cultured under Th17 cell polarizing conditions and 2DG (left) and neutralizing anti-IL-2 (bottom row) were assessed for IL-17A expression by flow cytometry.

(D) Naive T cells cultured under indicated Th polarizing conditions and concentrations of 2DG for 20 hr were assessed for extracellular CD25 (left column) and CD69 (right column) intensity of staining by flow cytometry. Data are representative of at least three biological repeats. Error bars represent SD of pooled data (n = 6).

immediate early response gene induced following cellular stress (Leong et al., 2003), resulted in decreased levels of Th1 and Th2 cell polarization but increased levels of Th17 cell differentiation (Figure 3A). Changing ionic pressure with the sugar mannitol equally resulted in dose-dependent increased Th17 cell differentiation but no other Th subsets (Figure S3C). Furthermore, known ER stress inducers, such as the N-linked glycosylation inhibitor tunicamycin, had a marked stimulatory effect on Th17 cell differentiation but not on other Th cells (Figure 3B). Thapsigargin, an irreversible inhibitor of the sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA) that prevents reabsorption of calcium into the ER resulting in a strong cell stress response (Kaufman, 1999), robustly enhanced the

Cell Stress Enhances Th17 Cell Polarization

Reduced glucose metabolism induces the expression of glucose-regulated proteins (GRP), especially GRP78 required for the correct assembly of proteins in the ER (Wang and Kaufman, 2014). Any deregulation of protein assembly results in ER stress. Upon altering metabolite levels during culture conditions during Th17 cell differentiation, we noticed a marked increase in polarization of naive T cells toward the Th17 cell subset (Figures 3 and S3). Hypoxia resulted in the increase of Th17 cell differentiation, supported by HIF1 α (Figure S3A) (Dang et al., 2011; Shi et al., 2011; Wang et al., 2014). Sodium chloride, previously shown to increase Th17 cell differentiation via serum glucocorticoid kinase (SGK)1 (Kleinewietfeld et al., 2013; Wu et al., 2013), an

generation of Th17 cells (Figure 3B). Cyclopiasonic acid (CPA), a reversible selective inhibitor of SERCA (Moncoq et al., 2007), had a similar effect on Th cell polarization compared with thapsigargin (Figures 3C and S3D). Because the inhibitory effect of CPA on SERCA can be reversed, we cultured naive T cells in the presence of CPA for different lengths of time. This revealed the need for SERCA inhibition, resulting in increased levels of cytoplasmic calcium and cell stress, over at least a 48 hr period to enhance Th17 cell polarization (Figure 3D). Stress alone was insufficient to reduce IL-2R α expression (Figures 3B and S3B). Thus, this set of data suggests that conditions resulting in cell stress, although not essential or required, can enhance Th17 cell differentiation.

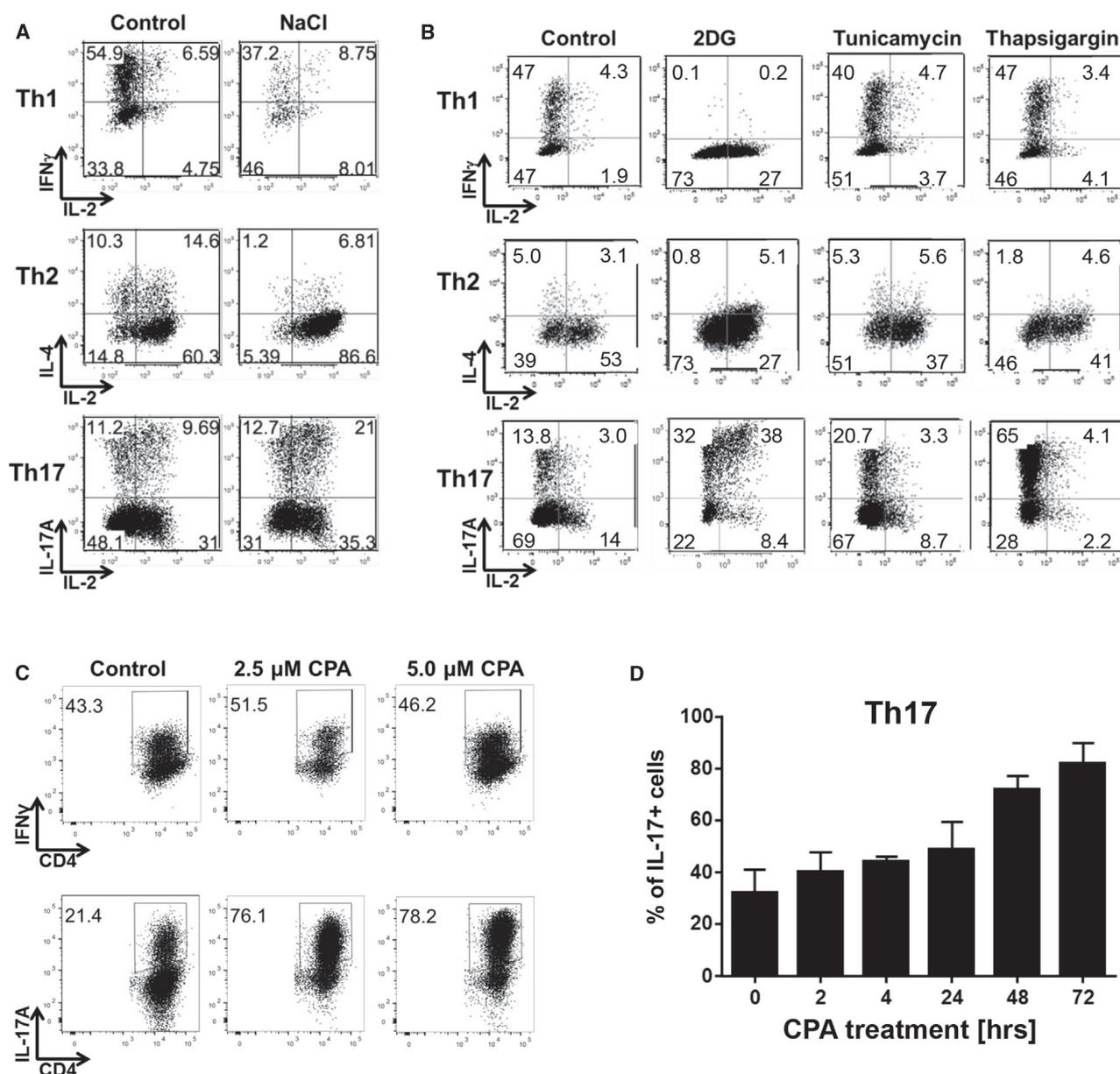


Figure 3. Cellular Stress Specifically Enhances Th17 Cell Differentiation

Naive mouse CD4⁺ T cells were cultured on anti-CD3/CD28-coated wells for 72 hr under indicated Th subset polarization conditions.

(A–C) Naive T cells were cultured under indicated Th cell polarization conditions in the presence of 50 mM NaCl (A), 1 mM 2DG, 100 ng/mL tunicamycin, or 0.5 nM thapsigargin (B), or 2.5 or 5 μ M CPA (C), and stained intracellularly for indicated cytokines.

(D) Naive T cells were cultured under Th17 cell polarization conditions in the presence of 2.5 μ M CPA for indicated time points after which CPA was removed. Average percentage of IL-17-producing cells from four biological repeats is shown (n = 4). All data are representative of at least four independent biological repeats.

Cell Stress Inhibitors Reduce Th17 Cell Differentiation

Several pharmacological compounds have been shown to be able to alleviate cell stress. However, the stress response consists of many pathways. The ER-stress response alone consists of three interconnected branches: the double-stranded RNA-activated protein kinase-like ER kinase (PERK), the activation tran-

scription factor (ATF)6, and the inositol requiring protein (IRE)1, collectively increasing ER-resident chaperones, enlarging the ER, reducing gene transcription, and increasing ER-associated degradation (ERAD). We tested known inhibitors, affecting particular cell- and ER-stress branches, for their ability to influence Th17 cell polarization. The PERK inhibitor GSK2606414

dose-dependently counteracted enhanced Th17 cell differentiation, most strongly when cell stress was induced with limited glucose availability (Figures 4A, 4B, and S4H), without affecting the polarization of other Th cells (Figures S4A and S4H). The IRE1 inhibitor 4 μ 8c (Cross et al., 2012), inhibited Th17 cell polarization under conditions of hypoglycemia and osmotic stress (Figures 4A, 4B, and S4I), without adversely affecting the polarization of other Th cell subsets (Figures S4B and S4I). The bile acid tauroursodeoxycholic acid (TUDCA), an inhibitor of cell stress (Kestera-Gounder et al., 2016; Xie et al., 2002), inhibited Th17 cell differentiation and counteracted the effect of hypoglycemia, osmotic stress, and hypoxia (Figures 4A, 4B, and S4G). TUDCA did not adversely affect the polarization of other tested effector T cell subsets (Figures 4A, 4B, S4B, and S4G). In order to assess if cell stress may play a role at the early stages of T cell differentiation, we added stress inducers or inhibitors at different times after T cell activation and polarization. Both inducers and inhibitors influenced Th17 cell polarization within the first hours of culture (Figure S4C). This indicated the immediate-early enhancing effect of cell stress on Th17 cell polarization in addition to the required maintenance of stress levels for at least the first 48 hr to efficiently boost Th17 cell polarization (Figure 3D). These results highlight that situations ultimately resulting in cell stress can skew T cell responses toward the Th17 cell subset.

XBP1 Influences Th17 Cell Differentiation

The ER-stress response results in transcriptional activity in which several factors are implicated (Kaufman, 1999). CCAAT/enhancer binding homologous protein (CHOP), downstream of the PERK branch, has been implicated in cytokine secretion in dendritic cells (Goodall et al., 2010). However, naive CD4⁺ T cells deficient in CHOP did not show altered Th subset polarization potential compared with controls upon in vitro polarization (Figure 4C, data not shown). X-box-binding-protein (XBP) 1 mRNA, the most conserved ER-stress pathway regulating the expression of a subset of ER chaperone genes (Cox and Walter, 1996), was recently identified in a genome-wide temporal analysis of genes involved in Th17 cell differentiation (Yosef et al., 2013). Naive T cells isolated from XBP1^{fl/fl} or Rag1^{cre} XBP1^{fl/fl} (from now on referred to as XBP1^{ko/ko}) mice did not differ under Th1, Th2, or Treg cell differentiation conditions and remained sensitive to stress-induced cell death (Figure S4D). Under Th17 cell polarization, reduced levels of IL-17 and ROR γ t were observed in the absence of *Xbp1* (Figures 4D, S4E, and S4F). Conditions of osmotic stress and hypoglycemia were able to enhance Th17 cell differentiation in the absence of XBP1, albeit with reduced levels compared with controls, while stress inhibitors reduced Th17 cell development in XBP1^{ko/ko} more efficiently compared with XBP1^{fl/fl} controls (Figure S4F). XBP1 was, however, required for enhanced Th17 cell polarization under hypoxic conditions (Figures 4D and S4F). The reduced response to conditions of hypoxia in the absence of *Xbp1* is in line with its requirement to form a transcriptional complex with HIF1 α that regulates the expression of hypoxia response genes in tumors (Chen et al., 2014). Collectively, these results highlight that XBP1 plays a supporting role in enhancing Th17 cell differentiation under cell stress conditions.

Cell Stress Results in Sustained Levels of Intracellular Calcium

Cellular stress is characterized by calcium release from the ER into the cytoplasm leading to a cellular response (Brickley et al., 2013). In T cells, calcium signals are required to recruit and retain nuclear factor of activated T cells (NFAT) in the nucleus for the expression of cytokines such as IL-2 and IL-17 (Hermann-Kleiter and Baier, 2010). In line with the requirement of calcium for TCR signaling and T cell activation, blocking calcium release-activated channels (CRAC) with YM-58483 (BTP2) showed a reduction in polarization of all Th subsets tested (Figure S5A). However, it did indicate a heightened requirement for calcium signaling for Th17 cell differentiation compared with other Th cells. We observed that T cells polarized in the presence of TGF- β , namely Th17 and Treg cells, show a sustained high intracellular calcium level compared with Th1 cells after 20 hr of activation (Figure 5A). Furthermore, we confirmed that cytoplasmic calcium levels were increased upon co-culture with compounds enhancing Th17 cell differentiation during Th cells cultures (Figures 5A, S5B, and S5C), and the calcium ionophore ionomycin markedly increases Th17 cell polarization (Figures S5D and S5I). These data indicate that environmental changes in metabolite levels or ionic pressure can result in increased cytoplasmic calcium levels via induction of cell stress, thereby enhancing Th17 cell polarization.

Cell Stress in a Pro-inflammatory Environment Is Sufficient for De Novo Th17 Cell Differentiation

Although we and others previously reported that a combination of cytokines, IL-6, and TGF- β is sufficient to generate Th17 cells (Bettelli et al., 2006; Mangan et al., 2006; Veldhoen et al., 2006a), the signaling requirements downstream of the TGF- β receptor remain unknown. We observed that the Th17 cell-enhancing effect of cell stress inducers is most apparent under Th17 cell differentiation conditions with reduced levels of TGF- β (data not shown). Strikingly, in vitro stimulation of naive T cells in the presence of IL-6 and stress inducers, but not cell stress inducers alone, was sufficient to induce Th17 cell development, even when TGF- β was neutralized (Figures 5B and S5E). Furthermore, the presence of additional pro-inflammatory cytokines, IL-1 β , TNF, or IL-23, increased the efficiency of Th17 cell development under conditions of ER-stress while neutralizing TGF- β (Figure 5C). In addition, we show that IL-6 in combination with cell stress is sufficient for the expression of ROR γ t (Figure S5F). To further assess the requirement for TGF- β , we used naive CD4⁺ T cells sourced from dominant-negative TGF- β RII (dnTGF- β RII) mice, in which signaling via TGF- β RII is abrogated (Gorelik and Flavell, 2000; Veldhoen et al., 2006b). We confirmed that naive CD4⁺ T cells sourced from dnTGF- β RII mice, in contrast to wild-type animals, were not able to polarize to Th17 cells in the presence of IL-6 and TGF- β , but generated Th1 cells similarly or better to controls (Figures 5D, 5E, S5F, and S5G). TGF- β RII signaling was, however, not essential for stress-induced de novo Th17 polarization under inflammatory conditions that could be efficiently inhibited by TUDCA (Figure 5D). Furthermore, we show that XBP1 facilitates stress-induced Th17 cell polarization, is essential under conditions of hypoxia, and can be efficiently inhibited with TUDCA (Figure S5H). Collectively, these data

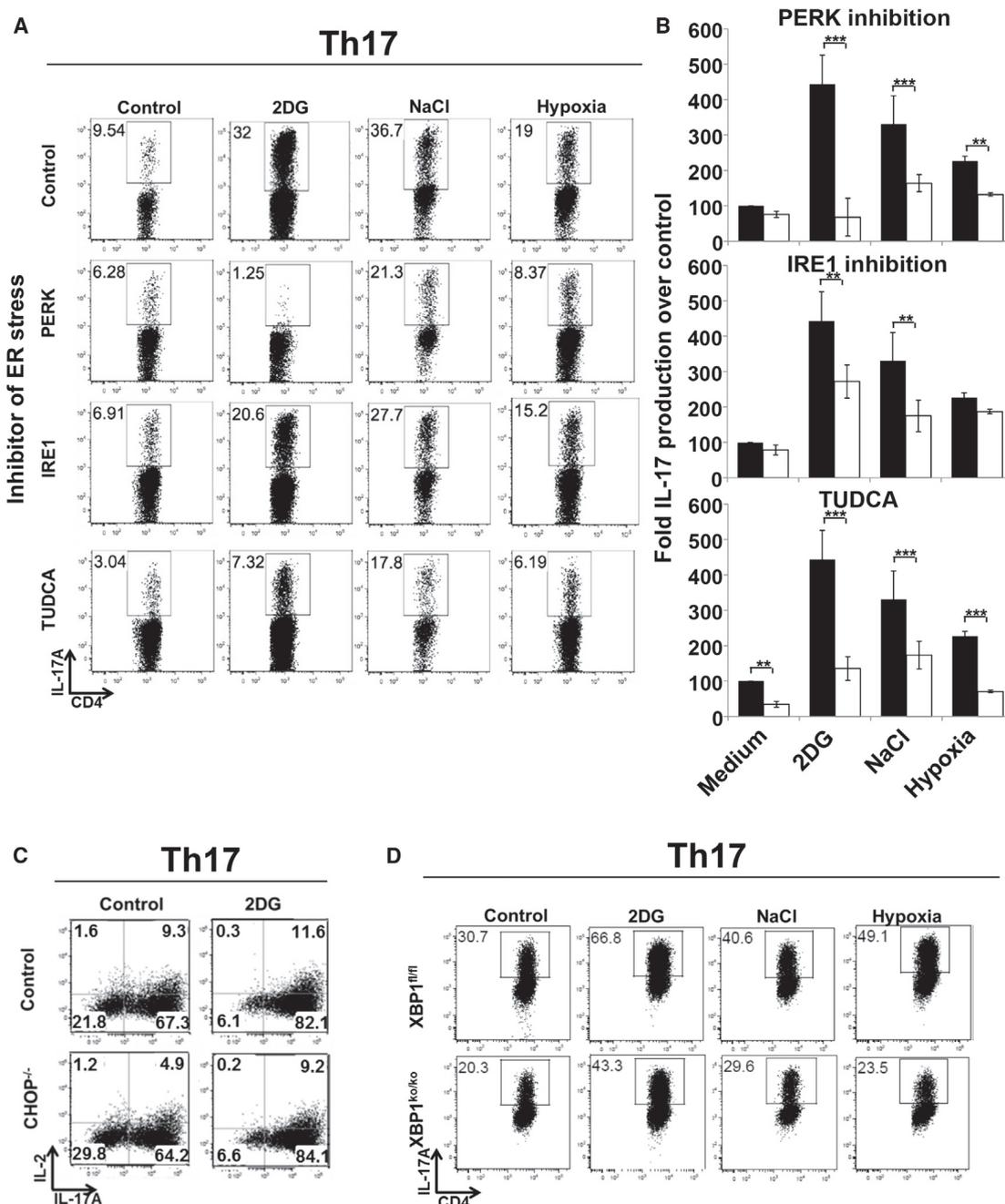


Figure 4. Cellular Stress Enhances Th17 Cell Differentiation

Naive mouse CD4⁺ T cells were cultured on anti-CD3/CD28-coated wells for 72 hr under Th17 cell polarization conditions.

(A) T cells cultured under indicated ER stress-inducing conditions, 2DG (second column), NaCl (third column), and hypoxia (fourth column), were co-cultured with known inhibitors of cell stress-response pathways, PERK inhibitor GSK2606414 (second row), IRE1 inhibitor 4 μ 8c (third row), and tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) (fourth row).

(B) Average level of IL-17 production compared with control (= 100) of conditions described under (A) from six independent biological repeats (black bars control, white bars with inhibitor).

(C) Naive T cells isolated from controls (top) or CHOP^{-/-} (bottom) mice were cultured under control (left column) or reduced glucose metabolism (right column) and assessed for IL-17 production by flow cytometry.

(D) Naive T cells isolated from control XBP1^{fl/fl} (top row) or Rag1^{Cre} XBP1^{fl/fl} (XBP1^{ko/ko}) (bottom row) mice were cultured under control (first column), limited glucose metabolism (2DG, second column), osmotic stress (NaCl, third column), or limited oxygen pressure (hypoxia, fourth column) and assessed for IL-17 production by flow cytometry. **p < 0.01, ***p < 0.001.

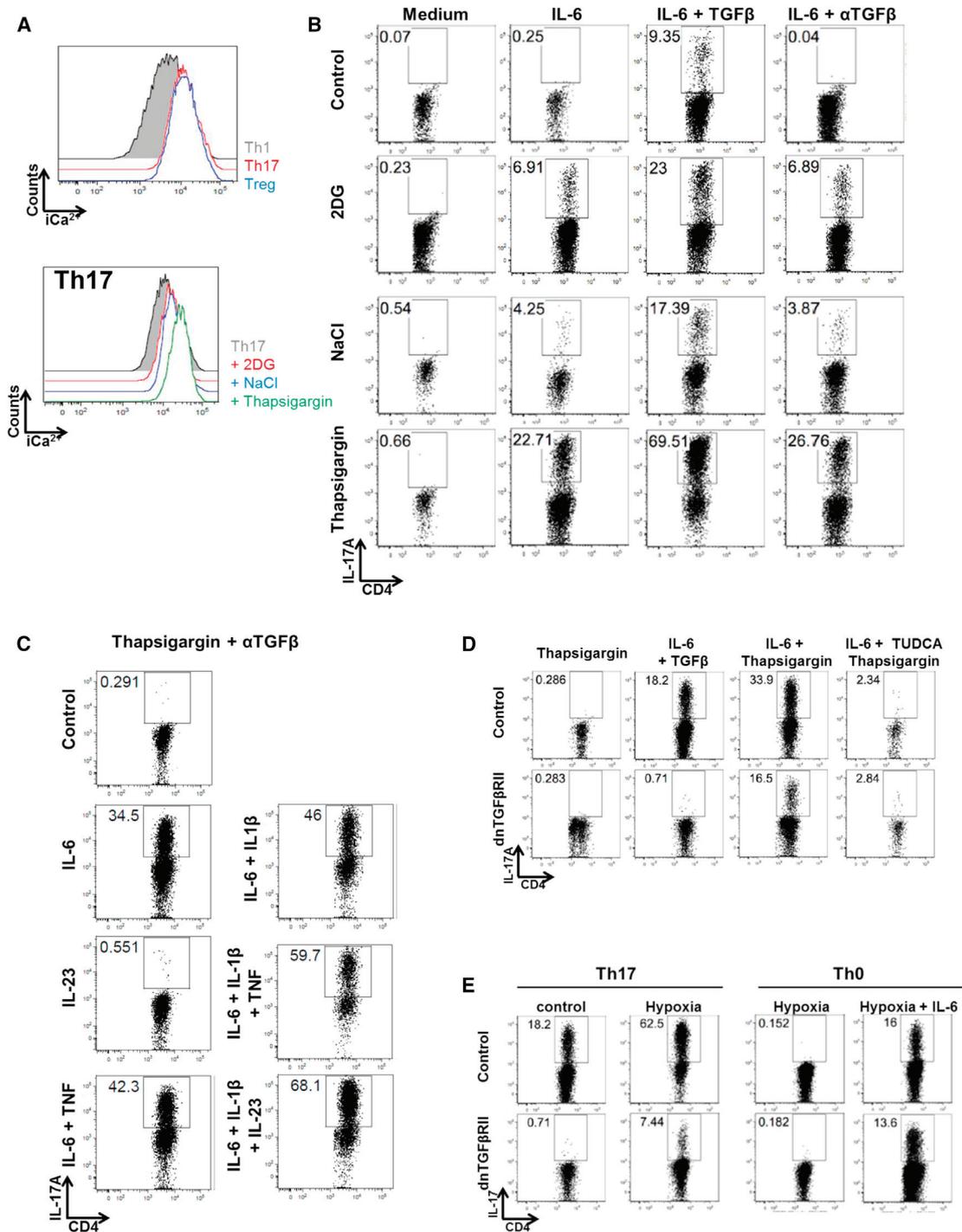


Figure 5. Inflammatory and Cellular Stress Environment Can Drive Th17 Polarization

Naive mouse CD4⁺ T cells were cultured on anti-CD3/CD28-coated wells under indicated Th subset polarization conditions.

(A) Upon 20 hr of culture, Th1, Th17, and Treg cells were assessed for cytoplasmic calcium levels by flow cytometry (top). Naive T cells cultured under Th17 cell differentiation conditions in the presence of indicated ER-stress inducers were assessed for cytoplasmic calcium levels by flow cytometry (bottom).

(B and C) Naive T cells were cultured under (B) neutral conditions (first column), IL-6 only (second column), Th17 conditions (TGF-β, IL-6, anti-IFNγ, and anti-IL-4) (third column), or IL-6 and neutralizing anti-TGF-β (fourth column), and in the presence of indicated ER-stress inducers (rows) or (C) with thapsigargin and neutralizing anti-TGF-β in the presence of indicated cytokines. Cells were assessed on day 3 for Th17 cell differentiation by intracellular staining for IL-17.

(legend continued on next page)

demonstrated that inflammatory conditions and a microenvironment inducing cellular stress can be sufficient to skew the T cell response in favor of Th17 cell differentiation in a TGF β -independent manner.

Cellular Stress Can Contribute to Immunopathology

TUDCA is used to reduce the cellular stress caused by chemotherapeutic agents, reperfusion, and steroids in humans. We confirmed it does not affect T cell proliferation or cell viability (Figure S6A and data not shown). This and its water solubility make TUDCA an ideal compound for in vivo dosing to test its potential to reduce Th17 cell-mediated pathology. Using the Th17 cell-dependent multiple sclerosis mouse model, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) (Veldhoen et al., 2006b), daily dosing of TUDCA was able to significantly delay the onset of signs of EAE compared to controls (Figures 6A, 6B, and S6B). The dosing of TUDCA significantly reduced the number of T cells found in the CNS at day 12 after immunization, while at that point in time the lymph node draining the immunization site showed a trend to lower Th17 cell numbers and proportions and an increase in Th1 cells (Figures 6C, 6D, and S6C). However, clinical signs of EAE did develop from day 14 and T cell cytokine production from TUDCA-treated mice was indistinguishable from controls at late time points (data not shown). In line with in vitro obtained results that cell stress has a marked influence on early Th17 cell differentiation, the dosing of mice at the start of clinical manifestations of EAE with TUDCA had no effect on disease progression compared with control animals or IL-17 or IFN γ producing CD4 $^{+}$ T cells in the CNS (Figures 6E and S6D). Because the administration of TUDCA has the potential to reduce cellular stress experienced by any cell type, we made use of mice in which we conditionally excised Xbp1 in lymphocytes; Rag1^{Cre} Xbp1^{fl/fl}. Compared to wild-type and Xbp1^{fl/fl} controls, which responded very similar to EAE induction, the conditional excision of Xbp1 in lymphocytes resulted in a delayed onset and clinical score EAE symptoms (Figure 6F).

Subsequently, we analyzed the transcriptional profile of Th17 cells generated from naive precursors with help of classic IL-6 and TGF- β or with IL-6 and the ER stress-inducer CPA (Figure 2D). To avoid polarization differences in total cell cultures, we made use of IL-17A reporter mice and sorted fluorescent positive cells prior to analysis. Of note, despite similar levels of *Il17* and *Rorc*, we observed marked reduction of *Ahr* and *Il10* as well as increase of *Tbx21* and *Ifng* (Figures 6G and S6E). The observed gene expression profile observed in cell stress-generated T cells resembles that observed in Th17 cells differentiated with IL-1 β , IL-6, and IL-23 in the absence of TGF- β , which were shown to be highly pathogenic (Ghoreschi et al., 2010). Mice adoptively transferred with T cells generated in the presence of ER-stress inducer CPA showed delayed signs of classic EAE, starting with tail paralysis, compared with T cells generated in the presence of TGF- β (Figure 6H). However, transfer of Th17

cells generated under stress resulted in atypical EAE caused by exacerbated brain inflammation whereby mice exhibit a variety of clinical symptoms ranging from ataxia to unilateral paralysis (Figure 6I). Atypical EAE was observed despite the observed increase in Th1-associated transcripts but is in line with the increased Th17 cell ratio as previously reported (Stromnes et al., 2008) (Figure S6) and observed under ER stress-inducing conditions. Collectively, these data show that stress can facilitate the generation of Th17 cells in vivo and aggravate (auto) immunity.

DISCUSSION

The present study shows that de novo Th17 cell differentiation can be initiated under combined conditions of inflammation and those inducing cellular stress, such as restricted metabolite availability or ionic pressure and describes an unexpected role for the stress response in skewing T cell polarization toward a Th17 cell response and contributing to autoimmunity in the EAE mouse model.

Th17 cells have evolved to offer protection against potential threats at epithelial barrier sites, as suggested by the enrichment of IL-17 expressing lymphocytes at these sites observed in cyclostomes to vertebrates (Hirano et al., 2013). Trauma or tissue damage, conserved microbe- or danger-associated molecular patterns trigger receptors on innate immune cells resulting in the production of a range of pro-inflammatory cytokines. IL-6 is produced upon inflammation as well as injury as part of the acute-phase response and has context-dependent pro- and anti-inflammatory properties (Hunter and Jones, 2015). Recently, pathogen recognition receptor triggering was shown to be an important mediator of stress-induced inflammation, triggering the production of IL-6 (Keestra-Gounder et al., 2016), connecting cellular stress with innate immunity. We showed that the presence of TGF- β provides the context required to generate Th17 cells (Veldhoen et al., 2006a). However, the essential requirement for TGF- β in this process has been questioned (Ghoreschi et al., 2010). Here, we reconcile these seeming discrepancies by showing that metabolic disturbances in the local environment facilitate the polarization of Th17 cells and can be sufficient for de novo Th17 cell differentiation in the absence of TGF- β via induction of the cells' stress response. Furthermore, we found a high correlation in transcripts found in purified Th17 cell generated in the presence of stress with those described by Ghoreschi et al. (2010) in the absence of TGF- β , such as reduced expression of *Ahr*, *Il22*, *Il10*, and *Il17f* and increased expression of the Th1 cell-associated genes *Tbx21* and *IFN γ* . Disturbances in the local environment link with the fact that invading pathogens or products will often disrupt cellular pathways as well as compete for finite resources, while cellular stress and malignancy alters metabolite availability, altering the microenvironment (Cairns et al., 2011). Although it

(D and E) Naive T cells derived from dnTGF- β R1I (bottom rows) or controls (top rows) were cultured with (D) indicated cytokines, thapsigargin or TUDCA, or (E) cultured under Th17 or Th0 cell polarization conditions in normoxia or hypoxia as indicated. Cells were assessed on day 3 for Th17 differentiation by intracellular staining for IL-17. Results are representative of three (A, C, D, and E) or six (B) experiments.

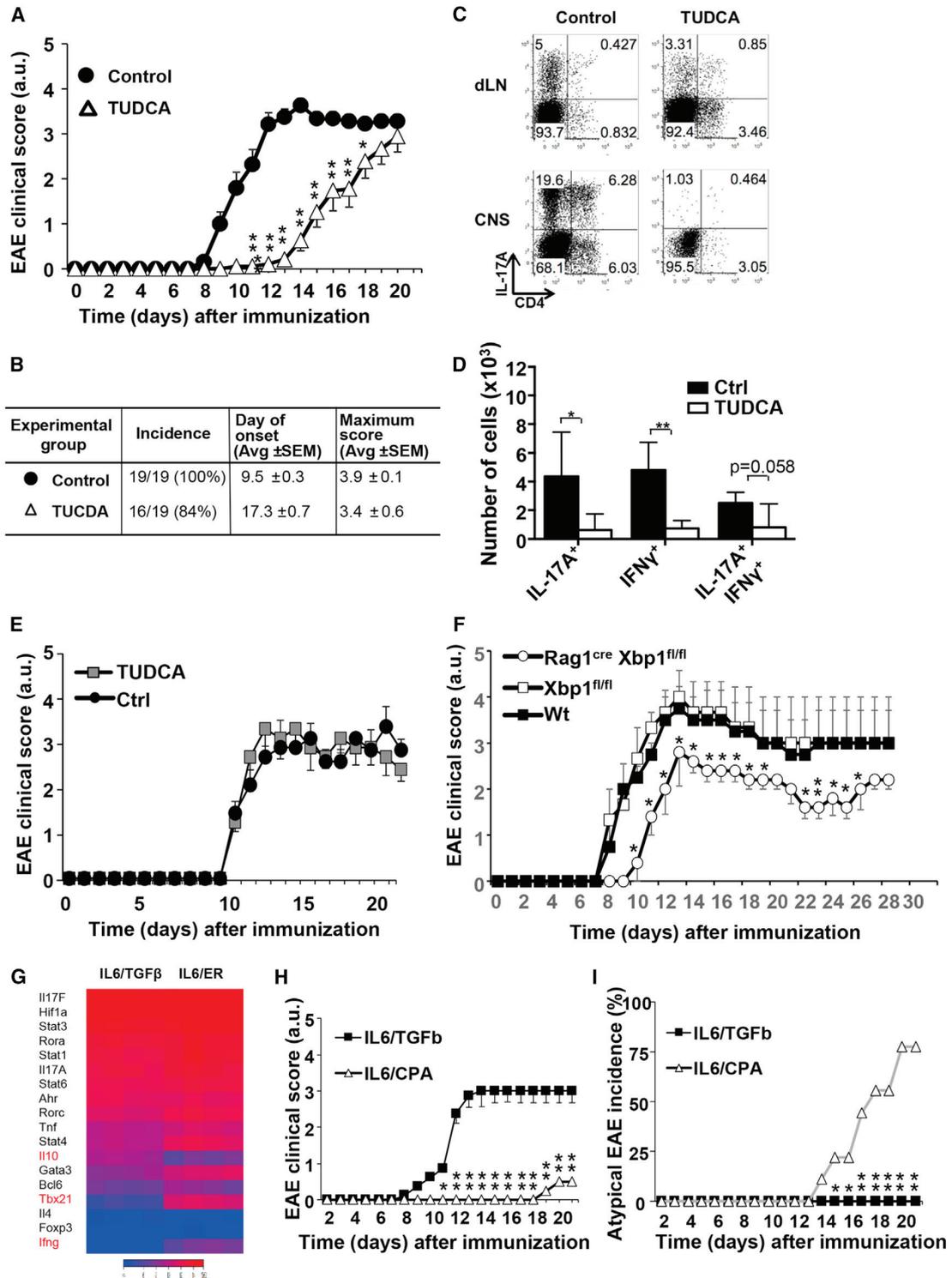


Figure 6. Inhibition of Stress Reduces Onset of EAE

C57BL/6 mice were subjected to MOG/CFA administration to induce EAE and daily PBS or 250 mg/kg TUDCA dosing.

(A and B) Clinical EAE scores (A) and incidence (B), average day of onset and maximum score data from mice immunized with MOG/CFA and PBS (filled symbols) or TUDCA (open symbols) (n = 19 from three biological repeats).

(C) Flow cytometry for IFN γ and IL-17 of CD4⁺ T cells harvested from inguinal draining lymph node (dLN) or CNS 12 days after EAE induction.

(legend continued on next page)

is clear that T cell function is intimately linked to metabolic programs, whether and how environmental cues and cellular metabolism influence the outcome of T cell-mediated immune responses remains to be fully understood. We confirmed the importance of glucose metabolism for efficient polarization toward the Th1, Th2, and Treg cell lineages. The reduction in glycosylation and the surface levels of IL-2R α may explain the sensitivity of Th1, Th2, and Treg cells to 2DG and BrPA with all three subsets depending on IL-2 signaling for their differentiation, proliferation, and survival (Moriggi et al., 1999). Although Th17 cell polarization is negatively affected by IL-2 (Laurence et al., 2007), and hence reduced IL-2R α may contribute to enhanced Th17 differentiation, this seems only minor contributing factor for increased Th17 cell polarization. We did not observe reduced IL-2R α expression levels under conditions with exogenous mannose, nor other stress conditions in which enhanced Th17 cell polarization was observed. Furthermore, although stress inhibitors reduced Th17 cell polarization, IL-2R α expression was not restored. Of note, our observations with respect to reduced Treg and enhanced Th17 cell differentiation in the presence of similar concentrations of 2DG are in contrast to a recent report (Shi et al., 2011). We did note that reduced cell density at the start of the cultures can have a significant effect on Treg differentiation and the inhibitory efficiency of 2DG but consistently observed enhanced Th17 cell polarization upon co-culture with 2DG or BrPA.

Cellular stress response can be initiated by GPR78 via mechanisms not fully understood (Kaufman et al., 2002). Stress has a substantial influence on immunity, but efforts have largely concentrated on non-lymphoid cells and B cells, but not T lymphocytes (Todd et al., 2008). The expression of the inflammatory cytokines IL-6 and IL-23 by DCs, strongly associated with the IL-17 response (Stockinger and Veldhoen, 2007), is enhanced by the stress response (Goodall et al., 2010; Keestra-Gounder et al., 2016). In addition to conditions of limited glucose availability, we show that other environmental disturbances such as changes in sodium and oxygen levels enhance Th17 cell polarization. This is in agreement with previous reports highlighting a role for hypoxia, via HIF1 α (Dang et al., 2011; Shi et al., 2011; Wang et al., 2014) and sodium pressure (Kleinewietfeld et al., 2013; Wu et al., 2013), known stress inducers, in supporting Th17 cell differentiation. Furthermore, we use the prototypical ER-stress inducers, thapsigargin and CPA, which markedly enhanced Th17 cell polarization. Our data indicate the stress response as a common, but heterogeneous, molecular mechanism underlying these observations. Furthermore, we show that depending on the identity of the stress inducer, at least

two main branches of the stress response, IRE1 and PERK, play a role in supporting Th17 polarization.

One of the most conserved elements of the stress pathway, the transcription factor XBP1, has been associated with Th17 cell biology (Yosef et al., 2013). We show now that XBP1 is a mediator of Th17 cell differentiation. The generation of Th17 cells, via IL-6 and TGF- β , was reduced in the absence of XBP1 and mediators of stress-induced Th17 cells in the presence of IL-6 markedly less efficient without XBP1. This suggests that TGF- β , known to inhibit the activation and proliferation of lymphocytes, upon opposite instructions from IL-6, may result in cellular stress and that XBP1 transcriptional activity may directly regulate *Rorc*. This is in line with the reduced response to conditions of hypoxia in the absence of XBP1 that requires the formation of a transcriptional complex with HIF1 α that regulates the expression of hypoxia response genes in tumors (Chen et al., 2014). HIF1 α is known to be able to bind the *Rorc* promoter and enhance Th17 cell differentiation (Dang et al., 2011).

Th17 cells have been closely associated with immunopathology in disorders such as rheumatoid arthritis (RA), multiple sclerosis (MS), lupus erythematosus, psoriasis, graft versus host disease, and inflammatory bowel disease (IBD) and hence are a major therapeutic target (Miossec and Kolls, 2012). We show, in a mouse model of MS, that reducing cellular stress with daily dosing of TUDCA at the start of EAE induction, but not at clinical onset, can markedly reduce EAE. This is in line with the effects on enhancing Th17 cell differentiation we observed in vitro. However, clinical disease did ultimately manifest itself and reached similar levels as those observed in control animals. Excision of *Xbp1* in all lymphocytes during development resulted in a delayed onset and reduced clinical score of EAE. The enhancement of Th17 cell differentiation under conditions of environmental stress may, however, have direct implications in the establishment and maintenance of autoimmunity and chronic inflammatory conditions. Induction of cellular stress prior to T cell transfer in a model of passive EAE resulted in marked differences in EAE with Th17 cell-dominated atypical EAE observed only with conditions of added ER stress induction. This is in agreement with previous reports on different roles of mixtures of Th1/Th17 cells and Th17 cell-dominant populations in the EAE model (Stromnes et al., 2008). IBD disorders, strongly linked with the IL-17/IL-23 inflammatory axis, are associated with loss of barrier integrity, enabling bacterial translocation, inflammation, and metabolic alterations, as well as tissue damage, resulting in inflammation and tissue stress (Maloy and Powrie, 2011). Equally, the microenvironment in the synovia of arthritic joints may constitute a niche for Th17 cell development with high levels

(D) Total T cell numbers expressing indicated cytokines harvested from the CNS 12 days after EAE induction are shown in control (black bars) and TUDCA-treated (open bars) mice. Data were obtained from six mice of each condition.

(E) Clinical EAE scores upon control (black circles) or TUDCA (gray squares) dosing at day 9 after EAE induction ($n = 12$ from two biological repeats).

(F) Clinical EAE scores from control C57BL/6 (closed squares), *Xbp1*^{fl/fl} (open squares), and *Rag1*^{-Cre} *Xbp1*^{fl/fl} (open circles) mice ($n = 11$ from two biological repeats).

(G) Gene expression profile of indicated transcripts in Th17 cells generated from naive precursors with help of IL-6/TGF- β (left four columns) or IL-6/CPA (right four columns). Each column represents a biological repeat.

(H) Clinical classic EAE scores upon adoptive transfer of 2D2 T cells restimulated with MOG peptide and indicated cytokines prior to cell transfer ($n = 9$ from two biological repeats).

(I) Incidence of atypical EAE from the same experiment as shown under (H). Error bars represent SD of pooled data. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$; student's t test. EAE clinical scores and day of onset were assessed by Mann-Whitney test on each separate day.

of ER-stress (Park et al., 2014). Of note, in connective tissues between tendon or ligament and bone, the entheses, known to be under constant (mechanical and inflammatory) stress, a resident population of IL-17 producing T cells can be found that contributes to rheumatic diseases (Sherlock et al., 2012). Furthermore, our data may have implications for tumor immunology where tumor cells consume more metabolites than their requirement to proliferate and grow (Vander Heiden et al., 2009), actively altering their microenvironment and thereby influencing immunity (Chang et al., 2015; Cubillos-Ruiz et al., 2015; Ho et al., 2015). DCs have been shown to undergo ER-stress in a tumor environment (Cubillos-Ruiz et al., 2015). In line with this, Th17 cells are enriched in tumor environments and associated with cancer promoting processes such as angiogenesis (Numasaki et al., 2003). Grivennikov et al. (2012) revealed that established tumors facilitate microbial entry, which leads to an exacerbated tumor growth through the production of IL-17 by CD4⁺ T cells.

The ability of ER-stress and sustained cytoplasmic calcium levels to enhance or induce Th17 cell-mediated responses may offer additional insights in the development and maintenance of immunopathology and autoimmunity such as resulting from infections or tissue insults.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals

C57BL/6J and Rag1^{Cre} XBP1^{fl/fl} were bred at the Babraham Institute and Instituto de Medicina Molecular. The XBP1^{fl/fl} mice (Hetz et al., 2008) were kindly provided by Drs. L.H. Glimcher and A. Kaser. Chop^{-/-} (Ddit3) (Zinszner et al., 1998) spleens were kindly provided by Dr. A. Kaser, Vav1^{Cre} HIF1^{fl/fl} and controls spleens were kindly provided by Dr. D. Cantrell. Dominant negative TGF- β R2 (dnTGF- β RII) mice were maintained in AniCan, a specific pathogen-free animal facility of the Centre Léon Bérard, Lyon, France. 2D2 mice were maintained at the Instituto Gulbenkian de Ciência and Instituto de Medicina Molecular Lisbon. All animals were bred and maintained under specific pathogen-free conditions, male and female mice were used between the ages of 8–12 weeks. All experiments were performed in accordance with the United Kingdom home office, Direção-Geral de Alimentação e Veterinária Portugal, and local ethical boards and guidelines.

In Vitro T Cell Cultures

For mouse T cell differentiation, naive CD4⁺CD62L⁺ T cells were isolated from spleens by magnetic beads following manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec, Naive mouse T cell isolation kit II) or by CD4⁺CD62L⁺CD25⁻CD44^{lo} flow cytometry as described before (Veldhoen et al., 2006a). The culture medium used was Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM) supplemented with 2 × 10⁻³ M L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin, 5 × 10⁻⁵ M β-mercaptoethanol, and 5% FBS. A total of 5 × 10⁵ Th cells were differentiated on plates coated with 2 μg/mL anti-CD3 (clone 2C11, BioXcell) and 2 μg/mL anti-CD28 (clone 37.51, BioXcell) in presence of: Th1, 2 ng/mL IL-12 (PeproTech); Th2, 10 ng/mL IL-4 (PeproTech) and 5 μg/mL anti-IFN γ (clone XMG1.2, BioXcell); Treg, 5 ng/mL TGF- β (PeproTech), 5 μg/mL anti-IL-4 (clone 11B11, BioXcell), and 5 μg/mL anti-IFN γ (BioXcell); and Th17, 20 ng/mL IL-6 (PeproTech) and 0.2 ng/mL TGF- β (PeproTech), 5 μg/mL anti-IFN γ (BioXcell) and 5 μg/mL anti-IL-4 (BioXcell). For indicated conditions, 5 ng/mL IL-2 (PeproTech) or 5 μg/mL neutralizing IL-2 antibodies (clone JES6-1A12, BioLegend), or 10 μg/mL neutralizing anti-TGF- β 1,2,3 anti-body (clone 1D11, R&D) were added. For T cell proliferation, naive CD4⁺CD62L⁺ T cells were loaded with 2.5 μM CFSE (LifeSciences). Hypoxia experiments were performed using 1% oxygen in a Galaxy 48R incubator (New Brunswick).

Cells were pre-treated for 1 hr with indicated ER inhibitors and concentrations; 4μ8c (5 μM, Tocris), GSK2606414 (0.5μM, Tocris), TUDCA

(0.1–0.5 mM, Sigma), or KN-93 (1 μM, Sigma) after which they were cultured on antibody coated plates in the presence or absence of indicated ER-stress inducers and concentrations; 2DG (0.25–16 mM), BrPA (1–10 μM), NaCl (40–50 mM), tunicamycin (100 ng/mL), or thapsigargin (0.5 nM), CPA (2.5–5 μM) (all Sigma).

Flow Cytometry

Single-cell suspensions were prepared from spleens, lymph nodes, and spinal cord. CNS-infiltrating immune cells were isolated from the spinal cord by isolating the soft tissue from the spine and mashing the spinal cord through 70-μm mesh filter followed by 36.5% Percoll separation. The proportion and absolute numbers of T cells were determined with help of counting beads (Spherotech). For cytokine profiles, cells were re-stimulated for 3 hr with 500 ng/mL of PdBU (Sigma) and 500 ng/mL of ionomycin (Sigma) in the presence of 1 μg/mL Brefeldin A (Sigma) and were stained with anti-CD4, anti-CD25, anti-IL-17A, anti-IFN γ , anti-IL-4, and Foxp3 (all Biolegend). A viability dye was used to exclude dead cells. All samples were analyzed on a Fortessa 4 or 5 cytometer (BD Biosciences), and data were analyzed with FlowJo software (Tree Star).

Calcium Detection

Intracellular calcium was determined by using the PBX Calcium Assay (BD). Briefly, cultured cells were mixed with an equal volume of 1× dye-loading solution containing the calcium indicator (according to the manufacturer's instructions). After 1 hr incubation at 37°C, cells were washed twice with Hank's balanced salt solution (HBSS), stained with antibodies, and analyzed on a BD LSRFortessa flow cytometer.

EAE Induction

EAE was actively induced by subcutaneously injecting 250 μL MOG_{35–55} peptide (Prolimmune Ltd.) emulsified in IFA (Sigma) supplemented with 250 μL mycobacterium tuberculosis extract H37Ra (Difco). Additionally, the animals received intraperitoneally (i.p.) 200 ng pertussis toxin (List Biological Laboratories) on days 0 and 2. Clinical signs of EAE were assessed according to the following scores: 0, no signs of disease; 1, flaccid tail; 2, impaired righting reflex and/or gait; 3, partial hind limb paralysis; 4, total hind limb paralysis; and 5, total hind limb paralysis with partial forelimb paralysis. TUDCA treatment commenced at 500 mg/kg at the day prior to MOG/CFA immunization and was followed with daily i.p. administration at 250 mg/kg. Passive EAE was induced by harvesting lymph nodes and spleens from MOG/CFA immunized 2D2 mice. Single cells suspensions were restimulated with 50 μg/mL MOG peptide for 4 days with IL-6 (20 ng/mL) and either TGF- β (0.5 ng/mL) or CPA (2 μM). Subsequently, cells were transferred intravenously (i.v.) into sublethally irradiated C57BL/6 mice, and daily scoring for clinical signs of EAE began from day 5 after transfer.

Transcript Analysis

RNA isolation was performed using QIAGEN's RNeasy Mini Plus Kit following the manufacturer's instructions. Real-time PCR was performed using Life Technologies' TaqMan Gene Expression Assays combined with a TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). The comparative CT method was applied for relative quantification of mRNA levels. Data are presented as the fold change in expression normalized to internal control gene *Hprt*, which was found to be stably expressed under all experimental conditions tested.

Statistical Analysis

The p values were calculated with a two-tailed Student's t test. A p value <0.05 was considered significant with p values considered significant as follows: *p < 0.05, **p < 0.01, and ***p < 0.001. Error bars denote ± SEM.

ACCESSION NUMBERS

The accession number for the RNA-seq data reported in this paper is ArrayExpress: E-MTAB-5692.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes six figures and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2017.05.052>.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

V.B.-W., C.F., M.S., O.F., S.I., and M.V. performed the experiments, interpreted the data, and assisted with the manuscript. J.C.M. and M.V. designed and coordinated the research. M.V. wrote the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to acknowledge the assistance of the animal technicians at Babraham and IMM with blind EAE scoring, as well as the flowcytometry facilities. V.B.-W. was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG BR 4253/1-1 Forschungsstipendium), and M.S. was supported by the European Union H2020 research and innovation programme “ENLIGHTEN” under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement 675395. J.C.M. was supported by grants from the Helmholtz-DKFZ-Inserm program and the Agence Nationale pour la Recherche (ANR) investissement d’avenir ANR-10-LABX-61 and is a Helmholtz-association investigator. M.V. was supported by the European Union ERC programme (280307-Epithelial_Immuno) and the European Union H2020 ERA project (667824-EXCELLtoINNOV).

Received: May 20, 2016

Revised: March 27, 2017

Accepted: May 15, 2017

Published: June 13, 2017

REFERENCES

- Acosta-Rodriguez, E.V., Napolitani, G., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2007). Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat. Immunol.* **8**, 942–949.
- 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.
- Brickley, D.R., Agyeman, A.S., Kopp, R.F., Hall, B.A., Harbeck, M.C., Belova, L., Volden, P.A., Wu, W., Roe, M.W., and Conzen, S.D. (2013). Serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1) is regulated by store-operated Ca²⁺ entry and mediates cytoprotection against necrotic cell death. *J. Biol. Chem.* **288**, 32708–32719.
- Brucklacher-Waldert, V., Carr, E.J., Linterman, M.A., and Veldhoen, M. (2014). Cellular Plasticity of CD4⁺ T Cells in the Intestine. *Front. Immunol.* **5**, 488.
- Cairns, R.A., Harris, I.S., and Mak, T.W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 85–95.
- Cardaci, S., Desideri, E., and Ciriolo, M.R. (2012). Targeting aerobic glycolysis: 3-bromopyruvate as a promising anticancer drug. *J. Bioenerg. Biomembr.* **44**, 17–29.
- Chang, C.H., Qiu, J., O’Sullivan, D., Buck, M.D., Noguchi, T., Curtis, J.D., Chen, Q., Gindin, M., Gubin, M.M., van der Windt, G.J., et al. (2015). Metabolic competition in the tumor microenvironment is a driver of cancer progression. *Cell* **162**, 1229–1241.
- Chen, X., Iliopoulos, D., Zhang, Q., Tang, Q., Greenblatt, M.B., Hatziapostolou, M., Lim, E., Tam, W.L., Ni, M., Chen, Y., et al. (2014). XBP1 promotes triple-negative breast cancer by controlling the HIF1 α pathway. *Nature* **508**, 103–107.
- Cox, J.S., and Walter, P. (1996). A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell* **87**, 391–404.
- Cross, B.C., Bond, P.J., Sadowski, P.G., Jha, B.K., Zak, J., Goodman, J.M., Silverman, R.H., Neubert, T.A., Baxendale, I.R., Ron, D., and Harding, H.P. (2012). The molecular basis for selective inhibition of unconventional mRNA splicing by an IRE1-binding small molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, E869–E878.
- Cubillos-Ruiz, J.R., Silberman, P.C., Rutkowski, M.R., Chopra, S., Perales-Puchalt, A., Song, M., Zhang, S., Bettigole, S.E., Gupta, D., Holcomb, K., et al. (2015). ER Stress Sensor XBP1 Controls Anti-tumor Immunity by Disrupting Dendritic Cell Homeostasis. *Cell* **161**, 1527–1538.
- Dang, E.V., Barbi, J., Yang, H.Y., Jinasena, D., Yu, H., Zheng, Y., Bordman, Z., Fu, J., Kim, Y., Yen, H.R., et al. (2011). Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1. *Cell* **146**, 772–784.
- Datema, R., and Schwarz, R.T. (1978). Formation of 2-deoxyglucose-containing lipid-linked oligosaccharides. Interference with glycosylation of glycoproteins. *Eur. J. Biochem.* **90**, 505–516.
- Datema, R., Schwarz, R.T., and Jankowski, A.W. (1980). Fluoroglucose-inhibition of protein glycosylation in vivo. Inhibition of mannose and glucose incorporation into lipid-linked oligosaccharides. *Eur. J. Biochem.* **109**, 331–341.
- de Beaucoudrey, L., Puel, A., Filipe-Santos, O., Cobat, A., Ghandil, P., Chrabieh, M., Feinberg, J., von Bernuth, H., Samarina, A., Janni re, L., et al. (2008). Mutations in STAT3 and IL12RB1 impair the development of human IL-17-producing T cells. *J. Exp. Med.* **205**, 1543–1550.
- DeBerardinis, R.J., Lum, J.J., Hatzivassiliou, G., and Thompson, C.B. (2008). The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.* **7**, 11–20.
- Derynck, R., and Zhang, Y.E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling. *Nature* **425**, 577–584.
- Egan, P.J., van Nieuwenhuijze, A., Campbell, I.K., and Wicks, I.P. (2008). Promotion of the local differentiation of murine Th17 cells by synovial macrophages during acute inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* **58**, 3720–3729.
- Ghoreschi, K., Laurence, A., Yang, X.P., Tato, C.M., McGeachy, M.J., Konkel, J.E., Ramos, H.L., Wei, L., Davidson, T.S., Bouladoux, N., et al. (2010). Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF- β signalling. *Nature* **467**, 967–971.
- Goodall, J.C., Wu, C., Zhang, Y., McNeill, L., Ellis, L., Saudek, V., and Gaston, J.S. (2010). Endoplasmic reticulum stress-induced transcription factor, CHOP, is crucial for dendritic cell IL-23 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 17698–17703.
- Gorelik, L., and Flavell, R.A. (2000). Abrogation of TGF β signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. *Immunity* **12**, 171–181.
- Grivnikov, S.I., Wang, K., Mucida, D., Stewart, C.A., Schnabl, B., Jauch, D., Taniguchi, K., Yu, G.Y., Osterreicher, C.H., Hung, K.E., et al. (2012). Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature* **491**, 254–258.
- Hahn, J.N., Falck, V.G., and Jirik, F.R. (2011). Smad4 deficiency in T cells leads to the Th17-associated development of premalignant gastroduodenal lesions in mice. *J. Clin. Invest.* **121**, 4030–4042.
- Harris, T.J., Grosso, J.F., Yen, H.R., Xin, H., Kortylewski, M., Albesiano, E., Hipkiss, E.L., Getnet, D., Goldberg, M.V., Maris, C.H., et al. (2007). Cutting edge: An in vivo requirement for STAT3 signaling in TH17 development and TH17-dependent autoimmunity. *J. Immunol.* **179**, 4313–4317.
- Hermann-Kleiter, N., and Baier, G. (2010). NFAT pulls the strings during CD4⁺ T helper cell effector functions. *Blood* **115**, 2989–2997.
- Hetz, C., Lee, A.H., Gonzalez-Romero, D., Thielen, P., Castilla, J., Soto, C., and Glimcher, L.H. (2008). Unfolded protein response transcription factor XBP-1 does not influence prion replication or pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 757–762.
- Hirano, M., Guo, P., McCurley, N., Schorpp, M., Das, S., Boehm, T., and Cooper, M.D. (2013). Evolutionary implications of a third lymphocyte lineage in lampreys. *Nature* **501**, 435–438.
- Ho, P.C., Bihuniak, J.D., Macintyre, A.N., Staron, M., Liu, X., Amezcua, R., Tsui, Y.C., Cui, G., Micevic, G., Perales, J.C., et al. (2015). Phosphoenolpyruvate is a metabolic checkpoint of anti-tumor T cell responses. *Cell* **162**, 1217–1228.

- Hunter, C.A., and Jones, S.A. (2015). IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat. Immunol.* *16*, 448–457.
- Ichiyama, K., Sekiya, T., Inoue, N., Tamiya, T., Kashiwagi, I., Kimura, A., Morita, R., Muto, G., Shichita, T., Takahashi, R., and Yoshimura, A. (2011). Transcription factor Smad-independent T helper 17 cell induction by transforming-growth factor- β is mediated by suppression of eomesodermin. *Immunity* *34*, 741–754.
- Kaufman, R.J. (1999). Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev.* *13*, 1211–1233.
- Kaufman, R.J., Scheuner, D., Schröder, M., Shen, X., Lee, K., Liu, C.Y., and Arnaud, S.M. (2002). The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *3*, 411–421.
- Kestra-Gounder, A.M., Byndloss, M.X., Seyffert, N., Young, B.M., Chávez-Arroyo, A., Tsai, A.Y., Cevallos, S.A., Winter, M.G., Pham, O.H., Tiffany, C.R., et al. (2016). NOD1 and NOD2 signalling links ER stress with inflammation. *Nature* *532*, 394–397.
- Kleinewietfeld, M., Manzel, A., Titze, J., Kvakana, H., Yosef, N., Linker, R.A., Müller, D.N., and Hafler, D.A. (2013). Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. *Nature* *496*, 518–522.
- Korn, T., Bettelli, E., Gao, W., Awasthi, A., Jäger, A., Strom, T.B., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. (2007). IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* *448*, 484–487.
- Kryczek, I., Banerjee, M., Cheng, P., Vatan, L., Szeliga, W., Wei, S., Huang, E., Finlayson, E., Simeone, D., Welling, T.H., et al. (2009). Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood* *114*, 1141–1149.
- Laurence, A., Tato, C.M., Davidson, T.S., Kanno, Y., Chen, Z., Yao, Z., Blank, R.B., Meylan, F., Siegel, R., Hennighausen, L., et al. (2007). Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* *26*, 371–381.
- Leong, M.L., Maiyar, A.C., Kim, B., O’Keeffe, B.A., and Firestone, G.L. (2003). Expression of the serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase, Sgk, is a cell survival response to multiple types of environmental stress stimuli in mammary epithelial cells. *J. Biol. Chem.* *278*, 5871–5882.
- Ma, C.S., Chew, G.Y., Simpson, N., Priyadarshi, A., Wong, M., Grimbacher, B., Fulcher, D.A., Tangye, S.G., and Cook, M.C. (2008). Deficiency of Th17 cells in hyper IgE syndrome due to mutations in STAT3. *J. Exp. Med.* *205*, 1551–1557.
- Maloy, K.J., and Powrie, F. (2011). Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature* *474*, 298–306.
- Manel, N., Unutmaz, D., and Littman, D.R. (2008). The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor- β and induction of the nuclear receptor ROR γ mat. *Nat. Immunol.* *9*, 641–649.
- 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- β induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* *441*, 231–234.
- Miossec, P., and Kolls, J.K. (2012). Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nat. Rev. Drug Discov.* *11*, 763–776.
- Moncoq, K., Trieber, C.A., and Young, H.S. (2007). The molecular basis for cyclopiazonic acid inhibition of the sarcoplasmic reticulum calcium pump. *J. Biol. Chem.* *282*, 9748–9757.
- Moriggl, R., Topham, D.J., Teglund, S., Sexl, V., McKay, C., Wang, D., Hoffmeyer, A., van Deursen, J., Sangster, M.Y., Bunting, K.D., et al. (1999). Stat5 is required for IL-2-induced cell cycle progression of peripheral T cells. *Immunity* *10*, 249–259.
- 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. USA* *107*, 14751–14756.
- 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.
- O’Garra, A., Stockinger, B., and Veldhoen, M. (2008). Differentiation of human T(H)-17 cells does require TGF- β . *Nat. Immunol.* *9*, 588–590.
- Park, Y.J., Yoo, S.A., and Kim, W.U. (2014). Role of endoplasmic reticulum stress in rheumatoid arthritis pathogenesis. *J. Korean Med. Sci.* *29*, 2–11.
- Sherlock, J.P., Joyce-Shaikh, B., Turner, S.P., Chao, C.C., Sathe, M., Grein, J., Gorman, D.M., Bowman, E.P., McClanahan, T.K., Yearley, J.H., et al. (2012). IL-23 induces spondyloarthritis by acting on ROR- γ t+ CD3+CD4-CD8-enthesal resident T cells. *Nat. Med.* *18*, 1069–1076.
- Shi, L.Z., Wang, R., Huang, G., Vogel, P., Neale, G., Green, D.R., and Chi, H. (2011). HIF1 α -dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells. *J. Exp. Med.* *208*, 1367–1376.
- Stockinger, B., and Veldhoen, M. (2007). Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr. Opin. Immunol.* *19*, 281–286.
- Stromnes, I.M., Cerretti, L.M., Liggitt, D., Harris, R.A., and Goverman, J.M. (2008). Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells. *Nat. Med.* *14*, 337–342.
- Todd, D.J., Lee, A.H., and Glimcher, L.H. (2008). The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 663–674.
- Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* *324*, 1029–1033.
- Veldhoen, M. (2009). The role of T helper subsets in autoimmunity and allergy. *Curr. Opin. Immunol.* *21*, 606–611.
- Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J., Locksley, R.M., and Stockinger, B. (2006a). TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* *24*, 179–189.
- Veldhoen, M., Hocking, R.J., Flavell, R.A., and Stockinger, B. (2006b). Signals mediated by transforming growth factor- β initiate autoimmune encephalomyelitis, but chronic inflammation is needed to sustain disease. *Nat. Immunol.* *7*, 1151–1156.
- Volpe, E., Servant, N., Zollinger, R., Bogiatzi, S.I., Hupé, P., Barillot, E., and Soumelis, V. (2008). A critical function for transforming growth factor- β , interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat. Immunol.* *9*, 650–657.
- Wang, M., and Kaufman, R.J. (2014). The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. *Nat. Rev. Cancer* *14*, 581–597.
- Wang, H., Flach, H., Onizawa, M., Wei, L., McManus, M.T., and Weiss, A. (2014). Negative regulation of Hif1 α expression and TH17 differentiation by the hypoxia-regulated microRNA miR-210. *Nat. Immunol.* *15*, 393–401.
- 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., et al. (2007). Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat. Immunol.* *8*, 950–957.
- Wu, C., Yosef, N., Thalhamer, T., Zhu, C., Xiao, S., Kishi, Y., Regev, A., and Kuchroo, V.K. (2013). Induction of pathogenic TH17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1. *Nature* *496*, 513–517.
- Xie, Q., Khaoustov, V.I., Chung, C.C., Sohn, J., Krishnan, B., Lewis, D.E., and Yoffe, B. (2002). Effect of tauroursodeoxycholic acid on endoplasmic reticulum stress-induced caspase-12 activation. *Hepatology* *36*, 592–601.
- 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- β are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature* *454*, 350–352.
- Yosef, N., Shalek, A.K., Gaublot, J.T., Jin, H., Lee, Y., Awasthi, A., Wu, C., Karwacz, K., Xiao, S., Jorgolli, M., et al. (2013). Dynamic regulatory network controlling TH17 cell differentiation. *Nature* *496*, 461–468.
- Zinszner, H., Kuroda, M., Wang, X., Batchvarova, N., Lightfoot, R.T., Remotti, H., Stevens, J.L., and Ron, D. (1998). CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* *12*, 982–995.
- Zygmunt, B., and Veldhoen, M. (2011). T helper cell differentiation more than just cytokines. *Adv. Immunol.* *109*, 159–196.

Cell Reports, Volume 19

Supplemental Information

**Cellular Stress in the Context of an Inflammatory
Environment Supports TGF- β -Independent
T Helper-17 Differentiation**

Verena Brucklacher-Waldert, Cristina Ferreira, Marisa Stebegg, Olivier Fesneau, Silvia Innocentin, Julien C. Marie, and Marc Veldhoen

Supplementary figure 1

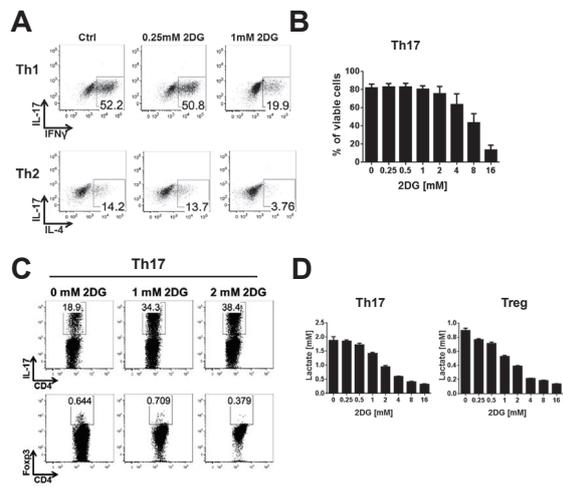


Figure S1. Hypoglycemia enhances Th17 cell differentiation, Related to figure 1.

Naive mouse T cells were cultured on anti-CD3/CD28 coated wells for 72 hours under indicated Th subset polarization conditions in the absence or presence of indicated concentrations of 2DG. (A) T cells were cultured under Th1 or Th2 polarizing conditions with or without 2DG and stained intracellularly for IL-17 and IFN γ or IL-4. (B) Th17 cells were assessed for viability at day 3 of culture and proportions of viable cells plotted against concentration of 2DG. (C) Upon Th17 culture conditions, with or without 1 or 2 mM 2DG, cells were stained intracellularly for IL-17 (top row) or Foxp3 (bottom row). (D) Th17 cells (left panel) or Treg cells (right panel) were assessed for lactate production at 36 hours of culture. Results are representative of six (A, C) or two (B, D) experiments. Error bars represent S.D. of pooled data (n=4).

Supplementary figure 2

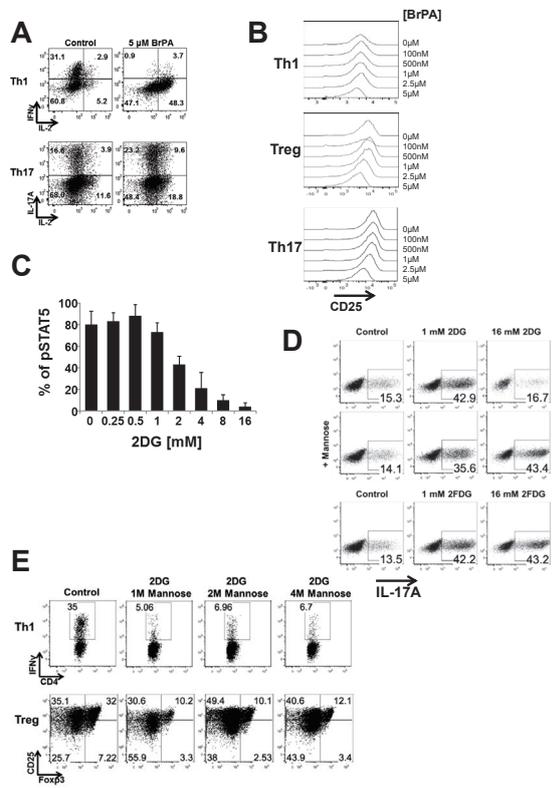


Figure S2. 2DG enhances IL-2 production but inhibits IL-2R expression - Related to figure 2. Naive mouse CD4⁺ T cells were cultured on anti-CD3/CD28 coated wells under indicated Th subset polarization conditions for 72 hours in the absence or presence of (A,B) BrPA or (C-E) 2DG. (A) Naive T cells were cultured under Th1 (top rows) or Th17 (bottom rows) cell polarization condition with control (left panels) or with 5 μ M BrPA (right panels) and assessed for IL-2 and IFN γ or IL17 production. (B) Naive T cells were cultured under Th1 (top panel) Treg (middle panel) or Th17 (bottom panel) cell polarization condition with indicated concentrations of BrPA and assessed for CD25 (IL2R α) expression after 20 hours by flow cytometry. (C) Naive T cells cultured under Th17 differentiation conditions were stained intracellularly for phosphorylated STAT5 and proportions of positive cells over isotype control are displayed. (D) T cells were cultured under Th17 cell polarizing conditions with indicated concentration of 2DG (top two rows), 1 mM mannose (second row) or indicated concentrations of 2FDG (bottom row) and stained intracellularly for IL-17. (E) T cells were cultured under Th1 (top row) or Treg (bottom row) cell polarizing conditions with 1 mM 2DG and indicated concentrations of mannose and stained for CD4 and IFN γ (top row) or CD25 and Foxp3 (bottom row). Results are representative of at least three experiments. Error bars represent S.D. of pooled data (n=6).

Supplementary figure 3

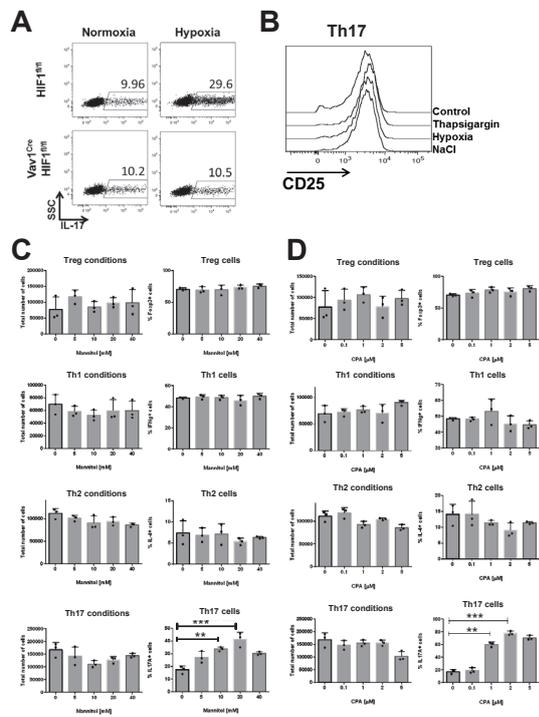


Figure S3. Cell stress enhances Th17 cell differentiation. Related to figure 3.

Naive mouse CD4⁺ T cells were cultured under Th17 cell polarization conditions for 72 hours. (A) Naive T cells isolated from HIF1 β controls (top row) or V α 1 β HIF1 β (bottom row) mice were cultured under normoxia (right column) or hypoxia (right column) and assessed by flow cytometry for IL-17 production. (B) Naive T cells were cultured under Th17 cell polarizing conditions with indicated stress inducers and surface CD25 expression intensity was assessed by flow cytometry. (C-D) Naive T cells were cultured under indicated Th polarization conditions and numbers of total cells recovered (left column) and proportion of polarization (right column) are provided for co-cultures in the presence of indicated concentrations of (C) mannitol or (D) CPA. Results are representative of two (A) or three (B, C, D) experiments. Error bars represent S.D. of pooled data. *p<0.05; **p<0.01 and ***p<0.001.

Supplementary figure 4

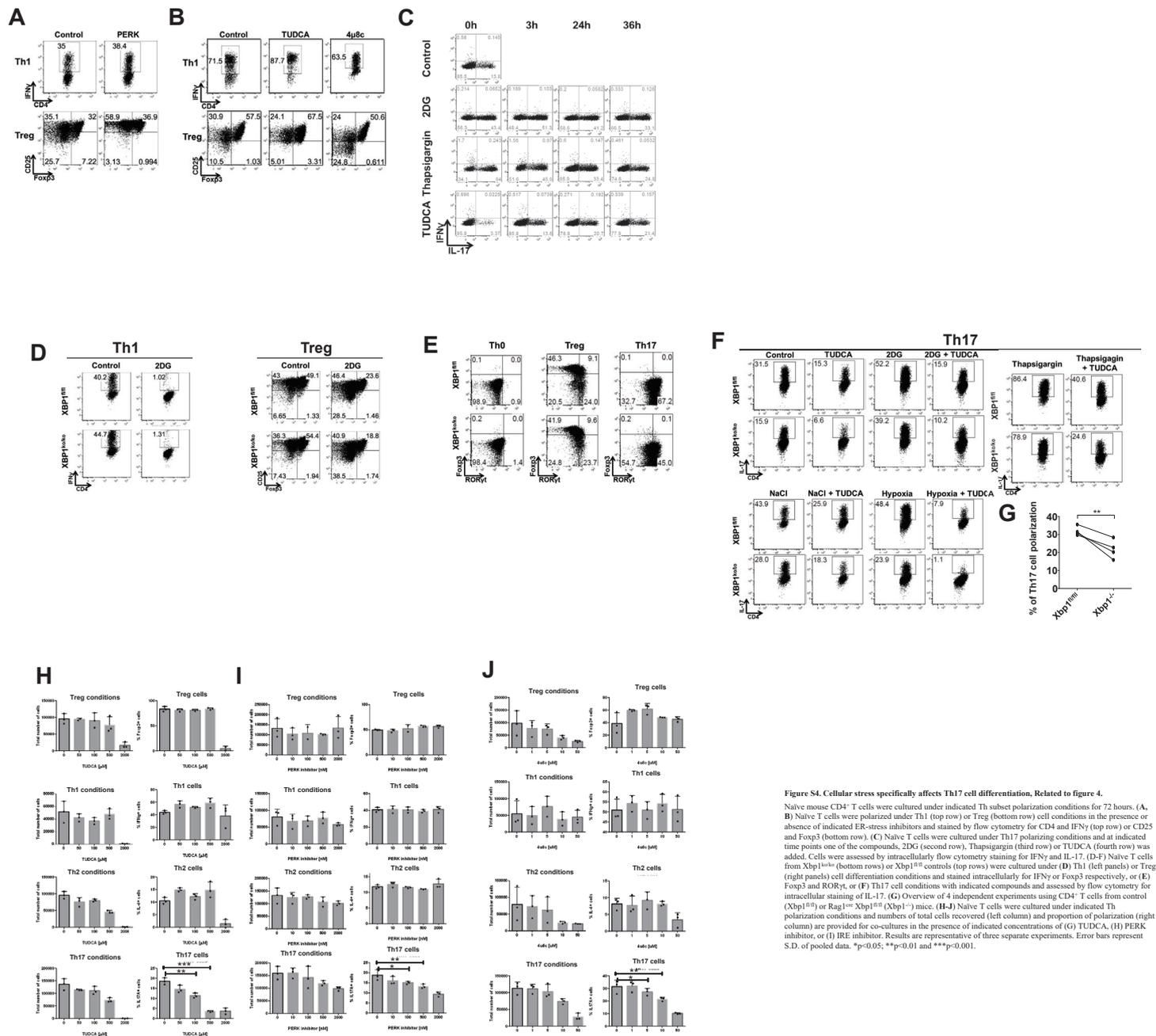


Figure S4. Cellular stress specifically affects Th17 cell differentiation, Related to figure 4.

Naive mouse CD4⁺ T cells were cultured under indicated Th subset polarization conditions for 72 hours. (A, B) Naive T cells were polarized under Th1 (top row) or Treg (bottom row) cell conditions in the presence or absence of indicated ER-stress inhibitors and stained by flow cytometry for CD4 and IFN γ (top row) or CD25 and Foxp3 (bottom row). (C) Naive T cells were cultured under Th17 polarizing conditions and at indicated time points one of the compounds, 2DG (second row), Thapsigargin (third row) or TUDCA (fourth row) was added. Cells were assessed by intracellular flow cytometry staining for IFN γ and IL-17. (D-F) Naive T or Treg cells from Xbp1^{flmo} (bottom rows) or Xbp1^{flm} controls (top rows) were cultured under (D) Th1 (left panels) or Treg (right panels) cell differentiation conditions and stained intracellularly for IFN γ or Foxp3 respectively, or (E) Foxp3 and ROR γ t, or (F) Th17 cell conditions with indicated compounds and assessed by flow cytometry for intracellular staining of IL-17. (G) Overview of 4 independent experiments using CD4⁺ T cells from control (Xbp1^{flm}) or Rag1^{flm}Xbp1^{flmo} (Xbp1^{flmo}) mice. (H-J) Naive T cells were cultured under indicated Th polarization conditions and numbers of total cells recovered (left column) and proportion of polarization (right column) are provided for co-cultures in the presence of indicated concentrations of (G) TUDCA, (H) PERK inhibitor, or (I) IRE1 inhibitor. Results are representative of three separate experiments. Error bars represent S.D. of pooled data. *p<0.05; **p<0.01 and ***p<0.001.

Supplementary figure 5

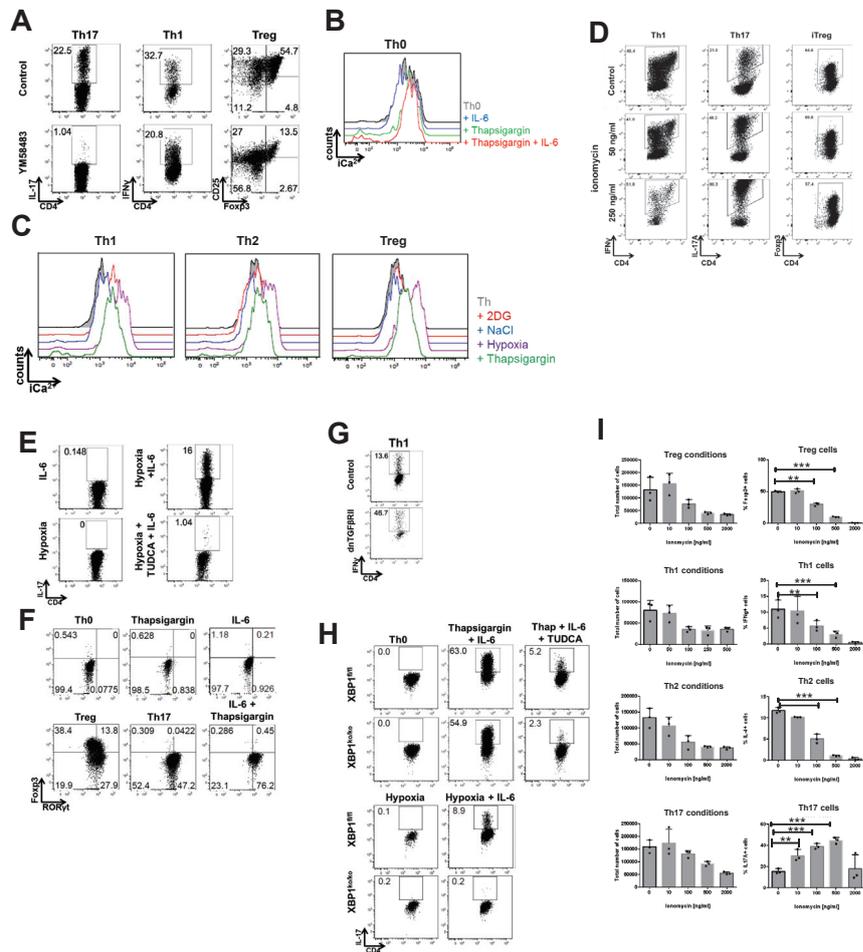


Figure S5. Sustained cytoplasmic calcium levels drive Th17 differentiation, Related to figure 5.

Naive mouse CD4⁺ T cells were cultured under indicated Th subset polarization conditions for 72 hours. (A) Indicated subsets were differentiated from naive T cells upon culture with DMSO (control, top rows) or the CRAC inhibitor YM58483 (bottom rows) and stained intracellularly for IL-17, IFN γ or Foxp3. (B, C) Upon 20 hours of culture, naive T cells under (B) neutral conditions were compared with those cultured in the presence of IL-6 (blue), thapsigargin (green) or both (red), or (C) indicated Th differentiation conditions and co-culture with indicated ER-stress inducers, cells were assessed for cytoplasmic calcium levels. (D) Indicated subsets were differentiated from naive T cells upon culture with vehicle control (top row) or 50 (middle row) or 250 (bottom row) ng/ml ionomycin and stained intracellularly for IL-17, IFN γ or Foxp3. (E) Naive T cells were cultured with only IL-6, under hypoxic conditions only, with IL-6 or with IL-6 and TUDCA under hypoxic conditions. Cells were assessed for Th17 cell differentiation by intracellular staining for Foxp3 and ROR γ t. (F) Naive T cells were cultured under conditions indicated and assessed by intracellular flow cytometry staining for the presence of protein for Foxp3 and ROR γ t. (G) Naive T cells from dnTGF β RII (bottom rows) or controls (top rows) were cultured under Th1 polarization conditions in normoxia or hypoxia as indicated. Cells were assessed for Th1 differentiation by intracellular staining for IFN γ . (H) Naive T cells from Xbp1^{fl/fl} (bottom rows) or Xbp1^{fl/cr} controls (top rows) were cultured under indicated conditions and assessed for the expression of IL-17 by flow cytometry. (I) Naive T cells were cultured under indicated Th polarization conditions and numbers of total cells recovered (left column) and proportion of polarization (right column) are provided for co-cultures in the presence of indicated concentrations of Ionomycin. Results are representative of at least three separate experiments. Error bars represent S.D. of pooled data. *p<0.05; **p<0.01 and ***p<0.001.

Supplementary figure 6

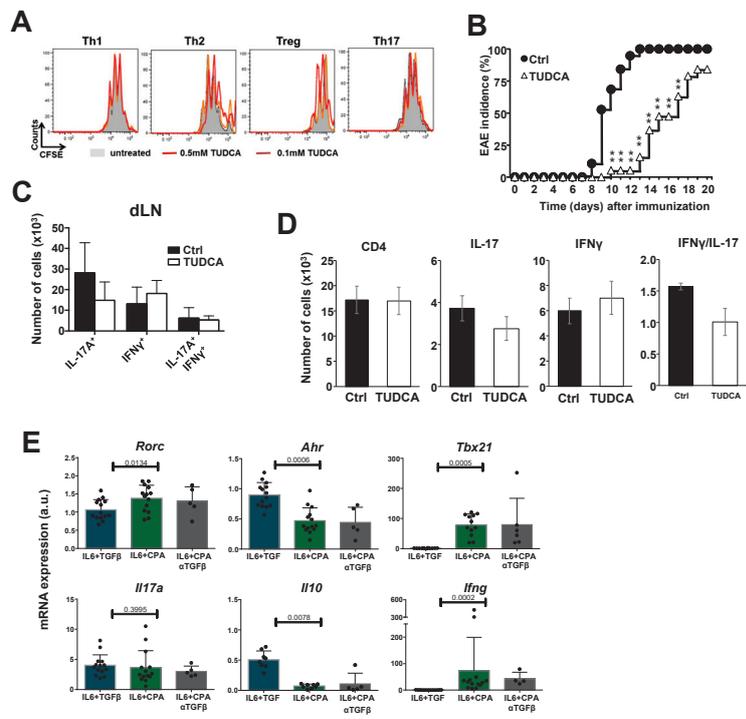


Figure S6. Inhibition of cellular stress reduces onset of EAE. Related to Figure 6.

(A) Naïve T cells were loaded with CFSE and cultured for 3 days under Th subset polarizing conditions in the presence of indicated concentrations of TUDCA. (B-C) C57BL/6 mice were subjected to MOG/CFA administration to induce EAE daily PBS or 250 mg/kg TUDCA dosing. (B) Incidence score of onset of EAE mice immunized with MOG/CFA and PBS (filled symbols) or TUDCA (open symbols) (n=19 from three biological repeats). (C) Total T cell numbers expressing indicated cytokines harvested from the inguinal lymph node (iLN) 12 days after EAE induction are shown in control (black bars) and TUDCA treated (open bars) mice. Data were obtained from 6 mice of each condition. (D) Total CD4⁺ T cell numbers expressing indicated cytokines harvested from the spinal cord 16 days after EAE induction are shown in control (black bars) and TUDCA treated (open bars) mice. TUDCA was administered from day 9, prior to onset of clinical symptoms of EAE. Data were obtained from 6 mice of each condition. (E) Naïve CD4⁺ T cells were stimulated by plate bound anti-CD3/CD28 for 3 days in the presence of IL-6 and TGF β , or CPA or CPA and anti-TGF β . Subsequently expression profiles were determined for indicated genes (n=8-14). Error bars represent SEM of pooled data. *p<0.05; **p<0.01 and ***p<0.001. Student's t-test. EAE clinical scores and day of onset were assessed by Mann-Whitney test on each separate day.

II. Article 2 : Transforming growth factor beta signaling is the guardian of the stability of differentiated Th17 cells *in vivo*

**Transforming Growth Factor-beta signaling is the guardian of the stability of
differentiated Th17 cells *in vivo***

Olivier Fesneau¹, Baptiste Vieille¹, Brigitta Stockinger², and Julien C. Marie¹

¹ Department of Immunology Virology and Inflammation, Cancer Research Center of Lyon
INSERM U 1052, CNRS UMR 5286, Centre Léon Bérard, Claude Bernard Lyon1 University,
69373, Lyon, France

² Francis Crick institute, NW1 1AT, London, United Kingdom

Abstract

Th17 cells compose a unique subset of CD4⁺ T lymphocytes that expresses high levels of IL-17. Under steady state conditions, Th17 cells are mainly found in the gut of mammals. Their differentiation from naïve CD4⁺ T cells is known to be dependent on Transforming Growth Factor beta (TGF- β), a cytokine highly expressed in the intestine. However, the effects *in vivo* of TGF- β on differentiated Th17 cells remain totally unexplored. Using genetic approaches with loss and gain of TGF- β signaling selectively in Th17 cells, as well as IL-17 tracking-fate mouse models, we revealed that TGF- β prevents differentiated Th17 cells from becoming Th1 cells in the gut. Through its non-canonical pathway, TGF- β represses T-Bet, and sustains Ror γ t expression. The former Th17 cells, which expressed IFN- γ and not IL-17 anymore, induce chronic gut inflammation. Thus, TGF- β is persistently needed for maintaining the Th17 cell-stability *in vivo* preventing Th17 conversion in pathogenic Th1 cells.

Introduction

The CD4⁺ T helper (Th) cell subsets are largely defined by the signature cytokines they produce and their lineage-associated transcription factors. Hence, Th1 cells are characterized by their expression of IFN- γ and the transcription factor T box expressed in T cells (T-Bet). Th2 cells express IL-4, -5, -13, and the transcription factor GATA3. Treg cells are defined by the expression of forkhead box p3 (Foxp3) (Hori, 2003), and Th17 cells express IL-17A, IL-17F, IL-22 and ROR γ t and ROR α (Ivanov et al., 2006). Each CD4⁺ Th cell subset is often ascribed a specific role in immunity, such as providing help to clear intracellular pathogens (Th1), helminths (Th2), and extracellular bacteria and fungi (Th17) (Brucklacher-Waldert et al., 2014). Furthermore, Th1 and Th17 cell subsets also play a prominent role in aberrant immunity/ inflammation (Cua et al., 2003; Veldhoen et al., 2006).

CD4⁺ Th cell polarization is largely, but not exclusively, influenced by their local environment and particularly by the cytokines present. *In vitro* the optimal differentiation of naïve CD4⁺ T lymphocytes to Th17 cells requires the presence of at least two cytokines: IL-6 and Transforming Growth Factor β (TGF- β) (Bettelli et al., 2006; Veldhoen et al., 2006). Indeed, IL-6 activates STAT-3 signaling and induces the expression of *Rora* and *Rorc* (ROR- γ t) and blocks that of *Foxp3* (Heink et al., 2017; Stockinger and Veldhoen, 2007). TGF- β induces the kinase activity of the intracellular domain of TGF- β RII subunit, which in turn phosphorylates the kinase domain of the TGF- β RI subunit. This latter initiates the cascade of activation of SMAD-dependent and non-canonical pathways including ERK/MAPK (Derynck and Zhang, 2003). The SMAD-dependent signaling pathway involves SMAD2 and SMAD3 proteins which, when phosphorylated by TGF- β RI, can bind to SMAD4 and/or TRIM33 and act as transcription factors regulating the expression of several target genes. The SMAD4 dependent and the TRIM33 dependent branches were depicted to influence the differentiation

of Th17 cells The TRIM33 branch induces the expression of *rorc* and seems essential to establish the Th17 lineage commitment by the TGF- β (Tanaka et al., 2018). In the absence of TGF- β , SMAD4 associated with SKI inhibits *rorc* expression, while the presence of TGF- β induces the degradation of SKI and the expression of *rorc* (Zhang et al., 2017).

In line with the high levels of TGF- β in the gut, under steady state conditions, Th17 cells are mainly found in small intestine and in the colon, particularly in the lamina propria as well as in the Peyer's patches (Korn et al., 2009). Hence, once differentiated, Th17 cells keep receiving TGF- β signal from the TGF- β present in the gut. However, whether TGF- β signaling plays a role on already differentiated Th17 cells remains totally unknown. This study reveals that TGF- β signaling is persistently needed for maintaining the *in vivo* stability of the Th17 cell, and prevents their conversion in pathogenic Th1 cells.

Results

TGF- β signaling in already differentiated Th17 cells prevents from chronic gut inflammation

To selectively distinguish the contribution of TGF- β in Th17 cell-differentiation versus its role on differentiated Th17 cells, we generated mice in which TGF- β signaling was either selectively inactivated or hyper-activated in IL-17A producing cells. We bred *Il-17a-CRE* mice (Hirota et al., 2011), with mice bearing either floxed alleles of *Tgf β R2* (Levéen et al., 2005), (TGF- β R-KO) or a constitutively active (CA) form of *Tgf β R1* placed after a floxed stop cassette (Bartholin et al., 2008) (TGF- β R-CA). By 7-9 months of age TGF- β R-KO animals started to loss weight (data not shown). Around a year of age, the organ morphology analysis revealed an enlargement of the pyloric antrum as well as of the proximal part of the duodenum in TGF- β R-KO mice compared to TGF- β R-WT mice and TGF- β R-CA mice of the same age (**Figure 1A**).

Histology analysis of TGF- β R-KO animals demonstrated a progressive infiltration after 6 months of age in the lamina propria of duodenum, largely colonized by mononuclear and polynuclear cells, and after 10 months of age, the chronic inflammation was associated with fibrosis and dysplasia (**Figure 1B**). The lamina propria (LP) of both the rest of small intestine and the colon were also highly infiltrated in myeloid cells in TGF- β R-KO mice in association with numerous abscesses (**Figure 1C, supl figure 1 and not shown**). Of note, beside the gut chronic inflammation, no pathology sign was observed elsewhere in the TGF- β R-KO mice.

Because IL-17-A can be produced by other cells than Th17 cells, including $\gamma\delta$ T cells, invariant NKT cells and innate lymphoid cells 3 (ILC3), we selectively transferred CD3^{pos}, α,β TCR^{pos}, NK1.1^{neg} cells from the mesenteric lymph nodes (MLN) of either TGF- β R-KO mice or their wild type littermate controls into RAG deficient mice. Four months later, only the animals bearing α,β T cells from TGF- β R-KO mice started to lose weight (data not shown) and presented an enlargement of pyloric antrum as well as of the proximal part of the duodenum (**Figure 1D**) as observed in TGF- β R-KO mice (**Figure 1A**). The histology analysis of the intestine revealed similar infiltration and dysplasia in the duodenum of animal bearing α,β T cells from TGF- β R-KO mice as observed in TGF- β R-KO mice as well as abscesses in the lamina propria of the small intestine (**Figure 1E** and not shown). Thus, this first set of data reveals that TGF- β signaling in already differentiated Th17 cells is essential to prevent from chronic intestine inflammation associated with transformation signs of the duodenum.

TGF- β signaling represses the proportion of differentiated Th17 cells in the gut

In order to decipher the mechanisms by which TGF- β signaling in Th17 cells prevents from chronic intestinal inflammation, we crossed TGF- β R-KO mice, TGF- β R-WT mice and TGF- β R-CA mice with *Rosa-26 stop^{FlxFlx}-yfp* mice. In the generated animals, the fate of Th17

cells, with either a gain or loss of TGF- β signaling, can be tracked by monitoring the expressing of the yellow fluorescence protein (YFP) which represents the cells that either express or expressed IL-17A.

Surprisingly, in the lamina propria of the small intestine (SILP) and of the colon (CLP), as well as in the MLN and in the Peyer's patches (PP), YFP⁺ hematopoietic cells (CD45⁺) were 5-10 times more abundant in TGF- β R-KO mice compared to TGF- β R-WT mice and 15-25 times higher compared to TGF- β R-CA mice (**Figure 2A**). In total agreement with a role of TGF- β signaling in restraining the size of the differentiated IL-17A producing population, the proportion of YFP⁺ cells among CD45⁺ cells were 3-7 times lower in TGF- β R-CA mice compared to TGF- β R-WT mice (**Figure 2A**). Interestingly, this outnumbering of IL-17A producing committed cells had been gradually observed after 3 months of age (**Figure 2B**) and thus was concomitant with the gut chronic inflammation observed in figure 1. The analysis of the CD4⁺ T cell compartment demonstrated a large proportion of YFP⁺ T lymphocytes in TGF- β R-KO mice, and a profound decrease of these cells TGF- β R-CA mice compared TGF- β R-WT mice (**Figures 2C**). Of note, the proportion of YFP⁺ cell among the other immune cells producing IL-17A, including CD8 TCR α,β cells, iNKT cells, TCR γ,δ lymphocytes was not altered by the modification of the intensity of TGF- β signaling (**Figure 2 D-E**).

Given that the SMAD4 branch, and the TRIM33 branch of the TGF- β signaling pathway were both depicted to control the differentiation of Th17 cells from naïve CD4⁺ T cells (Tanaka et al., 2018; Zhang et al., 2017), we next addressed the contribution of these two pathways on the homeostasis of already differentiated Th17 cells. In this end, we generated *Il-17a-CRE; Trim33^{flx/flx}; Rosa-26 stop^{FlxFlx}-yfp* (TRIM33 KO) mice, *Il-17a-CRE; smad4^{flx/flx}; Rosa-26 stop^{FlxFlx}-yfp* (SMAD4-KO) mice; as well as *Il-17a-CRE; smad4^{flx/flx};tgfbr2^{xl/flx} Rosa-26 stop^{FlxFlx}-yfp* double deficient mice (DKO) mice. Interestingly, in clear contrast with the total deprivation of TGF- β signaling in TGF- β R-KO mice, the deprivation of the SMAD4/TRIM33

dependent pathways was not associated with any sign of intestinal inflammation (**Figure 3A**). Moreover, the proportion of YFP⁺ cells in the gut of the SMAD4-KO mice, TRIM33 KO mice, and DKO mice were similar to that observed wild type littermate controls (**Figure 3 B-C**). Thus, altogether these data reveal that the size of the population engaged in the Th17 lineage is negatively regulated by the SMAD4/TRIM33 independent branch of TGF- β signaling.

Th17 cells escaping TGF- β controls become pathogenic Th1 cells

Next, we analyzed the effects of TGF- β signaling on the outcome of differentiated Th17 cells based on the YFP expression allowing to track the fate of cells that were engaged in the Th17 lineage. In clear contrast to TGF β R-WT mice in which YFP⁺ CD4⁺ T cells were mainly IL17-A^{Pos} (50%), and only a small fraction was IFN- γ ^{pos} (2%), in TGF β R-KO mice the proportion YFP⁺ CD4⁺ T cells expressing IL-17A was halved, and around 15-20% of YFP⁺ CD4⁺ T cells expressed the Th1 cytokine IFN- γ (**Figure 4A**). Of note, contrary to TGF β R-WT mice, the majority of IFN- γ ⁺ CD4⁺ YFP⁺ T cells from TGF β R-KO mice did not co-express IL-17A implying that these Th1 cells were ex-Th17 (Th1/ex-Th17) cells rather than Th1/Th17 cells (producing both IL17A and IFN- γ). Importantly, we observed that IFN- γ ^{pos} YFP^{pos} CD4^{pos} T cells from TGF β R-KO mice expressed also GM-CSF and TNF- α , cytokine profile conventional associated to potent pro-inflammatory cells (**Figure 4A**). Interestingly, the expression of IL-22, another cytokine classically associated to the Th17 lineage, was not affected by the deprivation of TGF- β signaling (**Supplementary Figure 2**) and the IL-22 producing T cells, did not co-expressed IFN- γ (data not shown)

In line with the switch from a Th17 profile to aTh1 profile, YFP^{pos} CD4^{pos} TGF β R-KO T cells exhibited a profound decrease of the Ror γ t expression whereas the expression clear T-Bet (the Th1 transcriptional factor) was highly exacerbated compared to YFP^{pos} CD4^{pos} T cells from TGF β R-WT mice (**Figure 4C-D**). In total agreement with this acquisition of a Th1

profile by YFP^{pos} CD4^{pos} T cells from TGFβR-KO mice, CCR6 expression was reduced at the surface of these cells expressed whereas that of CXCR3 was increased (**Figure 4E**). It was noteworthy that the loss of Rorγt expression and the acquisition of T-bet expression were restricted to YFP⁺ CD4⁺ T cells (**Figure 4C-D**) excluding a bystander effect. In the same line, Rag KO mice reconstituted with 50:50 bone marrow (BM) from TGFβR-KO mice and TGFβR-WT mice developed chronic gut inflammation associated with the massive conversion of Th17 cells in Th1 cells (**Supplementary figure 3**). Thus, TGF-β signaling maintain differentiated Th17 cells in the Th17 lineage and prevent their derivation towards the Th1 lineage.

We then addressed the contribution of the Th1/ex-Th17 cells in the chronic inflammation we observed in the gut of TGFβR-KO mice. Interestingly, similarly to TGFβR-KO animals, IL-17A-KO;TGFβR-KO double deficient mice developed chronic gut inflammation associated with the over-representation of YFP^{pos} CD4^{pos} T cells which expressed both IFN-γ and T-Bet and low levels of ROR-γt (**Supplementary figure 4**). This observation rules out the contribution of IL-17A in the chronic gut inflammation of TGFβR-KO, and comforts the hypothesis of a role of ex-Th17/Th1 cells rather than of Th1/Th17 cells in the pathology.

In order to definitively confirm this assumption, we generated TGFβR-KO mice unable to generate Th1 cells by breeding TGFβR-KO mice with T-bet-KO mice. In contrast with TGFβR-KO mice, in the resulting animals, neither weight loss nor gut pathology were observed (**Figure 4 F** and not shown). Thus, TGF-β signaling is persistently needed to prevent the conversion of differentiated Th17 cells into pathogenic Th1 cells responsible for the chronic gut inflammation.

Commensal bacteria are mandatory for the chronic gut inflammation

Given that abscess were observed in the lamina propria of TGF β R-KO mice (figure 1) that the commensal bacteria have been largely depicted to contribute the differentiation of Th17 cells *in vivo* (Atarashi et al., 2015), we next addressed their role in both the conversion of the Th17 cells to Th1 cells and in the chronic gut inflammation observed TGF β R-KO mice. Interestingly, while the transfer of CD4^{pos} T cells was sufficient to induce chronic gut inflammation in RAG-KO mice, the inflammation was totally abrogated when recipient-animals were placed under antibiotic treatment (**Figure 5A**), suggesting that the microbiota was essential for the disease development.

In line with previous works (Atarashi et al., 2015), we found a large defect in YFP⁺ cells in both TGF β R-WT mice and TGF β R-KO mice placed under antibiotic treatment since birth (data not shown). Once the antibiotic treatment occurred at 3-4 month of age, for 3 months long, the percentage of CD4⁺ YFP⁺ cells diminished in all animals (data not shown). However, the over representation of CD4⁺ YFP⁺ T cells was still observed in TGF β R-KO mice compared to TGF β R-WT mice (**Figure 5C**). Moreover, the CD4⁺ YFP⁺ T cells from in TGF β R-KO mice remained massively ex-Th17 /Th1cells based on T-bet and Ror γ t expression (**Figure 5D-E**). Thus, the microbiota plays a major role for the generation Th17 cells which aliment the pool of exTh17/Th1 observed in the absence of TGF- β . However, the microbiota seem not mandatory to sustain the ex-Th17 /Th1cell pathogenic phenotypes.

Autocrine TGF- β production is not required to sustain Th17 differentiation program

Finally, we analyzed the origin of the TGF- β responsible for the maintenance of the Th17 program in the gut. Given that TGF- β 1 produced in autocrine manner by CD4^{pos} T cells was reported as essential for the Th17 differentiation program (Gutcher et al., 2011), we first analyzed whether differentiated Th17 cells can auto-maintain their Th17 program by their own

production of TGF- β 1. To this end, we generated *Il-17a-CRE, tgfb1^{flx/flx} Rosa-26 stop^{FlxFlx}-yfp* (TGF β 1-KO) mice, in which cells engaged in the Th17 lineage failed to produce their own TGF- β 1. Strikingly, in clear contrast TGF β R-KO animals, TGF β 1-KO mice did not lose weight and did not develop intestinal chronic inflammation. Moreover, the YFP⁺ CD4⁺ T cells population was not over represented (**Figure 6A-B**) and no switch from Th17 to ex-Th17/Th1 cells observed was observed (**Figure 6C-D**). Thus, while an autocrine source of TGF- β is mandatory for naïve CD4 differentiation in Th17 cells, these results reveal that the stability of differentiated Th17 cells by TGF- β is not controlled by the Th17 cells per-se but by a paracrine source of TGF- β .

Discussion

Th17 cells have emerged as important mediators of host defense and homeostasis at barrier sites, particularly the intestines, where the greatest number and diversity of the microbiota resides. A critical balance exists between protection of the host from its own microbiota and pathogens and the development of immune-mediated disease. Breaches of local innate immune defenses provide critical stimuli for the induction of Th17 cell development, and additional cues within these tissues promote Th17 cell survival and/or plasticity. Normally, this results in eradication of the microbial threat and restitution of homeostasis. When dysregulated, however, Th17 cells can cause a range of immune-mediated diseases, whether directed against antigens derived from the microbiota, such as in inflammatory bowel disease, or against self-antigens in a range of autoimmune diseases (Bedoya et al., 2013).

This study demonstrates that TGF- β signaling is permanently required to sustain the differentiation program of Th17 cells. In the absence of TGF- β signaling control, differentiated Th17 cells become Th1 cells and these ex-Th17/Th1 lymphocytes induce a chronic gut inflammation establishing a fertile soil for transformation. Revealing that the stability of the

Th17 cells is directly dictated by TGF- β signaling, help to understand the development of several pathologies. Indeed, variation of TGF- β levels in the gut will directly influence the stability of the Th17 cells and thus the pathogenicity in the gut but also outside the gut. Indeed, Th17 cells generated in the gut were reported to directly influence autoimmune disorder in the brain in mouse models of EAE(Duc et al., 2019). In line with this, we observed that TGF β R-KO mice developed profound scores of EAE and that the EAE scores were mild in TGF β R-CA mice compared to their WT littermates (**Supplementary figure 5**).

Our results suggest that the main source of TGF- β sustaining Th17 stability is found in their micro-environment. We are currently analyzing the hypothesis that intestinal epithelial cells (IEC) could be the main providers of TGF- β using villin-CRE^{ERT-2}, TGF- β 1^{fl/fl} mice in which IEC are unable to produce TGF-b after tamoxifen injection. This assumption is comforted by the fact that the high levels of TGF- β in the gut have been reported to be largely altered during gastro-intestinal infection and inflammation and our personal observations revealing IEC as a high source of TGF- β . After an acute gut inflammations, TGF- β levels were reported to be high in the gut and in the blood (Ghoreschi et al., 2010; Lee et al., 2012). Based on our findings, we can postulate that this wave of TGF- β could avoid the switch of differentiated Th17 to Th1 and thus prevent from noxious chronic inflammation. The ability of the gut cells to contribute to Th17 cell biology has also been observed during the Th17 differentiation. Indeed, IEC cells sense bacteria such as Segmented filamentous bacteria and produce SAAB/A which promotes Th17 differentiation (Atarashi et al., 2015). Then, once the differentiation established, IEC will sustain the Th17 differentiation program by producing high amount of TGF- β .

Because TGF- β is a key cytokine in the regulation of the immune response, its role in the Th17 cell differentiation have been always counterintuitive. Our work reveals that not only TGF- β signaling is essential to induce the Th17 differentiation, but also that TGF- β signaling

is needed for differentiated Th17 cells to sustain their differentiation program and not become pathogenic Th1 cells. Interestingly, if TGF- β signaling promotes the differentiation of Th17 cells through the TRIM33 branch and that its SMAD4 dependent pathway stabilize repressor of *rorc* (encoding of Rorgt) in the absence of TGF- β (Tanaka et al., 2018; Zhang et al., 2017), we found that its through its non-canonical branch that TGF- β signaling sustains the Th17 lineage. Such a multifaceted role of the different branches of TGF- β signaling pathways has been already described for the iNKT cell development (Doisne et al., 2009)and could be dictated by the maturation stage of the cells.

If Th1/Th17 cells producing both IFN- γ and IL-17 are largely regarded as highly pathogenic cells (Ghoreschi et al., 2010; Lee et al., 2012), our work reveals that the double production of IL-17 and IFN- γ does not seem a main criteria for the pathogenic potential. Indeed, we found that exTh17/Th1 are also endowed with strong pathogenic features associated with chronic gut inflammation. One explanation to the chronic pathology associated to the exTh17/Th1 cells could be due to the fact that Th17 cells have been largely depicted to react against the microbiota antigens. The switch of cytokine production from IL-17 to IFN- γ likely induces the over expression of MHC-II by IEC and thus the other presentation of bacterial/ food antigens leading to the chronic inflammation (Thelemann et al., 2014). Antibiotic treatment will reduce, the differentiation of Th17 and thus the progenitors of ex Th17/Th1 cells. It will also altered the source of bacterial antigens and thus inflammation.

In sum, this study reveals that TGF- β signaling is permanently needed to sustain Th17 cell stability in the gut and avoid their conversion in pathogenic Th1 cell responsible of chronic intestinal infection. Maintaining high levels of TGF- β in the gut could constitute a key therapeutic approach to inflammatory bowel disease such as Crohn disease and ulcerative colitis and avoid their progression to transformation.

References

- Atarashi, K., Tanoue, T., Ando, M., Kamada, N., Nagano, Y., Narushima, S., Suda, W., Imaoka, A., Setoyama, H., Nagamori, T., et al. (2015). Th17 Cell Induction by Adhesion of Microbes to Intestinal Epithelial Cells. *Cell* *163*, 367–380.
- Bartholin, L., Cyprian, F.S., Vincent, D., Garcia, C.N., Martel, S., Horvat, B., Berthet, C., Goddard-Léon, S., Treilleux, I., Rimokh, R., et al. (2008). Generation of mice with conditionally activated transforming growth factor beta signaling through the T β RI/ALK5 receptor. *Genesis* *46*, 724–731.
- Bedoya, S.K., Lam, B., Lau, K., and Larkin, J. (2013). Th17 Cells in Immunity and Autoimmunity. *Clinical and Developmental Immunology* *2013*, 1–16.
- 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.
- Brucklacher-Waldert, V., Carr, E.J., Linterman, M.A., and Veldhoen, M. (2014). Cellular Plasticity of CD4⁺ T Cells in the Intestine. *Front. Immunol.* *5*.
- Cua, D.J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C.A., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L., To, W., Kwan, S., Churakova, T., et al. (2003). Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* *421*, 744–748.
- Derynck, R., and Zhang, Y.E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling. *425*, 8.
- Doisne, J.-M., Bartholin, L., Yan, K.-P., Garcia, C.N., Duarte, N., Le Luduec, J.-B., Vincent, D., Cyprian, F., Horvat, B., Martel, S., et al. (2009). iNKT cell development is orchestrated by different branches of TGF- β signaling. *The Journal of Experimental Medicine* *206*, 1365–1378.
- Duc, D., Vigne, S., Bernier-Latmani, J., Yersin, Y., Ruiz, F., Gaña, N., Leo, S., Lazarevic, V., Schrenzel, J., Petrova, T.V., et al. (2019). Disrupting Myelin-Specific Th17 Cell Gut Homing Confers Protection in an Adoptive Transfer Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Cell Reports* *29*, 378-390.e4.
- Ghoreschi, K., Laurence, A., Yang, X.-P., Tato, C.M., McGeachy, M.J., Konkel, J.E., Ramos, H.L., Wei, L., Davidson, T.S., Bouladoux, N., et al. (2010). Generation of pathogenic TH17

cells in the absence of TGF- β signalling. *Nature* 467, 967–971.

Gutcher, I., Donkor, M.K., Ma, Q., Rudensky, A.Y., Flavell, R.A., and Li, M.O. (2011). Autocrine Transforming Growth Factor- β 1 Promotes In Vivo Th17 Cell Differentiation. *Immunity* 34, 396–408.

Heink, S., Yogeve, N., Garbers, C., Herwerth, M., Aly, L., Gasperi, C., Husterer, V., Croxford, A.L., Möller-Hackbarth, K., Bartsch, H.S., et al. (2017). Trans-presentation of IL-6 by dendritic cells is required for the priming of pathogenic TH17 cells. *Nat Immunol* 18, 74–85.

Hirota, K., Duarte, J.H., Veldhoen, M., Hornsby, E., Li, Y., Cua, D.J., Ahlfors, H., Wilhelm, C., Tolaini, M., Menzel, U., et al. (2011). Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat Immunol* 12, 255–263.

Hori, S. (2003). Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Science* 299, 1057–1061.

Ivanov, I.I., McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J., and Littman, D.R. (2006). The Orphan Nuclear Receptor ROR γ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells. *Cell* 126, 1121–1133.

Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 485–517.

Lee, Y., Awasthi, A., Yosef, N., Quintana, F.J., Xiao, S., Peters, A., Wu, C., Kleinewietfeld, M., Kunder, S., Hafler, D.A., et al. (2012). Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nat Immunol* 13, 991–999.

Levéen, P., Carlsén, M., Makowska, A., Oddsson, S., Larsson, J., Goumans, M.-J., Cilio, C.M., and Karlsson, S. (2005). TGF- β type II receptor-deficient thymocytes develop normally but demonstrate increased CD8+ proliferation in vivo. *Blood* 106, 4234–4240.

Sanjabi, S., Oh, S.A., and Li, M.O. (2017). Regulation of the Immune Response by TGF- β : From Conception to Autoimmunity and Infection. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 9, a022236.

Stockinger, B., and Veldhoen, M. (2007). Differentiation and function of Th17 T cells. *Current Opinion in Immunology* 19, 281–286.

Tanaka, S., Jiang, Y., Martinez, G.J., Tanaka, K., Yan, X., Kurosaki, T., Kaartinen, V., Feng, X.-H., Tian, Q., Wang, X., et al. (2018). Trim33 mediates the proinflammatory function of Th17 cells. *J. Exp. Med.* jem.20170779.

Thelemann, C., Eren, R.O., Coutaz, M., Brasseit, J., Bouzourene, H., Rosa, M., Duval, A., Lavanchy, C., Mack, V., Mueller, C., et al. (2014). Interferon- γ Induces Expression of MHC Class II on Intestinal Epithelial Cells and Protects Mice from Colitis. *PLoS ONE* 9, e86844.

Veldhoen, M., Hocking, R.J., Flavell, R.A., and Stockinger, B. (2006). Signals mediated by transforming growth factor- β initiate autoimmune encephalomyelitis, but chronic inflammation is needed to sustain disease. *Nat Immunol* 7, 1151–1156.

Zhang, S., Takaku, M., Zou, L., Gu, A., Chou, W., Zhang, G., Wu, B., Kong, Q., Thomas, S.Y., Serody, J.S., et al. (2017). Reversing SKI–SMAD4-mediated suppression is essential for TH17 cell differentiation. *Nature* 551, 105–109.

Experimental procedure and methods

Mice

IL17-Cre x tgfbRII^{fl/fl} mice express the recombinase Cre under the control of the *il17* promoter and allow the specific deletion in IL-17 producing cells of the *tgfbRII* gene which is surrounded by two LoxP sequences. Thus, each cell engaged in the IL-17 differentiation pathway in *IL17-Cre x tgfbRII^{fl/fl}* mice will be unable to respond to TGFβ stimulation (KO mice). Rosa26 - STOP^{fl/fl} YFP mice have a stop codon between two loxP sequences downstream a gene coding for a Yellow Fluorescent Protein (YFP) under the control of the ubiquitous Rosa 26 promoter. In order to follow the outcome of IL-17 producing cells, IL17-Cre x TGF-βRII^{fl/fl} mice was bred with Rosa26- STOP^{fl/fl} YFP mice. Thus, IL-17 producer cells will express the YFP and will be detectable by fluorescence. Negative littermates for the IL-17 Cre gene have been used as Wild Type (WT) control. *Il-17a-CRE; Trim33^{flx/flx}; Rosa-26 stop^{FlxFlx}-yfp* (TRIM33 KO) mice, *Il-17a-CRE; smad4^{flx/flx}; Rosa-26 stop^{FlxFlx}-yfp* (SMAD4-KO) mice; as well as *Il-17a-CRE; smad4^{flx/flx};tgfb2^{xl/flx} Rosa-26 stop^{FlxFlx}-yfp* double deficient mice (DKO) were generated in the lab. Il-17a KO mice were obtained using IL17-CRE homozygote mice TGFβ1-KO mice T-Bet KO mice as well Rag2 KO were purchased from Jackson,USA All mice were maintained in a specific pathogen-free animal facility (AniCan, Centre Leon Berard Lyon). Mice were handle in the accordance with the institutional guidelines, and Comité Régional d’Ethique pour Expérimentation Animale approved the protocols. (CECAPP CLB 2017-017).

Isolation of intestinal cells

Large intestines were dissected. Fat was removed. Intestines were longitudinally opened and washed in PBS. Intestines were cut into small pieces and incubated with 5mM EDTA, 1mM DTT (Sigma Aldrich) at 37°C. Epithelial cells and IEL were separated from tissue. Tissues were then digested in RPMI medium (Gibco) containing 20% Fetal Bovine Serum (Gibco), DNase I (Roche) at 100µg/ml and Collagenase from Clostridium Histolyticum (Sigma Aldrich) at 0.6mg/ml. Epithelial cells and intestinal Lamina propria were separated on a 40% percoll gradient run for 20min at 1300 x G.

Flow cytometry

Surface staining of mouse cells was performed using the following fluorescent-conjugated antibodies : CD45 (30-F11; BD biosciences), CD90.2 (53-2.1; BD biosciences), CD11b (M1170; ebioscience), TCRα (UC7-13D5; ebioscience), CD4 BV711 (RM4-5; Biolegend). For intracellular cytokine staining, mouse cells were restimulated *ex vivo* for 4h with 500ng/ml PMA (Sigma Aldrich) and 500ng/ml ionomycin (Sigma Aldrich) in presence of brefeldin A (BD pharmingen) and for IL-22 staining 50ng/ml of recombinant mouse IL-23 (R&D systems) into the 4h culture. Cells were fixed 30minutes with 1%PFA then permeabilized cytofix cytoperm (BD) according to manufacturer's protocol and intracellular staining was performed with the following antibodies: IL-22 APC (IL22JOP; BD biosciences), IL-17 A700 (TC11-18H10;BD biosciences), IFN-γ APC (XMG1.2; BD Biosciences).For intranuclear staining cells were treated with nuclear fixation kit (ebioscience) and stained with ROR-γt PE- TexasRed (BQ31-378; Biolegend), T-BET APC (eBio4B10ebioscience). Flow cytometric analysis were performed on BD Fortessa and analysis of cells was done using FlowJo software (Miltenyi biotec).

Bone marrow transfer

Bone marrow cells were isolated and depleted into CD3⁺ T cells using the anti-CD3 beads (Miltenyi biotec – 130-094-973). 10⁶ cells from RWT and 10⁶ cells from RKO were injected intravenously into irradiated at 6 Gray RAG^{-KO} mice. Weight was checked every 2 days the 2 first weeks and then daily.

T cells transfer

T cells were recovered from the mesenteric lymph nodes. CD3⁺ T cells were selected with the Pan T cells isolation kit II (130-095-130 from Miltenyi Biotec). RAG^{-KO} mice were injected intravenously with 10⁶ cells from RWT or 10⁶ cells from RKO and checked every 2 days and the first 4 weeks and then daily.

***In vivo* treatments**

For antibiotics treatment, water was supplemented with an antibiotic cocktail composed with Ampicillin (1g/L), Metronidazole (1g/L), Neomycin (1g/L), and Vancomycin (0.5g/L) (all purchased in Sigma-Aldrich). Dextran Sulfate Sodium (DSS) (36000-50000 MW, MP Biomedical) was dissolved in drinking water at the concentration of 2% (m/v). Mice were treated for 10 days with DSS followed by a 2 days period without DSS.

EAE was induced at day 0 by injection of an emulsion of MOG peptide in Complete Freund's adjuvant (200uL per flank), and permeabilization of brain blood barrier was performed by intravenous injection of 200uL of Pertussis toxin at day 0 and day 2.

Histology

Tissue sections (5µm) were prepared with 4% paraformaldehyde fixed, paraffin embedded tissues and stained with hematoxylin–eosin (H&E) with standard protocol. for histological

analysis brains and spinal cords were frozen in OCT. Slide of 6 to 8um were made. For the coloration slides were fix for 1àminutes in 4% PFA, 5minutes in 95% alcohol. Myelin was stained for 16 to 24hours at 58°C in 0,1% of Luxol Fast Blue (Sigma Aldrich) with 10% of 95% alcohol and 10% of acetic acid. To differentiate white matter from grey matter and observe demyelination the slides were successively incubated in 0,05% of lithium carbonate and then 70% ethanol of 30 secondes. Finally, slides were incubated 5minutes in Cresyl Purple (supplied from anapathology team of Centre Léon Bérard). Slides were observed on Leica microscope.

Statistical Analysis

Unpaired Student's t test was used to calculated statistical significance. P value <0,05 were considered significant. * was for P<0,05; ** for P<0,01 and *** for P<0,001. Statistics were performed using Prism Software.

Figure legends

Figure 1 : Chronic gut inflammation in the absence of TGF- β signaling in IL-17 producing cells **A)** Representative photographs of the duodenums of 1 year old TGF β R-CA mice, TGF β R-WT mice and TGF β R-KO mice. **B)** H&E histological analysis coloration of the junction between the duodenum and the stomach of 10 month old TGF β R-CA mice, TGF β R-WT mice and TGF β R-KO mice. 3X magnification is illustrated revealing infiltration (I) and dysplasia (D), fibrosis (F) and hemolytic lesions (H) in TGF β R-KO mice. **C)** H&E histological analysis of the colon of 1 year old TGF β R-CA mice, TGF β R-WT mice and TGF β R-KO mice. Arrows indicated the abscesses. **D)** T cells (CD3⁺ TCR $\gamma\delta$ ^{neg} NK1.1^{neg}) purified from the MLN of either TGF β R-WT mice or TGF β R-KO aged of 5-6 month of age were transferred in RAG deficient mice. 70 days later the duodenum was harvested. **E)** Representative photographs of the duodenums and **F)** H&E histological analysis are illustrated. Arrows indicated the abscesses. These data are representative of at least 5 mice per groups and 2-4 experiments. No different were observed between gender.

Figure 2 : Over representation of CD4 T cells committed to Th17 lineage in the absence of TGF- β control

TGF- β R-KO mice, TGF- β R-WT mice and TGF- β R-CA mice were crossed with *Rosa-26 stopFlxFlx-yfp* mice. **A)** Representative counter plot of YFP expression in the CD45^{pos} populations of 6 month old mice. **B)** Graph illustrates the proportion of YFP⁺ cells among CD45⁺ in the different compartments of the gut at different ages. **C)** Representative counter plots illustrating the percentage of YFP^{pos} among CD4⁺ T cells of 3-4 months old TGF- β R-KO mice, TGF- β R-WT mice and TGF- β R-CA mice. **D)** Representative counter plots illustrating

the repartition of YFP⁺ cells in TCR $\gamma\delta$ and TCR $\alpha\beta$ T cells. **F)** Graph-pies demonstrate the repartition of YFP⁺ cells among the different IL-17 producing cells. data are representative 5-7 animals per groups and of 3 independent experiments.

Figure 3 Non-canonical branch of TGF- β signaling controls differentiated the Th17 cell homeostasis

A) Representative photograph of the duodenum of DKO mice and WT mice at 1 year of age. The table illustrates the number of mice with gut inflammatory signs based on macroscopy observation as well as histology analysis at 1 year of age. **B)** Representative counter plot of the YFP⁺ cells among the CD45⁺ cells in MLN **C)** Graphs demonstrates the proportion of YFP⁺ cells among CD45⁺ cells (mean \pm SD) in different gut compartments. All the animals were 10-12 month of age and no differences were observed between genders. Data are representative of 4-11 animals.

Figure 4 Th17 cells escaping TGF- β controls become Th1 pathogenic cells

A) Representative counter blots flow cytometry analysis of the cytokine production by YFP⁺ CD4⁺ T cells. **B)** Graphs illustrate the percentage of YFP⁺ CD4 T cells expressing cytokines in different compartment (Mean \pm SD). **C)** Representative counter blots flow cytometry analysis of the transcription factor ROR γ t and T-bet expression in YFP⁺ CD4⁺ T cells. **D)** Graphs illustrate the percentage of YFP⁺ CD4 T cells expressing the transcriptional factors in different compartment (Mean \pm SD). **E)** Representative counter blots flow cytometry and graph of analysis of CCR6 and CXCR3 expression in YFP⁺ CD4⁺ T cells. **F)** TGF- β R-KO mice were crossed on a T-bet-KO background. Photos of the duodenum are illustrated.

Figure 5 : Different effects of the microbiota on the generation and the maintenance of Th17 cells

A) Photographs of the duodenum of Rag deficient mice trasfered with TCR α,β T cells from TGF- β R-KO mice or TGF- β R-WT mice. Recipient were reated or not with a cocktail of antibiotic (ATB) (neomycin, ampicillin, vancomycin and metronidazole) in drinking water. **B)** representative Counter plot of the expression of YFP⁺ cells in CD4⁺ T cells after 3 months of ATB treatment. **C)** Graphs illustrate the effect of antibiotic treatment on YFP⁺ cells homeostasis. **D-E)** Representative counter plots and graphic representation of the expression of Ror- γ t and T-bet in the YFP⁺ CD4 T cells from the small intestine after 3 months of treatment. These data are representative 2 experiments with 3 animals per groups

Figure 6 : Non autocrine source of TGF- β controls differentiated Th17 cell homeostasis

A) Counter plots illustrate the proportion of YFP⁺ cells among the CD4 T cells. **B)** Graphs demonstrate the percentage of YFP⁺ cells (mean \pm SD) **C)** Counter plots illustrate the expression of transcription factors expression ROR γ t and T-bet in YFP⁺ CD4 T cells. **D)** Graphs demonstrate the percentage of YFP⁺ cells expressing the transcriptional factors (mean \pm SD).

Supplementary figure legends

Suppl figure 1. The immune infiltrate of TGF- β R-KO mice is enriched in myeloid cells.

A) Counter plots illustrating the proportion of dendritic cells, macrophages and neutrophils in the small intestine of TGF- β R-CA, TGF- β R-WT and TGF- β R-KO of 6 to 9 months old. Data are representative of 5 to 7 mice per group and 4 independent experiments.

Suppl figure 2 : IFN- γ and IL-22 are not produced by the same subset of Th17 cells

A) Counter plot illustrating the production IL-22 and IFN- γ by CD4⁺ YFP⁺ cells in TGF- β R-WT and TGF- β R-KO mice of 3 to six months old. data are representative of 4 different experiments.

Suppl Figure 3: TGF- β signaling acts intrinsically in differentiated Th17 cells

A-F) BM (50:50) transfers were performed as in A. Recipient mice were analyzed 7-8 weeks later. B) Flow cytometry counter plot illustrating the proportion of YFP⁺ cells among CD4⁺T cells. C) Graphs demonstrate the percentage of YFP⁺ cells in different compartment depending of the BM origin. D) Representative counter plot of transcriptional factors in YFP CD4 T cells depending of their BM origin. E) Graphs demonstrate expression of Ror- γ t and T-bet in YFP⁺ CD4 T cells in different compartment depending of the BM origin. F) Representative counter plot of IL-17A and IFN- γ expression in YFP^{pos} CD4^{pos} T cells depending of their BM origin. G) Graphs demonstrate expression of IL-17A and IFN- γ in YFP⁺ CD4 T cells in different compartment depending of the BM origin. Data are presentative of 2 experiments with 6 mice.

Suppl Figure 4: IL-17A is not required for the development of intestinal chronic inflammation in TGF- β R-KO mice

A) H&E Histology analysis of the duodenum of IL-17A KO, TGF- β R-WT, or IL-17KO TGF- β R-KO aged of 12 months. **B)** Flow cytometry counter plots on CD4⁺ T cells from IL-17A-KO TGF- β R-CA, IL-17A-KO TGF- β R-WT, or IL-17A KO TGF- β R-KO aged of 12 months **C)** Graphs illustrate the percentage of YFP⁺ CD4 T⁺ cells in different gut compartments. **D)** Flow cytometry counter plots illustrating the IFN- γ production by YFP⁺CD4⁺ T cells from 12 months old mice. **E)** Graphs illustrated the percentage of IFN- γ ⁺ among YFP⁺ CD4 T cells in different gut compartments. **F)** Flow cytometry counter plots illustrating the expression of transcription factors in YFP⁺ CD4 T cells from 12 month old mice. **G)** Graphs illustrate the percentage of Ror- γ t⁺ or T-bet⁺ cells among YFP⁺ CD4 T cells in different compartments. Data are representative of 5-10 mice

Suppl figure 5: TGF- β signaling in Th17cells prevents from EAE

A) At day 0 TGF- β R-CA, TGF- β R-WT and TGF- β R-KO mice were immunized with one injection per flank of 250ug of MOG₃₅₋₅₅ peptide from Calso in complete Freud adjuvant containing *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (4mg/mL; Difco). At day 0 and 2 mice were also injected with 200ng of pertussis toxin from calbiochem. Mice were check daily form disease evaluation. (0: no change in motor functions; 0,5: tip of tail is limp; 1: limp tail; 1,5: limp tail and hind leg inhibition; 2: limp tail and weakness of hind legs; 2,5: limp tail and dragging of hind legs or complete paralysis of one hind leg; 3: limp tail and completed paralysis of both hinds legs or limp tail with paralysis of one hind and one front leg; 3,5: limp tail and complete paralysis associated with inability to right itself when placed onits side; 4: limp tail, completed hind leg and partial front leg paralysis. When the disease score reaches 4 the mcie is

immediately euthanized. **B)** Histological analysis of the spinal cord of healthy mice versus TGF- β R-WT and TGF- β R-KO at 20 days after immunization with MOG peptide. Data are representative of 9 to 12 mice per groups and 3 different experiments.

Figure 1

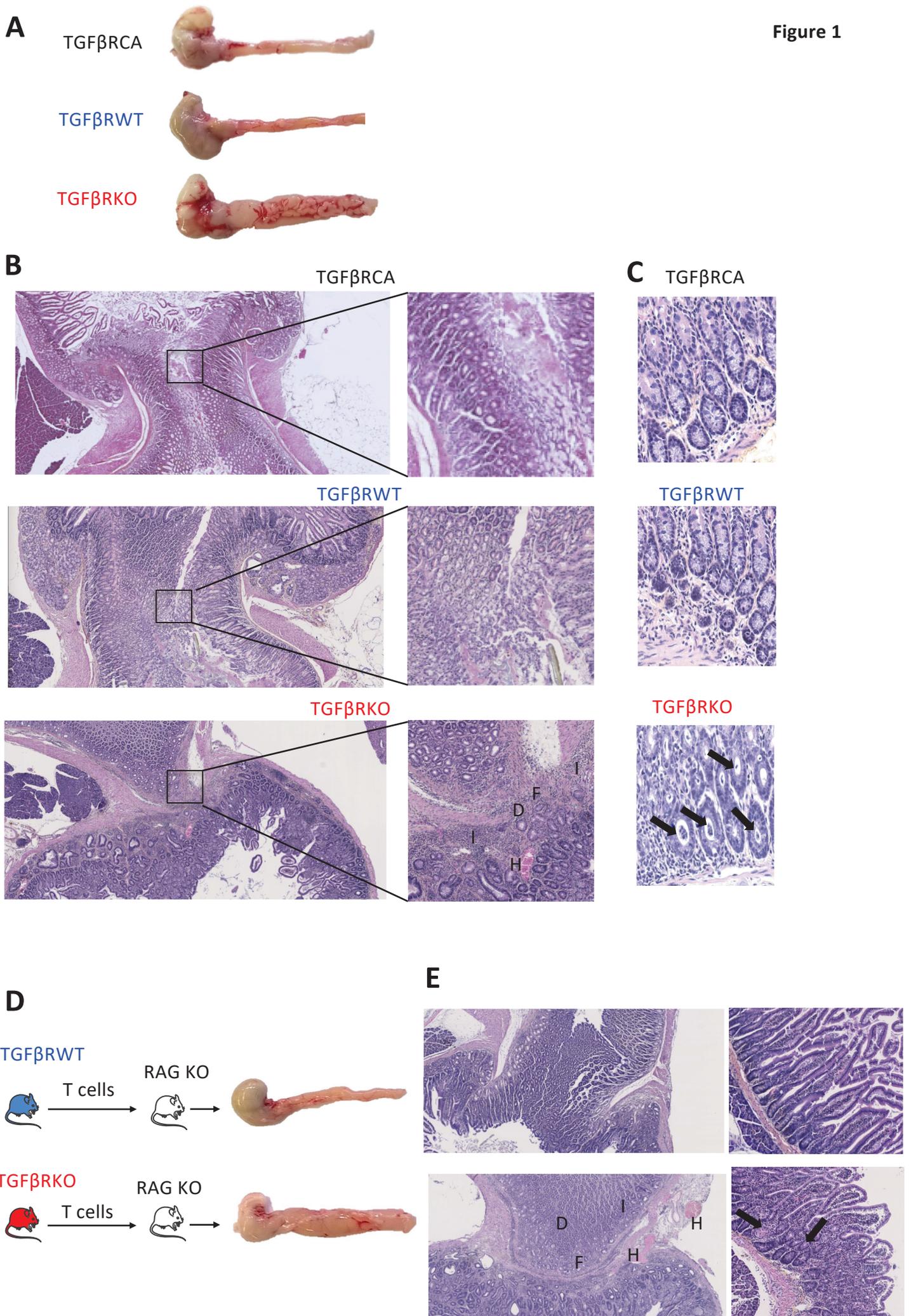


Figure 2

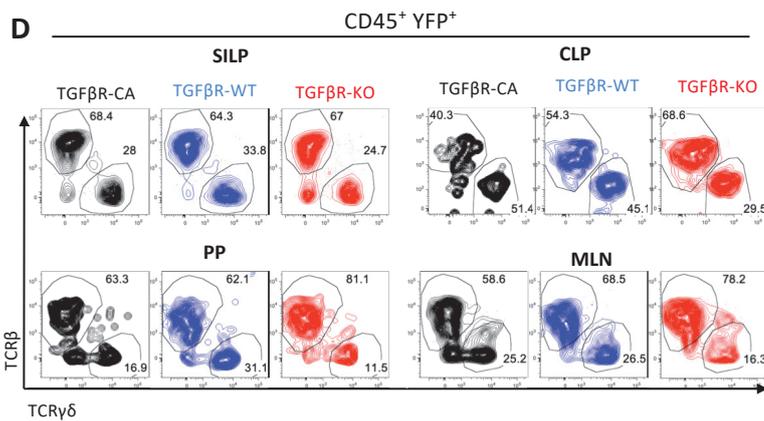
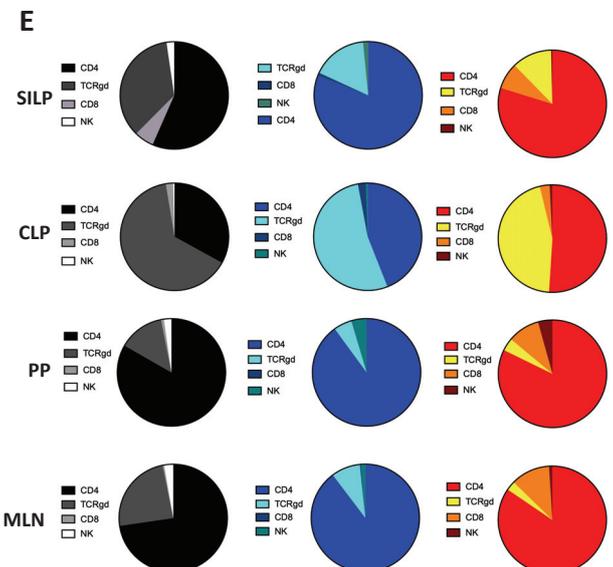
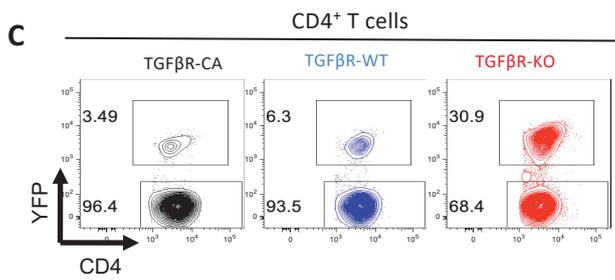
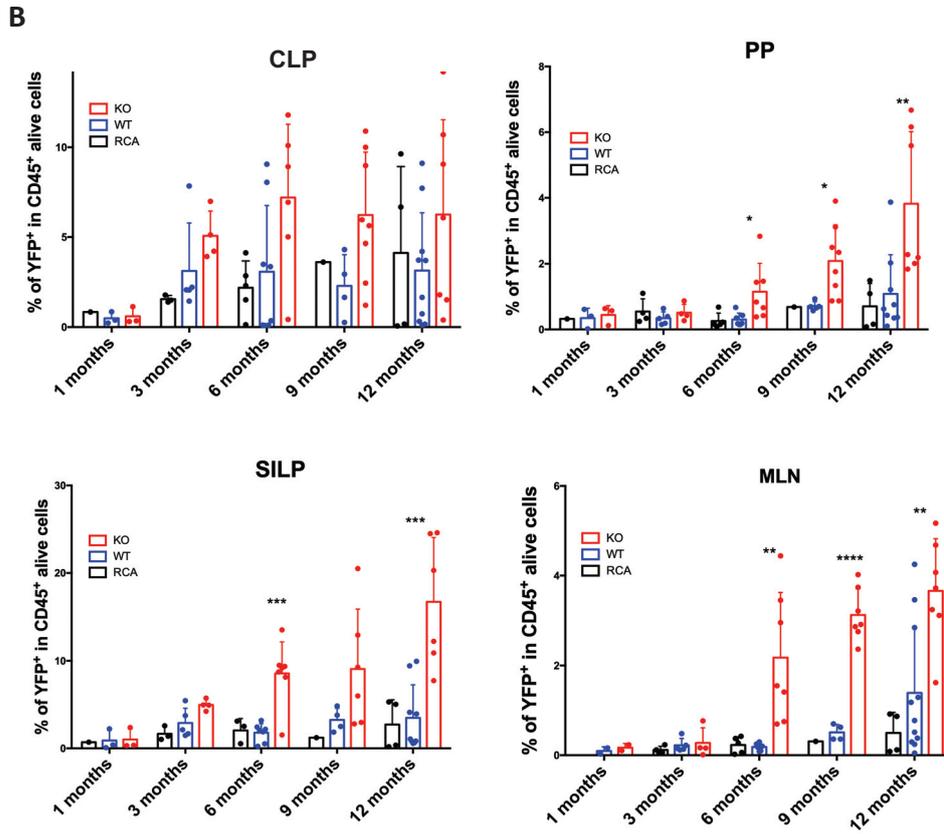
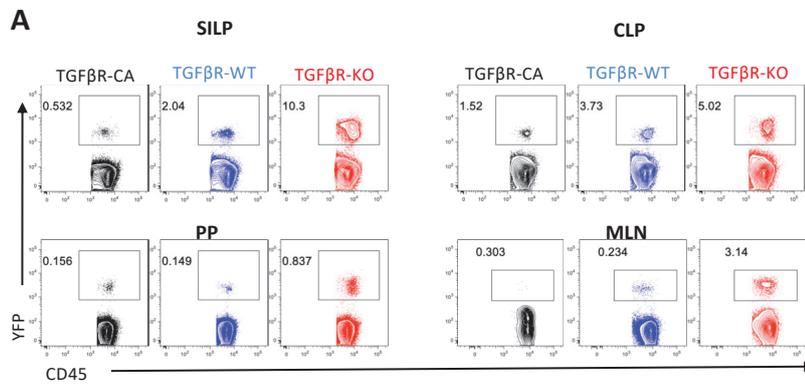


Figure 3

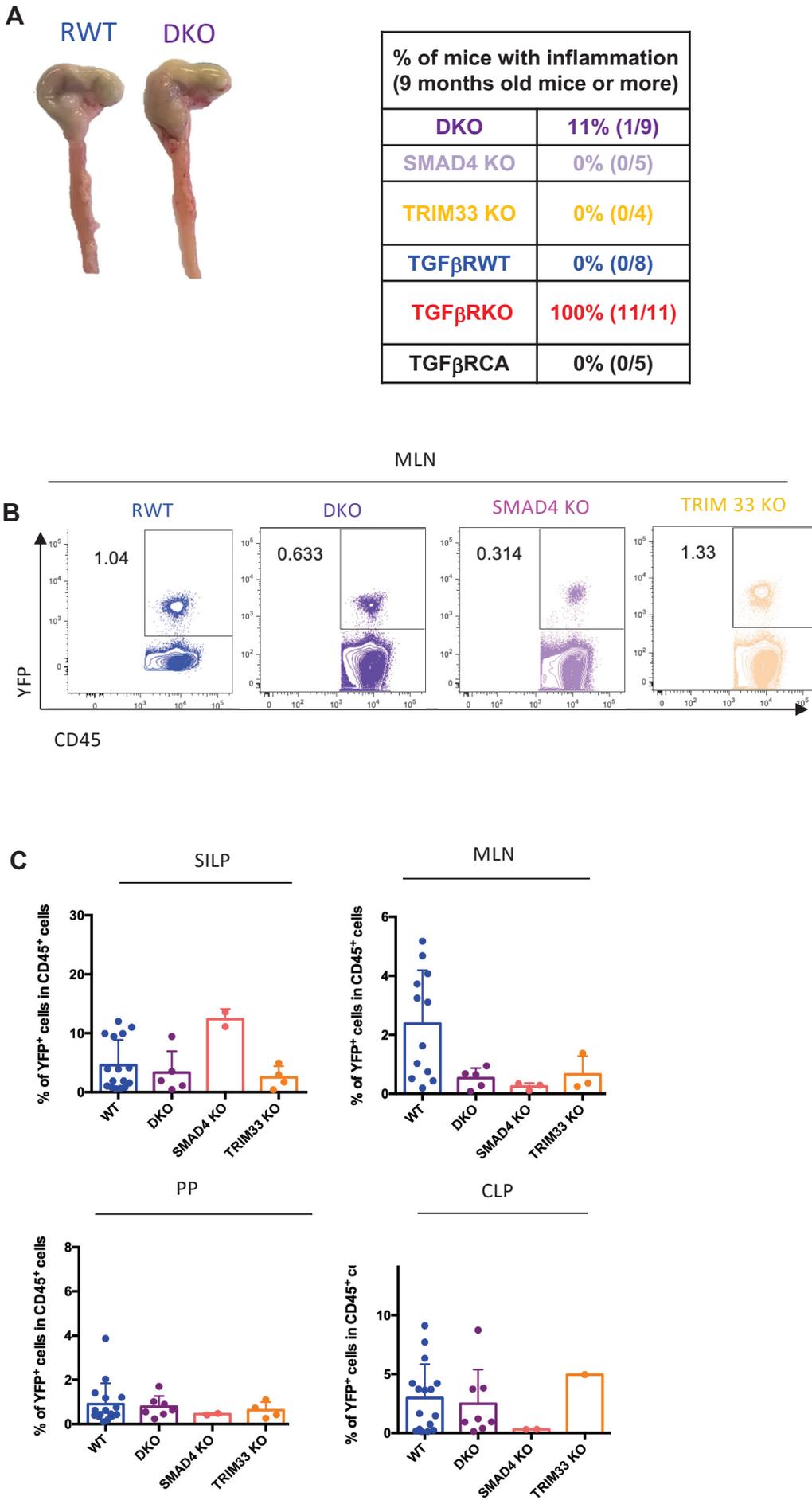


Figure 4

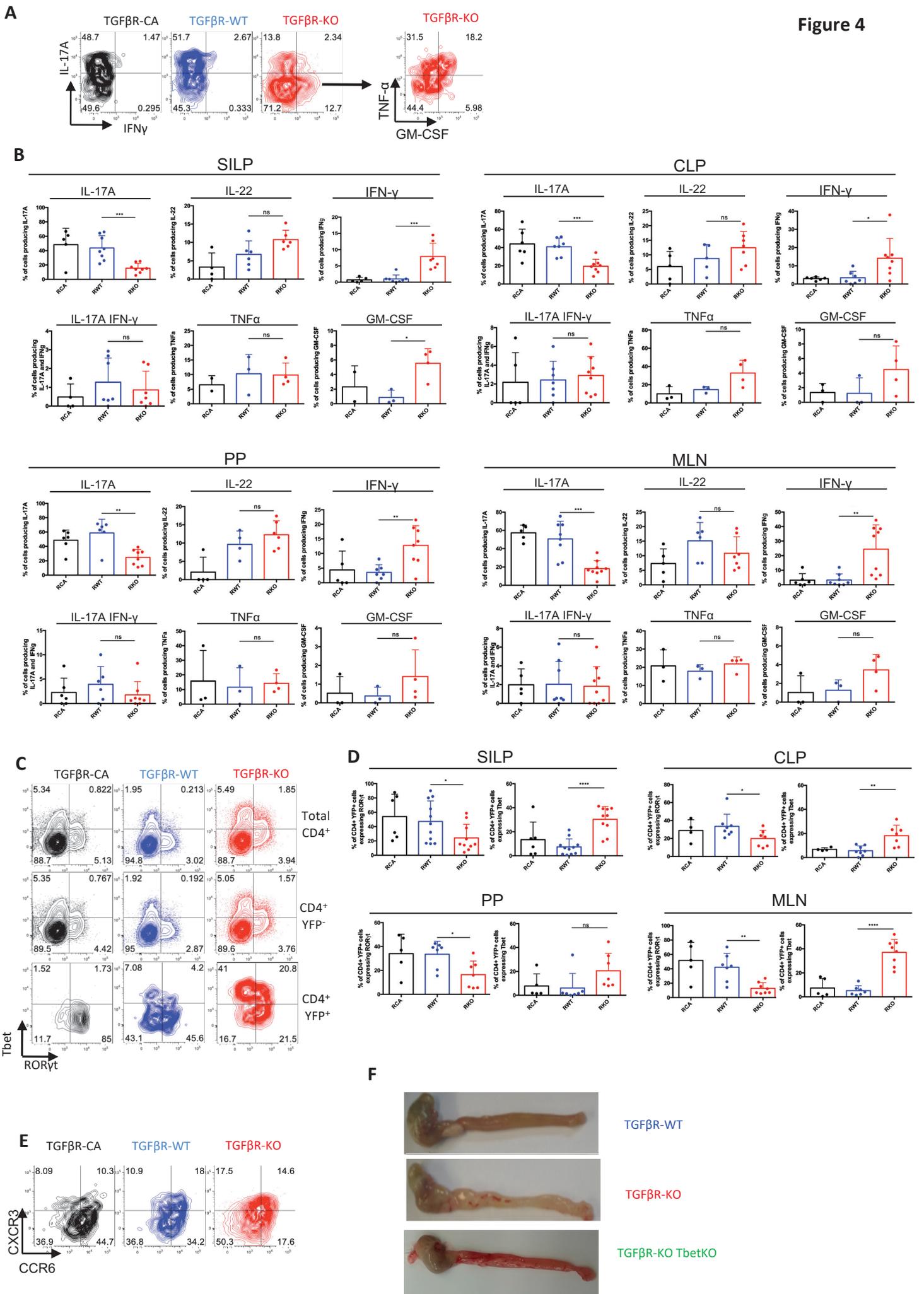


Figure 5

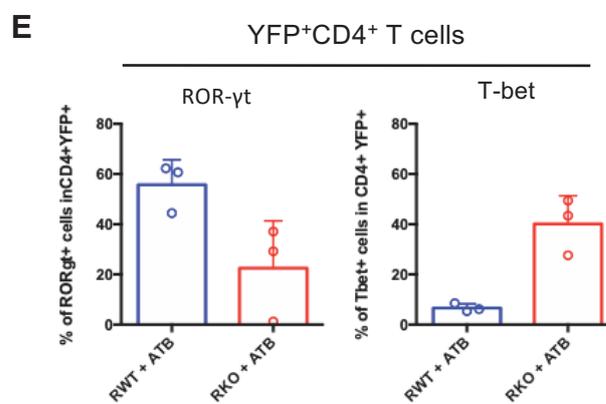
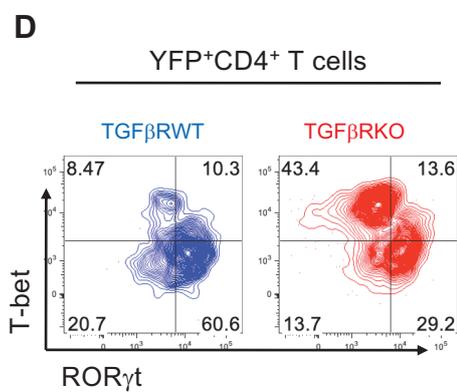
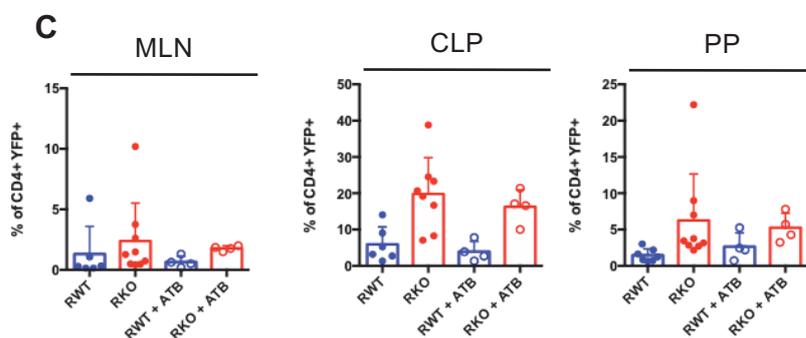
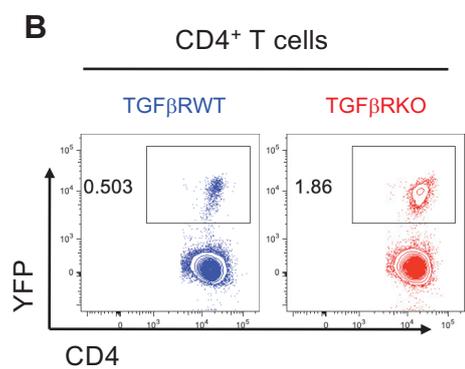
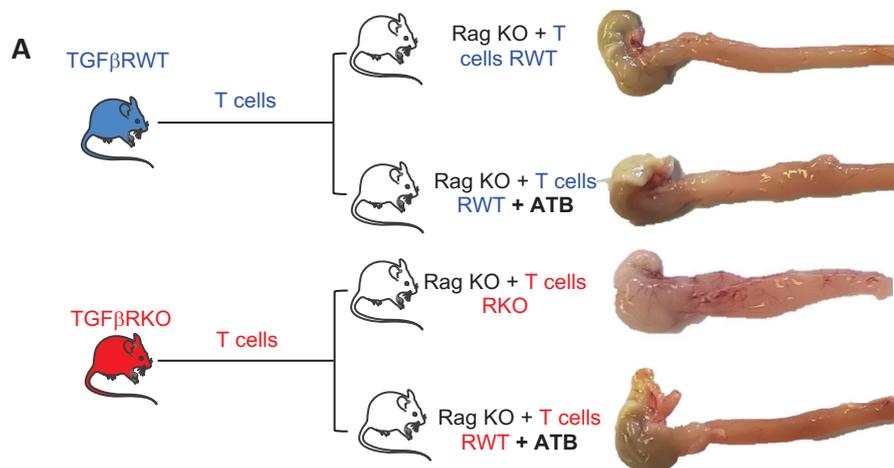
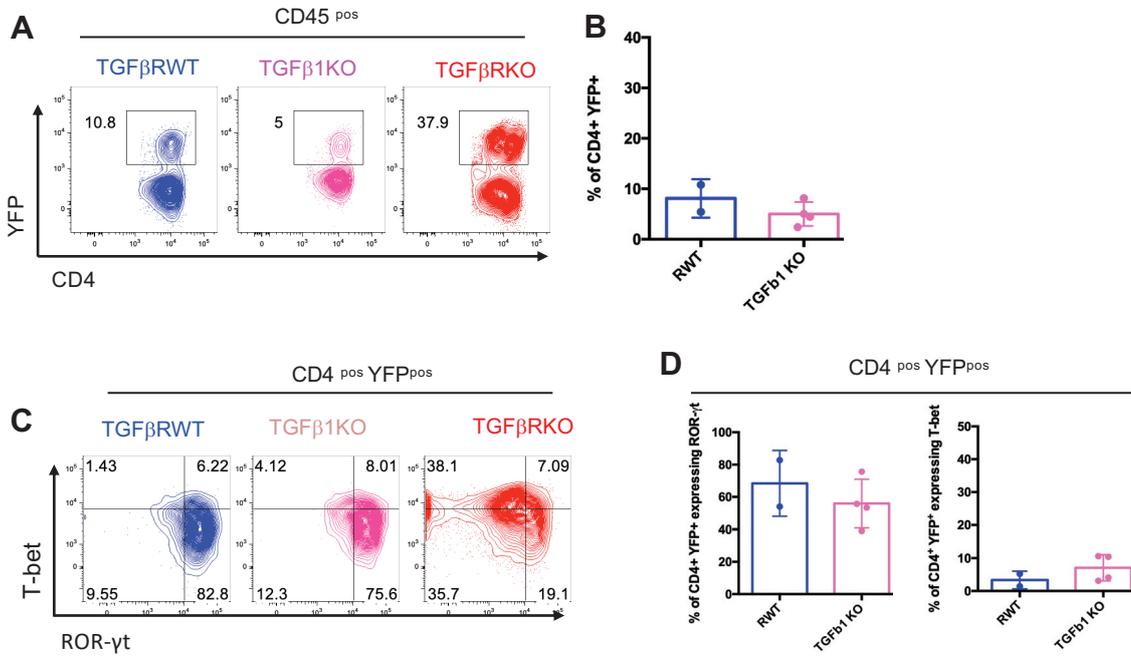
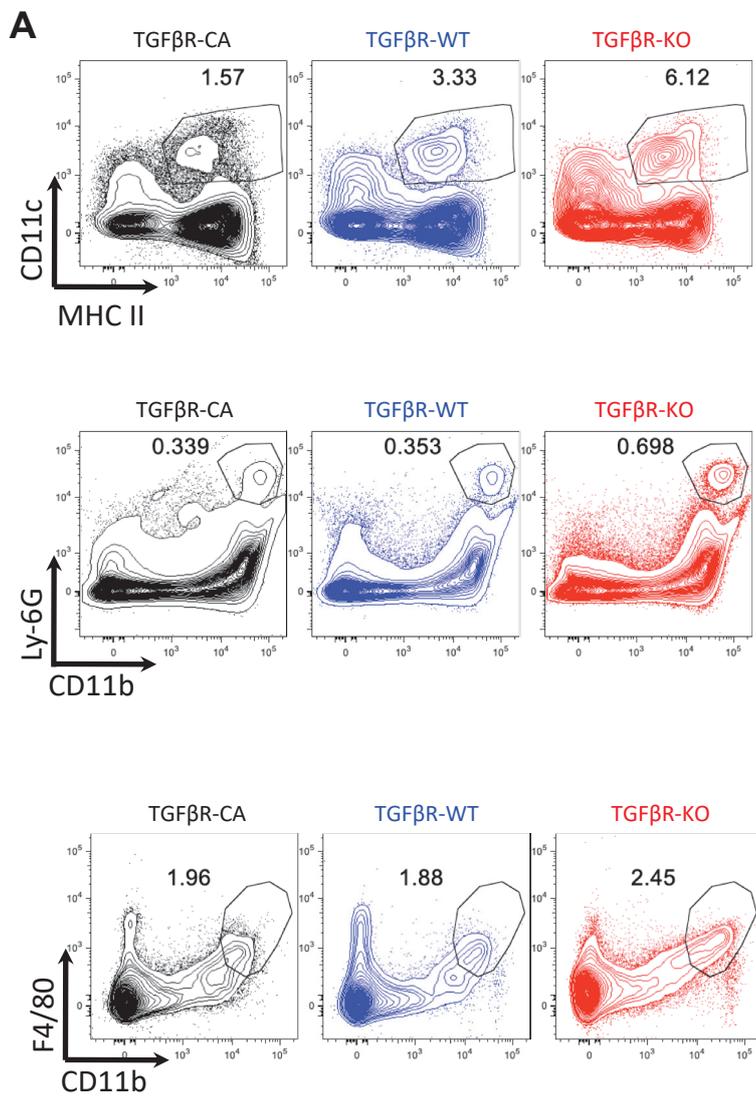
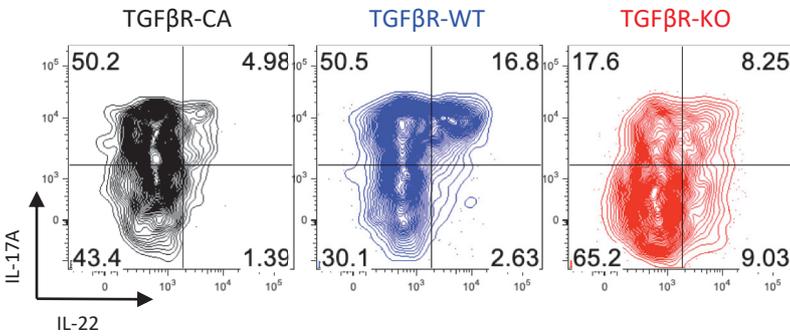


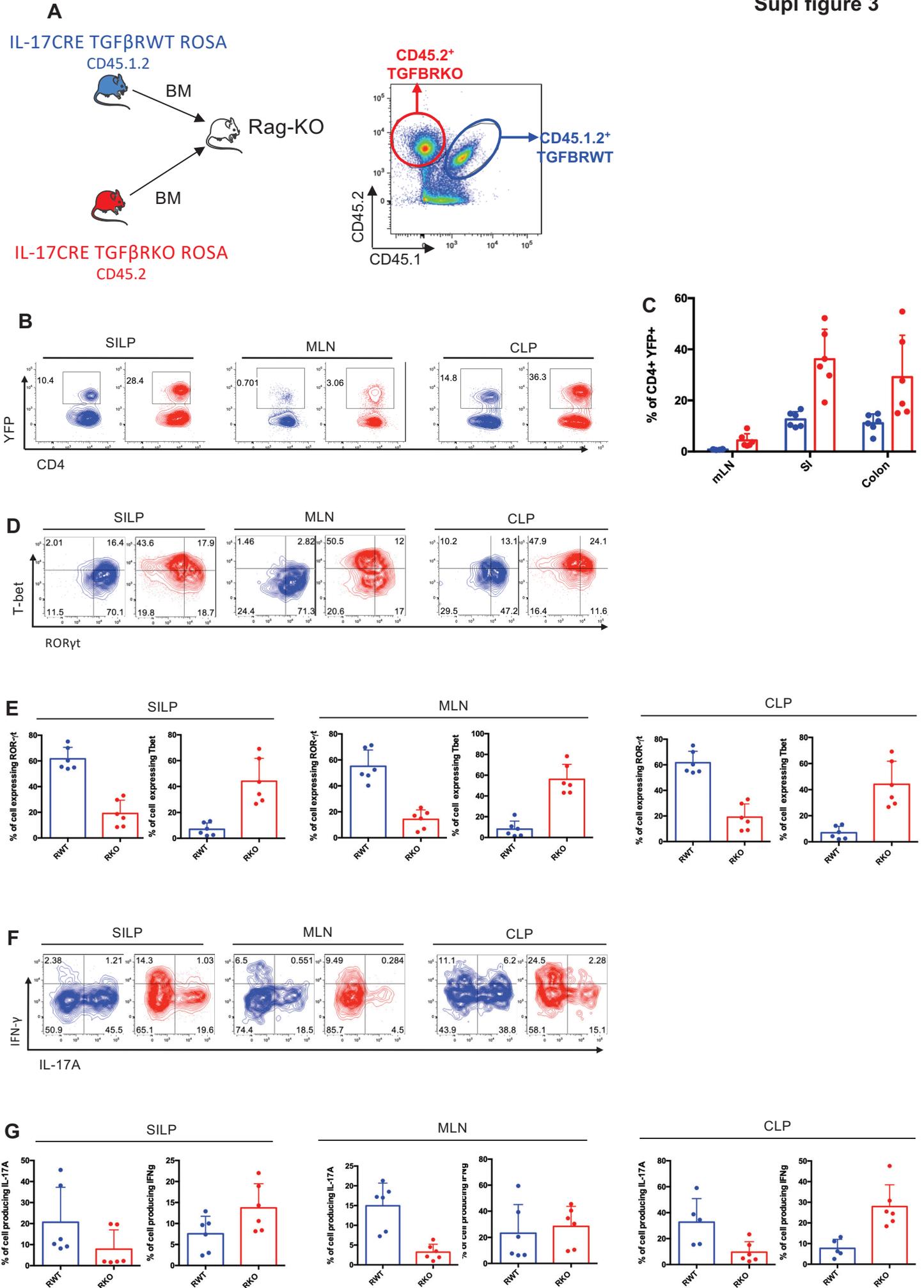
Figure 6

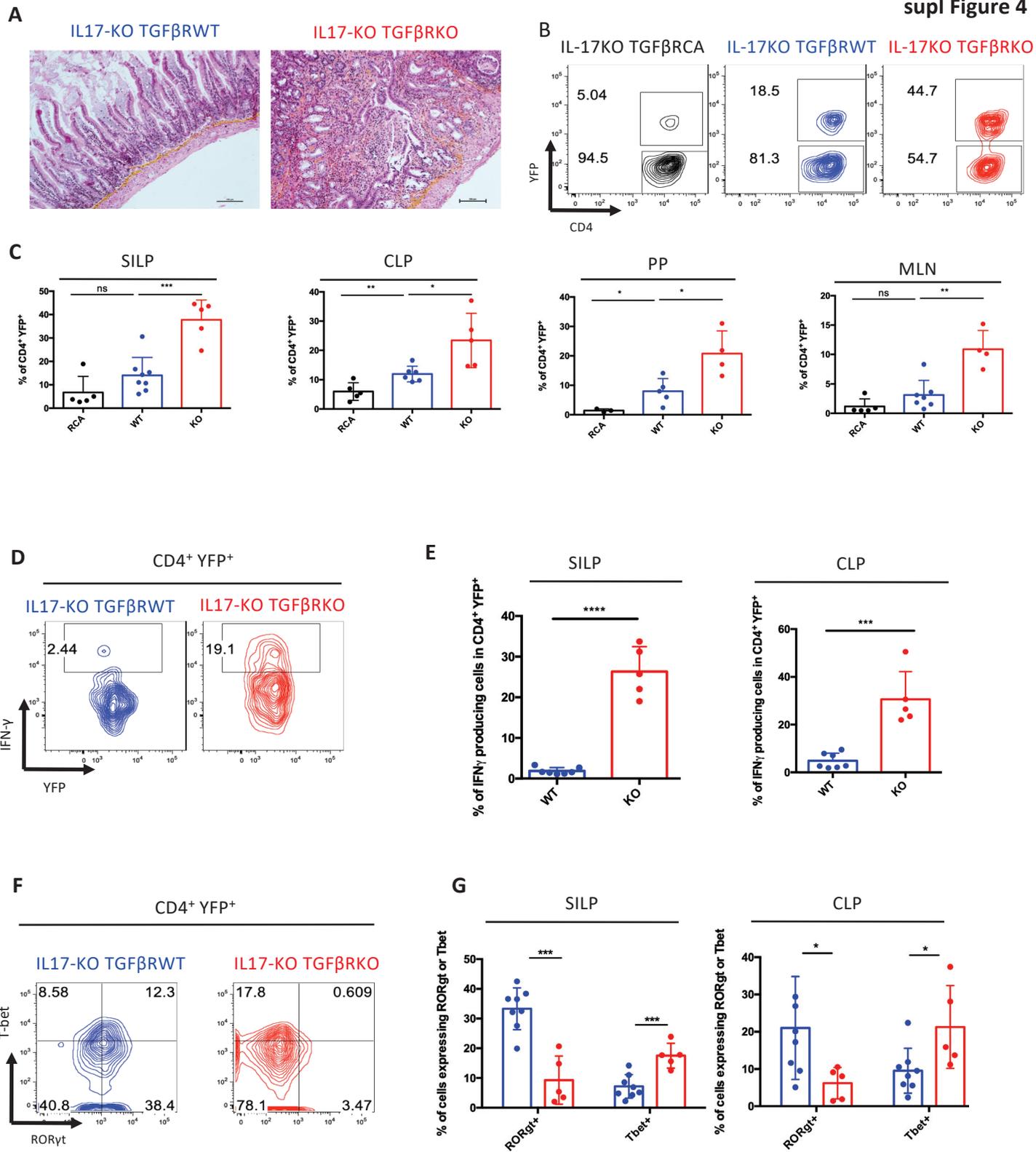




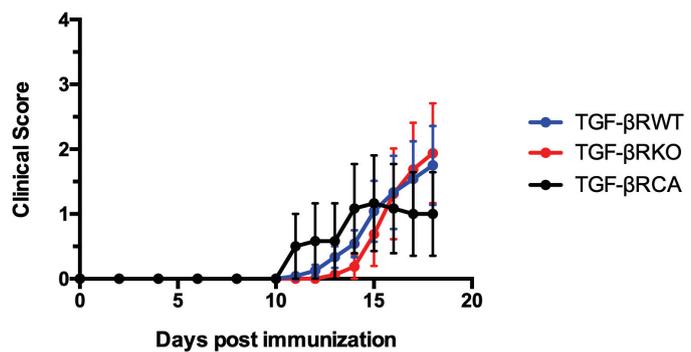
MLN CD4⁺ YFP⁺



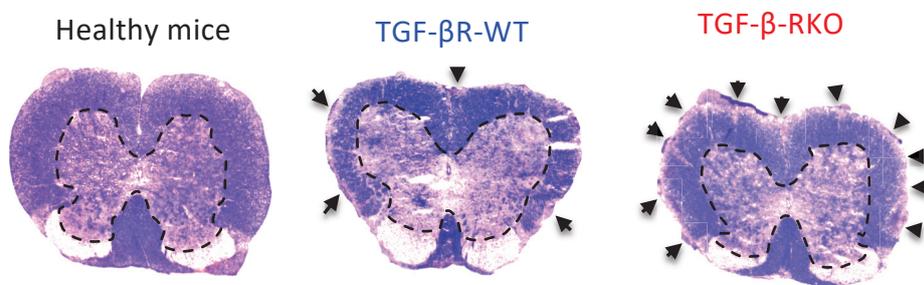




A



B



DISCUSSION

I. Rôle du TGF- β dans la différenciation des Th17

Les lymphocytes Th17 ont un rôle majeur dans l'intestin. Ils contribuent au maintien de l'intégrité de l'épithélium et au contrôle de la charge microbienne dans la lumière intestinale (Chewning and Weaver, 2014). L'intestin est très riche en TGF- β et en IL-6, qui ont été décrites comme nécessaires à la différenciation de Th17 *in vitro*. *In vivo* des souris dont la signalisation du TGF- β est partiellement bloquée par une mutation du TGF- β RII (souris CD4dnTGF- β RII ou dnRII) (Veldhoen et al., 2006), ou totalement TGF- β RII (Zhang et al., 2017) ne développent pas de Th17. Cependant d'autres études décrivent qu'*in vitro*, la génération de Th17 malgré une absence de TGF- β est possible en présence d'un cocktail d'IL-6 d'IL-1 β et d'IL-23 (Ghoreschi et al., 2010; Lee et al., 2012). Ainsi, il est important de déterminer pourquoi ces résultats sont contradictoires.

Les résultats de l'article 1 auquel j'ai contribué montrent qu'*in vitro* le stress cellulaire est favorable à la différenciation de Th0 en Th17, et ce même en présence d'IL-6 seule. L'étude révèle également que la génération de Th17 dans des souris dnRII est possible en condition de stress cellulaire important. Ainsi ces résultats montrent qu'en cas de stress cellulaire, autant *in vivo* qu'*in vitro*, la présence de TGF- β n'est pas obligatoire pour générer des Th17. (**Figure 22**).

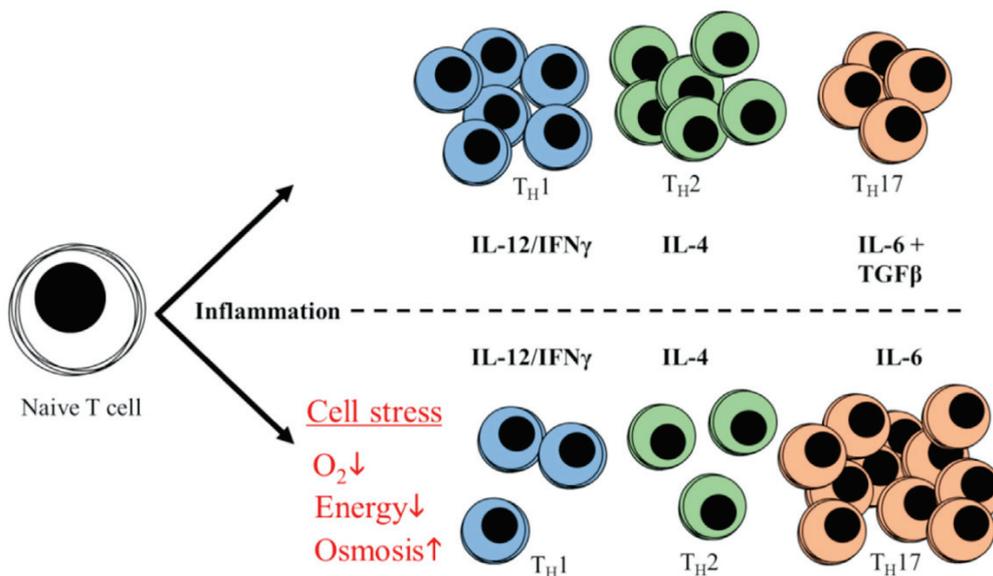


Figure 22 : Schéma bilan des travaux issus de l'article 1 (Brucklacher-Waldert et al., 2017).

Des conditions de stress cellulaire comme l'hypoxie, l'hypoglycémie ou une hyperosmolarité favorisent *in vitro* et permettent *in vivo* la différenciation de Th17 une absence de TGF- β .

Il est à noter que dans les souris dnRII la signalisation du TGF- β n'est pas totalement abolie. Ainsi la question de savoir si le TGF- β , via ces voies résiduelles, est requis pour la différenciation de Th17 reste en suspens. Pour montrer de façon claire l'importance du signal du TGF- β dans la différenciation des Th17 il serait nécessaire d'utiliser des modèles dans lesquels les lymphocytes T CD4 ne répondent plus du tout à cette cytokine. Il est connu que des souris dont l'ensemble des CD4 est incapable de répondre au TGF- β (souris CD4^{CRE} TGF-RII^{flx/flx}) meurent d'auto-immunité à 3 semaines (Marie et al., 2006). Pour enlever le biais dû à l'inflammation liée à l'auto-immunité de ces souris nous pourrions utiliser un modèle de délétion inducible comme les souris CD4^{CRE-ERT2} TGF- β RII^{flx/flx}, dans lequel la délétion ne se fait qu'au moment de l'injection de tamoxifène. Ainsi, nous pourrions déterminer après ablation du TGF- β RII sur les CD4 si ces souris peuvent ou non générer des Th17 en condition de stress.

Le facteur de transcription X box binding protein-1 (XBP1) est impliqué dans les réponses contre le stress cellulaire. Sa délétion au sein de l'ensemble des lymphocytes (souris RAG^{CRE} XBP^{flx/flx}) réduit la différenciation des Th17. Cependant le mécanisme par lequel XBP agit n'est pas clair et son absence n'abolit pas complètement la génération des Th17. Ce résultat indique clairement que d'autres mécanismes sont mis en jeu pour induire la différenciation des Th17 en condition de stress. HIF1- α est également impliqué dans les réponses contre le stress et dans la différenciation Th17. Il pourrait être intéressant d'étudier si et par quels mécanismes HIF1- α ou d'autres molécules impliquées dans le stress pourrai(en)t intervenir afin de compenser une absence de TGF- β au moment de la différenciation de Th0 en Th17.

II. Rôle du TGF- β dans la stabilité des Th17

De nombreuses études se sont intéressés au rôle du TGF- β au moment de la différenciation des Th17. Cependant, l'implication de cette cytokine dans la biologie des Th17 déjà différenciés reste peu connue. Le modèle de souris IL-17^{CRE} Rosa26 TGF- β RII^{flx/flx} utilisé dans l'article 2 permet d'apporter plusieurs réponses à ce sujet.

Les démontrent clairement l'importance des voies de signalisation non canonique du TGF- β au sein des Th17 déjà différenciés afin d'y maintenir l'expression de ROR- γ t et donc de

leur phénotype. Nous avons montré que la perte de ROR- γ t s'accompagne de la perte de la production d'IL-17A mais de l'acquisition de T-bet, le facteur de transcription du lineage Th1. Ces exTh17 sont hautement activés et produisent d'importantes quantités de cytokines inflammatoires comme l'IFN- γ et le GM-CSF faisant d'eux des « Th1exTh17 » qui participent à la mise en place d'une inflammation chronique intestinale (**Figure 23**).

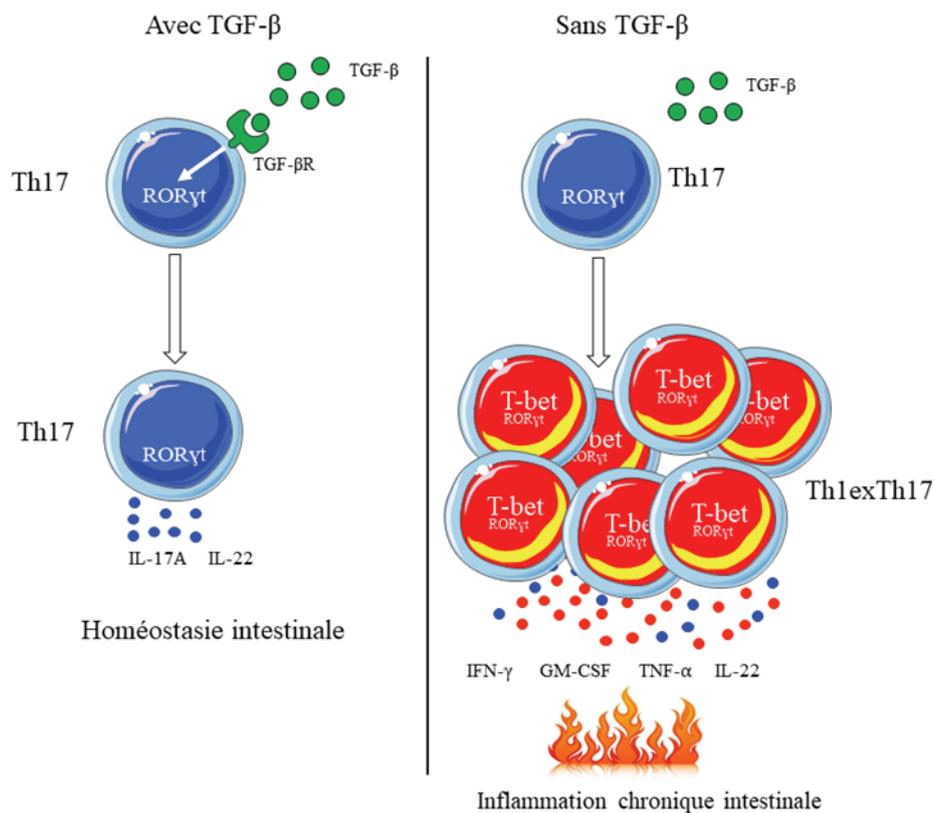


Figure 23 : Schéma bilan des travaux issus de l'article 2.

Le TGF- β , via les voies non canoniques, permet de maintenir l'expression de ROR- γ t et du lineage Th17. En l'absence de signalisation du TGF- β les Th17 perdent l'expression de ROR- γ t et leur capacité à produire de l'IL-17. Ils expriment alors le facteur de transcription caractéristique des Th1 et produisent de grandes quantités d'IFN- γ , de TNF- α et de GM-CSF, qui conduit au développement d'une inflammation chronique intestinale.

1. L'importance des voies de signalisation non canonique du TGF- β dans le maintien du phénotype Th17

Lors du co-transfert de cellules souches hématopoïétiques provenant de souris TGF- β RWT et de souris TGF- β RKO dans des souris RAG^{KO} nous observons que seules les cellules TGF- β RKO perdent leur phénotype Th17, indiquant un rôle intrinsèque des voies de signalisation du TGF- β dans le maintien de leur identité.

Le croisement des souris IL-17^{CRE} Rosa 26 avec des animaux TRIM33^{flx/flx}, SMAD4^{flx/flx} ou TRIM33^{flx/flx} SMAD4^{flx/flx} nous a permis d'étudier par quelle voie de signalisation le TGF- β maintient l'expression de ROR- γ t, donc le phénotype Th17. De façon surprenante le maintien de ROR- γ t est indépendant des protéines SMAD4 et TRIM33 mais implique les voies non-canoniques du TGF- β . Récemment, le rôle de TRIM33 a été mis en évidence dans l'acquisition d'un phénotype inflammatoire des Th17 via sa capacité à induire la production d'IL-17 et à réprimer la production d'IL-10 (Tanaka et al., 2018b). Des souris déficientes pour les protéines SMAD4 sont décrites comme ayant plus de Th17 que de souris sauvage (Zhang et al., 2017). Cependant ces résultats ne sont pas en contradiction avec les nôtres car les auteurs ont utilisé des souris CD4^{CRE} TRIM33^{flx/flx} et CD4^{CRE} SMAD4^{flx/flx}. Dans ces 2 modèles la délétion des protéines se fait avant que les cellules ne soient engagées dans le programme de différenciation Th17. L'ensemble de ces données suggère que les voies de signalisations impliquées dans la différenciation des Th17 et la maintenance de leur phénotype ne sont pas les mêmes.

Les protéines impliquées dans les voies de signalisation non-canoniques du TGF- β sont nombreuses (AKT/PI3K, ERK, MAPK, RhoA) et interviennent dans de nombreux processus biologiques. Bien qu'il soit possible d'utiliser le système CRE-LoxP pour générer des animaux dans lesquels les cellules productrices d'IL-17A soient déficientes pour une ou plusieurs de ces protéines, il serait plus simple dans un premier temps de réaliser des études *in vitro* de Th17 cultivées en présence d'inhibiteurs de ces voies de signalisation. La voie PI3K/AKT a été décrite comme impliquée dans la génération de Th17 et pourrait être un premier candidat à étudier (Hasan et al., 2015).

2. Les molécules signatures des Th17 contrôlées par le TGF- β

ROR- γ t et ROR- α sont les facteurs de transcriptions caractéristiques des Th17, et ils participent directement à la production d'IL-17A. Il a été montré que seules les souris déficientes à la fois pour ROR- γ t et ROR- α sont totalement incapables de produire de l'IL-17A. Nous montrons que le TGF- β contrôle la stabilité de ROR- γ t, mais notre étude n'inclut pas ROR- α . Il pourrait être intéressant de savoir si les Th1^{ex}Th17 expriment toujours ROR- α , et si c'est l'expression de ROR- α qui leur permet de continuer à produire un peu d'IL-17A. De

même, nous n'avons pas exploré les effets de la perte de la signalisation du TGF- β RII sur la production d'IL-17F mais il pourrait être intéressant de le faire. De plus une analyse transcriptomique globale nous permettrait de décrire l'étendue des gènes contrôlés par la signalisation du TGF- β dans les Th17.

3. Source de TGF- β participant à la stabilité des Th17

Il a été montré que l'expression du TGF- β 1 est primordiale dans la génération des cellules Th17 *in vivo*, en utilisant des modèles de déplétion précoces du gène *TGf β 1* avant la différenciation en Th17. Ainsi il a été important de démontrer si ce besoin autocrine persiste une fois les cellules différenciées. A l'aide d'un modèle IL17^{CRE} Rosa26 TGF- β 1^{flx/flx} nous avons mis en évidence qu'une incapacité des Th17 à produire du TGF- β 1 n'impactait pas leur stabilité dans l'intestin en condition non inflammatoire. Ainsi, la production autocrine de TGF- β 1 par les Th17 est requise leur différenciation mais pas pour leur maintenance. Cependant notre étude n'a pas été conduite en condition inflammatoire, il serait intéressant de voir si cela pourrait changer nos résultats. L'utilisation d'un modèle de DSS, qui induit une inflammation aigue pourrait permettre de répondre à la question.

Dans l'intestin, les Th17 ne sont pas la source principale de TGF- β , et il est possible que leur incapacité à en produire n'ait pas d'impact sur la disponibilité de cette cytokine. Les Tregs et les cellules épithéliales produisent beaucoup de TGF- β , qui pourrait permettre la stabilité du lineage Th17. L'utilisation de souris Villine^{CRE-ERT2} TGF- β 1^{flx/flx} afin de cibler les cellules épithéliales, ou bien de FoxP3^{CRE} TGF- β 1^{flx/flx} afin de cibler les Tregs devrait nous permettre de répondre à cette question.

Les Th17 sont capables produire du TGF- β 3 lors qu'ils sont stimulés avec de l'IL-23, et dans un modèle d'EAE le TGF- β 3 rend les Th17 plus pathogéniques, caractérisé par la production de GM-CSF et d'IFN- γ (Lee et al., 2012). L'IL-23 est produit en cas de dommage dans l'intestin, comme lors d'un traitement par DSS. Ainsi pour étudier le rôle du TGF- β 1 et du TGF- β 3 dans la stabilité du lineage Th17 nous pourrions croiser nos souris IL-17^{CRE} Rosa26 avec des souris TGF- β 3^{flx/flx}. La comparaison des souris IL17^{CRE} Rosa26 TGF- β 1^{flx/flx} et

IL17^{CRE} Rosa26 TGF- β ^{flx/flx} en condition d'inflammation médiée par DSS pourrait nous permettre de savoir quelle isoforme du TGF- β est impliqué dans la stabilité des Th17. Enfin le TGF- β 3 semble signaler via les protéines SMAD1 et SMAD5 (Lee et al., 2012). La génération de souris IL-17^{CRE} Rosa26 SMAD1^{flx/flx}, IL-17^{CRE} Rosa26 SMAD5^{flx/flx} et IL-17^{CRE} Rosa26 SMAD1^{flx/flx} SMAD5^{flx/flx} pourrait permettre de comprendre précisément par quels mécanismes le TGF- β 3 agit dans les Th17.

4. L'accumulation de Th17 dans l'intestin : un phénomène multiparamétrique ?

Dans notre modèle, le développement de l'inflammation chronique est lié à une augmentation du nombre de cellules Th1exTh17. Nos analyses du marqueur de prolifération Ki67 ne suffisent pas à expliquer cette augmentation du nombre de cellules YFP, et suggèrent que d'autres acteurs interviennent dans ce phénomène.

i. TGF- β et FAS

Dans un modèle d'EAE la perte de la molécule FAS au sein des Th17 différenciés entraîne une forte augmentation de leur capacité à produire de l'IFN- γ via activation de la voie STAT1 (Meyer zu Horste et al., 2018). Le phénotype décrit présente des points communs avec celui observé dans notre modèle, et suggère un lien FAS / TGF- β . Il pourrait être intéressant de voir si les Th1exTh17 qui n'expriment plus le récepteur du TGF- β perdent également l'expression de la molécule FAS. Une perte de la molécule FAS pourrait rendre les Th17 intestinaux moins sensibles à l'apoptose, ce qui pourrait expliquer l'augmentation importante de ces cellules chez les souris TGF- β RKO. A l'inverse les Th17 des souris TGF- β RCA pourraient sur-exprimer la molécule FAS ce qui les rendrait plus sensible à l'apoptose et donc moins nombreux. Une analyse de FAS mais également des marqueurs associés à l'apoptose (Bim, caspases) ou à la survie (Bcl-2, B-cell lymphoma 2) permettrait de répondre à cette question.

ii. Recrutement de Th17 depuis la périphérie selon l'axe CCL20/CCR6

L'analyse de CCR6 et CXCR3 sur les Th1exTh17 montrent qu'en dépit de la perte de ROR- γ t ils gardent co-expriment CCR6 et CXCR3. Une autre hypothèse pouvant expliquer

l'enrichissement de cellules Th1 et Th17 dans l'intestin pourrait être leur recrutement depuis la périphérie au sein d'un site inflammatoire selon l'axe CCR6/CCL20 (Esplugues et al., 2011). Les résultats montrent dans l'intestin des souris TGF- β RKO une importante production d'IFN- γ , qui est connu pour induire la production de chimiokines comme CXCL9/10/11 qui favorise le recrutement des cellules exprimant CXCR3. Il pourrait donc être intéressant de regarder si l'intestin des souris TGF- β RKO est enrichie en CCL20 et/ou CXCL9/10/11.

5. Th17 et microbiote

La génération des Th17 est dépendante de la présence du microbiote, en particulier de bactéries comme les SFB (Ivanov et al., 2009b; Sano et al., 2015). Nos résultats ne montrent pas d'enrichissement en SFB au sein de l'intestin des souris TGF- β RKO. Toutefois, d'autres taxons bactériens adhérents à l'épithélium ont été décrits et sont impliqués dans la génération des Th17 (Atarashi et al., 2015). En utilisant un microscope électronique ou bien des analyses FISH il pourrait être intéressant de déterminer si l'épithélium des souris TGF- β RKO et plus colonisé par des bactéries adhérentes que l'épithélium des souris TGF- β RWT. L'analyse complète par séquençage du microbiote de la souris RKO pourrait mettre en évidence la présence d'un taxon favorisant l'apparition de T17 avec un phénotype de type Th1/Th17.

De façon intéressante nos résultats indiquent que le microbiote n'est pas nécessaire pour la maintenance des Th17, bien qu'il soit requis pour leur génération. Dans notre modèle, des souris traitées depuis la naissance avec un cocktail d'antibiotiques à large spectre ne développent pas de Th17 ; mais l'administration du même cocktail à des animaux plus âgés ayant déjà des cellules YFP (Yellow Fluorescent Protein) n'impacte pas leur nombre. Fin de déterminer si l'engagement du TCR est requis pour l'acquisition du phénotype Th1, nous pourrions générer des animaux IL17^{CRE} Rosa26 TGF- β RII^{flx/flx} RAG^{KO} OT-II⁺, dans lesquels tous les lymphocytes T expriment un TCR spécifique de la protéine ovalbumine de poulet. Le développement d'une inflammation intestinale en l'absence de la protéine ovalbumine signifierait que l'engagement du TCR n'est pas requis dans la perte du phénotype Th17 et l'acquisition du phénotype Th1.

Dans un modèle murin *Citrobacter rodentium* induit des Th17 différents de ceux induit par SFB, produisant plus d'IFN- γ , et ayant un métabolisme différent (Omenetti et al., 2019). L'animalerie où l'étude a été faite ayant un statut SOPF, il est peu probable d'y retrouver ce genre de micro-organisme. Il pourrait cependant être intéressant de voir si le TGF- β contrôle le métabolisme des Th17, et s'il est dérégulé en cas de perte des signaux du TGF- β .

6. TGF- β et stabilité du lineage Th17

Les résultats de notre étude ne montrent pas par quels mécanismes moléculaires les Th1 se mettent à exprimer T-bet. Plusieurs publications décrivent que l'acquisition d'un phénotype Th1 par les Th17 peut être dû à l'effet de l'IL-12, de l'IL-23 ou de l'IFN- γ récepteur (Lee et al., 2009; Lexberg et al., 2010). De façon surprenante nos résultats ne montrent pas d'expression particulièrement élevée de ces molécules au sein des Th1exTh17 de la souris TGF- β RII KO (résultats non montrés). Le TGF- β est connu pour inhiber l'expression de T-bet (Park et al., 2005) ; et il est possible qu'une absence de signalisation du TGF- β dans les Th17 soit suffisante pour permettre l'expression de T-bet. Une fois exprimé, T-bet est capable de réprimer l'expression de ROR- γ t (Lazarevic et al., 2011), afin de renforcer le phénotype Th1.

L'expression des gènes est régulée par l'épigénétique, qui correspond à l'ouverture de la chromatine, la méthylation de l'ADN, et aux modifications post-traductionnelle des histones. Les histones des promoteurs des gènes ROR- γ t et T-bet ont été décrit comme pouvant être porteurs de marques associées à l'activation (H3K4me3) ou à la répression (H3K27me3) (Muranski and Restifo, 2013). Il pourrait être intéressant de regarder si le TGF- β contrôle l'expression de ces marques, de même que celles d'autres acteurs impliqués dans le programme de différenciation Th17 comme Trim28 qui forme un complexe avec ROR- γ t et STAT3 pour activer les gènes signature du programme Th17 (Jiang et al., 2018) ou Cxxc1 (Cxxc finger protein1) qui contrôle l'expression de l'IL-6R- α et donc la voie STAT3 (Lin et al., 2019). De façon plus générale nous pourrions aussi regarder si la signalisation du TGF- β a un impact sur la méthylation des gènes *il17a*, *ifng*, *gm-csf*.

7. L'IFN- γ vs IL-17A dans l'inflammation intestinale

Il est intéressant de noter que les souris TGF- β RII KO développent une forte inflammation intestinale indépendamment de leur capacité à produire de l'IL-17A. On observe cependant une forte production d'IFN- γ . Afin de savoir si l'IFN- γ était le médiateur de l'inflammation nous avons croisé nos souris TGF- β RII KO avec des animaux T-bet^{KO}. Les premiers résultats montrent qu'une déficience en T-bet prévient l'apparition de l'inflammation intestinale. Malheureusement nos constructions génétiques n'ont pas permis de garder l'expression du gène reporter Rosa26, et il est impossible de savoir si l'absence de T-bet prévient de la perte de ROR- γ t malgré une absence de TGF- β . Contrairement à la délétion du TGF- β RII la délétion de T-bet n'est pas spécifique aux cellules productrices d'IL-17A, ce qui peut amène un biais dans l'expérience car l'ensemble des cellules produisant de l'IFN- γ sont affectées. Il est important de noter que la production d'IFN- γ peut-être induite par les facteurs de transcriptions Runx malgré une absence de T-bet.

Il a été décrit que la production simultanée d'IL-17A et d'IFN- γ était dépendante de la présence de ROR- γ t et T-bet mais aussi de Runx1 ou Runx3 (Wang et al., 2014b). Des analyses préliminaires n'ont pas révélé de sur-expression de Runx1 ; et très peu de cellules sont à la fois productrice d'IL-17A et d'IFN- γ . Il est connu que des souris déficientes pour l'IFN- γ sont résistantes aux colites induites par transfert de T (Harbour et al., 2015) ou par DSS (Nava et al., 2010). Ces données suggèrent un rôle important de l'IFN- γ produit par T-bet dans les pathologies intestinales. En ce sens un traitement anti-IFN- γ seul ou associé aux traitements anti-TNF qui sont utilisés depuis des années chez les patients souffrant de maladie de Crohn (Adegbola et al., 2018) semblerait prometteur.

Depuis plusieurs années l'inflammation chronique intestinale est reconnue comme étant favorable au développement de cancer colorectaux (Grivennikov et al., 2010; Shimizu et al., 2012), et plusieurs études ont décrit l'IL-17A comme ayant un fort pouvoir pro-tumoral (Chae et al., 2010; Wang et al., 2014a). Malgré l'inflammation chronique, aucune souris RKO, capable ou non de sécréter de l'IL-17A n'a développé de tumeur intestinale. Utiliser un modèle d'AOM-DSS pourrait permettre de déterminer si dans notre modèle l'IL-17A joue un rôle plutôt protecteur ou non. Il pourrait également être intéressant de regarder si une perte de la signalisation du TGF- β entraîne une perte de la production de d'IL-17F.

8. Cible thérapeutique

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin comme la maladie de Crohn ou la colite ulcéreuse sont caractérisées par une forte activation du système immunitaire ; ou le niveau de phosphorylation des protéines SMAD2/3 est très faible. Cela est dû à une surexpression de la protéine SMAD7, qui régule négativement la phosphorylation de SMAD2/3 (Monteleone, 2012), et empêche donc les effets immunosuppresseurs du TGF- β . Ainsi, restaurer un niveau normal de SMAD7 permettrait de faire en sorte que les cellules puissent à nouveau être régulées par le TGF- β .

Dans cette optique, le « mongensen » un oligonucléotide antisens de SMAD7 a récemment été développé afin de restaurer une sensibilité des cellules immunitaires au TGF- β (Ardizzone et al., 2016). Les oligonucléotides antisens reconnaissent et s'hybrident à l'ARN messager cible afin de faciliter la dégradation de l'ARN messager via la RNase-H. Les molécules d'ARN doubles brins sont reconnues empêchant la traduction et donc la production de la protéine.

La molécule est actuellement en phase III d'essai clinique (NCT02641392). Le « mongensen » s'administre par voie orale et cible pour le moment l'ensemble des cellules. Nos résultats montrent que la signalisation du TGF- β est cruciale dans les Th17 afin de prévenir de l'apparition d'une inflammation chronique. Afin de permettre un meilleur ciblage des Th17, il pourrait être intéressant de coupler la molécule avec un marqueur spécifique des Th17/Th1 comme par exemple CCR6 et/ou CXCR3. L'IFN- γ entraîne également une augmentation de l'expression de SMAD7, et coupler le « mongensen » avec un traitement anti-IFN- γ pourrait permettre d'augmenter l'efficacité de la thérapie pour les patients répondant le moins au traitement.

III. Conclusion générale

En conclusion, mes travaux de thèse ont permis de mettre en évidence que les signaux du TGF- β ne sont pas obligatoires pour la différenciation des Th17 lorsque celle-ci se fait en

condition de stress. Cependant, cette signalisation, via les voies non canoniques, est absolument requise afin de maintenir le phénotype Th17. En l'absence de TGF- β les Th17 n'expriment plus le facteur de transcription ROR- γ t mais T-bet, et ne produisent plus d'IL-17A mais des cytokines comme l'IFN- γ et le TNF- α , ce qui entraîne le développement d'une inflammation chronique intestinale. Cette inflammation est dépendante de l'expression de T-bet, car des souris dont les lymphocytes Th17 n'expriment plus ni le TGF- β RII ni T-bet ne développent pas de pathologie intestinale.

BIBLIOGRAPHIE

Adegbola, S.O., Sahnun, K., Warusavitarn, J., Hart, A., and Tozer, P. (2018). Anti-TNF Therapy in Crohn's Disease. *IJMS* 19, 2244.

Afkarian, M., Sedy, J.R., Yang, J., Jacobson, N.G., Cereb, N., Yang, S.Y., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2002). T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naïve CD4⁺ T cells. *Nat Immunol* 3, 549–557.

Annacker, O., Coombes, J.L., Malmstrom, V., Uhlig, H.H., Bourne, T., Johansson-Lindbom, B., Agace, W.W., Parker, C.M., and Powrie, F. (2005). Essential role for CD103 in the T cell-mediated regulation of experimental colitis. *J Exp Med* 202, 1051–1061.

Arduzzone, S., Bevivino, G., and Monteleone, G. (2016). Mongersen, an oral Smad7 antisense oligonucleotide, in patients with active Crohn's disease. *Therap Adv Gastroenterol* 9, 527–532.

Arthur, J.C., Perez-Chanona, E., Mühlbauer, M., Tomkovich, S., Uronis, J.M., Fan, T.-J., Campbell, B.J., Abujamel, T., Dogan, B., Rogers, A.B., et al. (2012). Intestinal Inflammation Targets Cancer-Inducing Activity of the Microbiota. *Science* 338, 120–123.

Artis, D., and Spits, H. (2015). The biology of innate lymphoid cells. *Nature* 517, 293–301.

Atarashi, K., Nishimura, J., Shima, T., Umesaki, Y., Yamamoto, M., Onoue, M., Yagita, H., Ishii, N., Evans, R., Honda, K., et al. (2008). ATP drives lamina propria TH17 cell differentiation. *Nature* 455, 808–812.

Atarashi, K., Tanoue, T., Ando, M., Kamada, N., Nagano, Y., Narushima, S., Suda, W., Imaoka, A., Setoyama, H., Nagamori, T., et al. (2015). Th17 Cell Induction by Adhesion of Microbes to Intestinal Epithelial Cells. *Cell* 163, 367–380.

Aune, T.M., Collins, P.L., and Chang, S. (2009). Epigenetics and T helper 1 differentiation. *Immunology* 126, 299–305.

Bain, C.C., Montgomery, J., Scott, C.L., Kel, J.M., Girard-Madoux, M.J.H., Martens, L., Zangerle-Murray, T.F.P., Ober-Blöbaum, J., Lindenbergh-Kortleve, D., Samsom, J.N., et al. (2017). TGFβR signalling controls CD103⁺CD11b⁺ dendritic cell development in the intestine. *Nat Commun* 8, 620.

Barker, N. (2014). Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 19–33.

Basu, R., Whitley, S.K., Bhaumik, S., Zindl, C.L., Schoeb, T.R., Benveniste, E.N., Pear, W.S., Hatton, R.D., and Weaver, C.T. (2015). IL-1 signaling modulates activation of STAT transcription factors to antagonize retinoic acid signaling and control the TH17 cell–iTreg cell balance. *Nat Immunol* 16, 286–295.

Bauché, D., and Marie, J.C. (2017). Transforming growth factor β: a master regulator of the gut microbiota and immune cell interactions. *Clin Trans Immunol* 6, e136.

Belkaid, Y., and Hand, T.W. (2014). Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation. *Cell* 157, 121–141.

- 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.
- Boucard-Jourdin, M., Kugler, D., Endale Ahanda, M.-L., This, S., De Calisto, J., Zhang, A., Mora, J.R., Stuart, L.M., Savill, J., Lacy-Hulbert, A., et al. (2016). β 8 Integrin Expression and Activation of TGF- β by Intestinal Dendritic Cells Are Determined by Both Tissue Microenvironment and Cell Lineage. *J.I. 197*, 1968–1978.
- Bouguermouh, S., Fortin, G., Baba, N., Rubio, M., and Sarfati, M. (2009). CD28 Co-Stimulation Down Regulates Th17 Development. *PLoS ONE* *4*, e5087.
- Boullier, S., Tanguy, M., Kadaoui, K.A., Caubet, C., Sansonetti, P., Corthésy, B., and Phalipon, A. (2009). Secretory IgA-Mediated Neutralization of *Shigella flexneri* Prevents Intestinal Tissue Destruction by Down-Regulating Inflammatory Circuits. *J Immunol* *183*, 5879–5885.
- Brandl, K., Plitas, G., Schnabl, B., DeMatteo, R.P., and Pamer, E.G. (2007). MyD88-mediated signals induce the bactericidal lectin RegIII γ and protect mice against intestinal *Listeria monocytogenes* infection. *J Exp Med* *204*, 1891–1900.
- Britton, G.J., Contijoch, E.J., Mogno, I., Vennaro, O.H., Llewellyn, S.R., Ng, R., Li, Z., Mortha, A., Merad, M., Das, A., et al. (2019). Microbiotas from Humans with Inflammatory Bowel Disease Alter the Balance of Gut Th17 and ROR γ t⁺ Regulatory T Cells and Exacerbate Colitis in Mice. *Immunity* *50*, 212-224.e4.
- Brucklacher-Waldert, V., Ferreira, C., Stebegg, M., Fesneau, O., Innocentin, S., Marie, J.C., and Veldhoen, M. (2017). Cellular Stress in the Context of an Inflammatory Environment Supports TGF- β -Independent T Helper-17 Differentiation. *Cell Reports* *19*, 2357–2370.
- Bunker, J.J., Flynn, T.M., Koval, J.C., Shaw, D.G., Meisel, M., McDonald, B.D., Ishizuka, I.E., Dent, A.L., Wilson, P.C., Jabri, B., et al. (2015). Innate and Adaptive Humoral Responses Coat Distinct Commensal Bacteria with Immunoglobulin A. *Immunity* *43*, 541–553.
- Burger-van Paassen, N., Vincent, A., Puiman, P.J., van der Sluis, M., Bouma, J., Boehm, G., van Goudoever, J.B., van Seuningen, I., and Renes, I.B. (2009). The regulation of intestinal mucin MUC2 expression by short-chain fatty acids: implications for epithelial protection. *Biochem. J.* *420*, 211–219.
- Cazac, B.B. TGF- β Receptor Controls B Cell Responsiveness and Induction of IgA In Vivo. *9*.
- Cebula, A., Seweryn, M., Rempala, G.A., Pabla, S.S., McIndoe, R.A., Denning, T.L., Bry, L., Kraj, P., Kisielow, P., and Ignatowicz, L. (2013). Thymus-derived regulatory T cells contribute to tolerance to commensal microbiota. *Nature* *497*, 258–262.
- Cerovic, V., Houston, S.A., Scott, C.L., Aumeunier, A., Yrlid, U., Mowat, A.M., and Milling, S.W.F. (2013). Intestinal CD103⁺ dendritic cells migrate in lymph and prime effector T cells. *Mucosal Immunol* *6*, 104–113.
- Chae, W.-J., Gibson, T.F., Zelterman, D., Hao, L., Henegariu, O., and Bothwell, A.L.M. (2010). Ablation of IL-17A abrogates progression of spontaneous intestinal tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *107*, 5540–5544.
- Chang, X., Liu, F., Wang, X., Lin, A., Zhao, H., and Su, B. (2011). The Kinases MEKK2 and MEKK3 Regulate Transforming Growth Factor- β -Mediated Helper T Cell Differentiation. *Immunity* *34*, 201–212.

- Chen, B., Chen, H., Shu, X., Yin, Y., Li, J., Qin, J., Chen, L., Peng, K., Xu, F., Gu, W., et al. (2018). Presence of Segmented Filamentous Bacteria in Human Children and Its Potential Role in the Modulation of Human Gut Immunity. *Front. Microbiol.* *9*, 1403.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. (2003). Conversion of Peripheral CD4⁺ CD25⁻ Naive T Cells to CD4⁺ CD25⁺ Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor *Foxp3*. *J Exp Med* *198*, 1875–1886.
- Chewning, J.H., and Weaver, C.T. (2014). Development and Survival of Th17 Cells within the Intestines: The Influence of Microbiome- and Diet-Derived Signals. *J.I.* *193*, 4769–4777.
- Ciofani, M., Madar, A., Galan, C., Sellars, M., Mace, K., Pauli, F., Agarwal, A., Huang, W., Parkurst, C.N., Muratet, M., et al. (2012). A Validated Regulatory Network for Th17 Cell Specification. *Cell* *151*, 289–303.
- Clark, M.A., Hirst, B.H., and Jepson, M.A. (1998). M-Cell Surface α 1 Integrin Expression and Invasin-Mediated Targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to Mouse Peyer's Patch M Cells. *66*, 7.
- Codarri, L., Gyölvézi, G., Tosevski, V., Hesske, L., Fontana, A., Magnenat, L., Suter, T., and Becher, B. (2011). ROR γ t drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol* *12*, 560–567.
- Coombes, J.L., Siddiqui, K.R.R., Arancibia-Cárcamo, C.V., Hall, J., Sun, C.-M., Belkaid, Y., and Powrie, F. (2007). A functionally specialized population of mucosal CD103⁺ DCs induces Foxp3⁺ regulatory T cells via a TGF- β - and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* *204*, 1757–1764.
- Cornick, S., Tawiah, A., and Chadee, K. (2015). Roles and regulation of the mucus barrier in the gut. *Tissue Barriers* *3*, e982426.
- Corr, S.C., Li, Y., Riedel, C.U., O'Toole, P.W., Hill, C., and Gahan, C.G.M. (2007). Bacteriocin production as a mechanism for the anti-infective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *104*, 7617–7621.
- Crotty, S. (2014). T Follicular Helper Cell Differentiation, Function, and Roles in Disease. *Immunity* *41*, 529–542.
- Dardalhon, V., Awasthi, A., Kwon, H., Galileos, G., Gao, W., Sobel, R.A., Mitsdoerffer, M., Strom, T.B., Elyaman, W., Ho, I.-C., et al. (2008). IL-4 inhibits TGF- β -induced Foxp3⁺ T cells and, together with TGF- β , generates IL-9⁺ IL-10⁺ Foxp3⁻ effector T cells. *Nat Immunol* *9*, 1347–1355.
- De Simone, V., Pallone, F., Monteleone, G., and Stolfi, C. (2013). Role of T_H 17 cytokines in the control of colorectal cancer. *OncoImmunology* *2*, e26617.
- Denning, T.L., Granger, S., Mucida, D., Graddy, R., Leclercq, G., Zhang, W., Honey, K., Rasmussen, J.P., Cheroutre, H., Rudensky, A.Y., et al. (2007). Mouse TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD8 $\alpha\alpha$ Intraepithelial Lymphocytes Express Genes That Down-Regulate Their Antigen Reactivity and Suppress Immune Responses. *J Immunol* *178*, 4230–4239.
- Djuretic, I.M., Levanon, D., Negreanu, V., Groner, Y., Rao, A., and Ansel, K.M. (2007). Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Ifng and silence Il4 in T helper type 1 cells. *Nat Immunol* *8*, 145–153.
- Donaldson, G.P., Lee, S.M., and Mazmanian, S.K. (2016). Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol* *14*, 20–32.

- Dubin, P.J., and Kolls, J.K. (2008). Th17 cytokines and mucosal immunity. *Immunological Reviews* 226, 160–171.
- Durant, L., Watford, W.T., Ramos, H.L., Laurence, A., Vahedi, G., Wei, L., Takahashi, H., Sun, H.-W., Kanno, Y., Powrie, F., et al. (2010). Diverse Targets of the Transcription Factor STAT3 Contribute to T Cell Pathogenicity and Homeostasis. *Immunity* 32, 605–615.
- Esplugues, E., Huber, S., Gagliani, N., Hauser, A.E., Town, T., Wan, Y.Y., O'Connor, W., Rongvaux, A., Van Rooijen, N., Haberman, A.M., et al. (2011). Control of TH17 cells occurs in the small intestine. *Nature* 475, 514–518.
- Ferreira, J.A., Wu, K.J., Hryckowian, A.J., Bouley, D.M., Weimer, B.C., and Sonnenburg, J.L. (2014). Gut Microbiota-Produced Succinate Promotes *C. difficile* Infection after Antibiotic Treatment or Motility Disturbance. *Cell Host & Microbe* 16, 770–777.
- Flannigan, K.L., Ngo, V.L., Geem, D., Harusato, A., Hirota, S.A., Parkos, C.A., Lukacs, N.W., Nusrat, A., Gaboriau-Routhiau, V., Cerf-Bensussan, N., et al. (2017). IL-17A-mediated neutrophil recruitment limits expansion of segmented filamentous bacteria. *Mucosal Immunol* 10, 673–684.
- Forbes, S.J., Eschmann, M., and Mantis, N.J. (2008). Inhibition of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Motility and Entry into Epithelial Cells by a Protective Antilipopolysaccharide Monoclonal Immunoglobulin A Antibody. *Infection and Immunity* 76, 4137–4144.
- Forbes, S.J., Bumpus, T., McCarthy, E.A., Corthésy, B., and Mantis, N.J. (2011). Transient Suppression of *Shigella flexneri* Type 3 Secretion by a Protective O-Antigen-Specific Monoclonal IgA. *MBio* 2, e00042-11.
- Fuchs, A., Vermi, W., Lee, J.S., Lonardi, S., Gilfillan, S., Newberry, R.D., Cella, M., and Colonna, M. (2013). Intraepithelial Type 1 Innate Lymphoid Cells Are a Unique Subset of IL-12- and IL-15-Responsive IFN- γ -Producing Cells. *Immunity* 38, 769–781.
- Gagliani, N., Vesely, M.C.A., Iseppon, A., Brockmann, L., Xu, H., Palm, N.W., de Zoete, M.R., Licona-Limón, P., Paiva, R.S., Ching, T., et al. (2015). Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. *Nature* 523, 221–225.
- Gangadharan, D., Sivaramakrishnan, S., Nampoothiri, K.M., and Pandey, A. (2006). Solid Culturing of *Bacillus amyloliquefaciens* for Alpha Amylase Production. 7.
- Garcia, M.A., Nelson, W.J., and Chavez, N. (2018). Cell–Cell Junctions Organize Structural and Signaling Networks. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 10, a029181.
- Gasteiger, G., Fan, X., Dikiy, S., Lee, S.Y., and Rudensky, A.Y. (2015). Tissue residency of innate lymphoid cells in lymphoid and nonlymphoid organs. *Science* 350, 981–985.
- Gerbe, F., Sidot, E., Smyth, D.J., Ohmoto, M., Matsumoto, I., Dardalhon, V., Cesses, P., Garnier, L., Pouzolles, M., Brulin, B., et al. (2016). Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. *Nature* 529, 226–230.
- Ghiringhelli, F., Ménard, C., Terme, M., Flament, C., Taieb, J., Chaput, N., Puig, P.E., Novault, S., Escudier, B., Vivier, E., et al. (2005). CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor- β -dependent manner. *J Exp Med* 202, 1075–1085.
- Ghoreschi, K., Laurence, A., Yang, X.-P., Tato, C.M., McGeachy, M.J., Konkel, J.E., Ramos, H.L., Wei, L., Davidson, T.S., Bouladoux, N., et al. (2010). Generation of pathogenic TH17 cells in the absence of TGF- β signalling. *Nature* 467, 967–971.

- Gomez-Rodriguez, J., Sahu, N., Handon, R., Davidson, T.S., Anderson, S.M., Kirby, M.R., August, A., and Schwartzberg, P.L. (2009). Differential Expression of Interleukin-17A and -17F Is Coupled to T Cell Receptor Signaling via Inducible T Cell Kinase. *Immunity* *31*, 587–597.
- Gorelik, L., Fields, P.E., and Flavell, R.A. (2000). Cutting Edge: TGF- β Inhibits Th Type 2 Development Through Inhibition of GATA-3 Expression. *J Immunol* *165*, 4773–4777.
- Gorelik, L., Constant, S., and Flavell, R.A. (2002). Mechanism of Transforming Growth Factor β -induced Inhibition of T Helper Type 1 Differentiation. *J Exp Med* *195*, 1499–1505.
- Goto, Y., Panea, C., Nakato, G., Cebula, A., Lee, C., Diez, M.G., Laufer, T.M., Ignatowicz, L., and Ivanov, I.I. (2014). Segmented Filamentous Bacteria Antigens Presented by Intestinal Dendritic Cells Drive Mucosal Th17 Cell Differentiation. *Immunity* *40*, 594–607.
- Gribble, F.M., and Reimann, F. (2016). Enteroendocrine Cells: Chemosensors in the Intestinal Epithelium. *Annu. Rev. Physiol.* *78*, 277–299.
- Grivennikov, S.I. (2013). Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia. *Semin Immunopathol* *35*, 229–244.
- Grivennikov, S.I., Greten, F.R., and Karin, M. (2010). Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell* *140*, 883–899.
- Gutcher, I., Donkor, M.K., Ma, Q., Rudensky, A.Y., Flavell, R.A., and Li, M.O. (2011). Autocrine Transforming Growth Factor- β 1 Promotes In Vivo Th17 Cell Differentiation. *Immunity* *34*, 396–408.
- Haas, J.D., Ravens, S., Düber, S., Sandrock, I., Oberdörfer, L., Kashani, E., Chennupati, V., Föhse, L., Naumann, R., Weiss, S., et al. (2012). Development of Interleukin-17-Producing $\gamma\delta$ T Cells Is Restricted to a Functional Embryonic Wave. *Immunity* *37*, 48–59.
- Harbour, S.N., Maynard, C.L., Zindl, C.L., Schoeb, T.R., and Weaver, C.T. (2015). Th17 cells give rise to Th1 cells that are required for the pathogenesis of colitis. *Proc Natl Acad Sci USA* *112*, 7061–7066.
- Hasan, M., Neumann, B., Hauptshofer, S., Stahlke, S., Claudio Fantini, M., Angstwurm, K., Bogdahn, U., and Kleiter, I. (2015). Activation of TGF- β -induced non-Smad signaling pathways during Th17 differentiation. *Immunol Cell Biol* *93*, 662–672.
- Hasan, Z., Koizumi, S., Sasaki, D., Yamada, H., Arakaki, N., Fujihara, Y., Okitsu, S., Shirahata, H., and Ishikawa, H. (2017). JunB is essential for IL-23-dependent pathogenicity of Th17 cells. *Nat Commun* *8*, 15628.
- Hase, K., Kawano, K., Nochi, T., Pontes, G.S., Fukuda, S., Ebisawa, M., Kadokura, K., Tobe, T., Fujimura, Y., Kawano, S., et al. (2009). Uptake through glycoprotein 2 of FimH⁺ bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature* *462*, 226–230.
- Hepworth, M.R., Monticelli, L.A., Fung, T.C., Ziegler, C.G.K., Grunberg, S., Sinha, R., Mantegazza, A.R., Ma, H.-L., Crawford, A., Angelosanto, J.M., et al. (2013). Innate lymphoid cells regulate CD4⁺ T-cell responses to intestinal commensal bacteria. *Nature* *498*, 113–117.
- Hildebrandt, M.A., Hoffmann, C., Sherrill-Mix, S.A., Keilbaugh, S.A., Hamady, M., Chen, Y., Knight, R., Ahima, R.S., Bushman, F., and Wu, G.D. (2009). High-Fat Diet Determines the Composition of the Murine Gut Microbiome Independently of Obesity. *Gastroenterology* *137*, 1716–1724.e2.
- Hirota, K., Duarte, J.H., Veldhoen, M., Hornsby, E., Li, Y., Cua, D.J., Ahlfors, H., Wilhelm, C., Tolaini, M., Menzel, U., et al. (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. *Nature Immunology* *14*, 372–379.
- Hoytema van Konijnenburg, D.P., Reis, B.S., Pedicord, V.A., Farache, J., Victora, G.D., and Mucida, D. (2017). Intestinal Epithelial and Intraepithelial T Cell Crosstalk Mediates a Dynamic Response to Infection. *Cell* *171*, 783–794.e13.
- Huang, G., Wang, Y., Vogel, P., Kanneganti, T.-D., Otsu, K., and Chi, H. (2012). Signaling via the kinase p38 α programs dendritic cells to drive TH17 differentiation and autoimmune inflammation. *Nat Immunol* *13*, 152–161.
- Ishigame, H., Kakuta, S., Nagai, T., Kadoki, M., Nambu, A., Komiyama, Y., Fujikado, N., Tanahashi, Y., Akitsu, A., Kotaki, H., et al. (2009). Differential Roles of Interleukin-17A and -17F in Host Defense against Mucosal Bacterial Infection and Allergic Responses. *Immunity* *30*, 108–119.
- Ito, R., Shin-Ya, M., Kishida, T., Urano, A., Takada, R., Sakagami, J., Imanishi, J., Kita, M., Ueda, Y., Iwakura, Y., et al. (2006). Interferon-gamma is causatively involved in experimental inflammatory bowel disease in mice. *Clin Exp Immunol* *146*, 330–338.
- Ivanov, I.I., McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J., and Littman, D.R. (2006). The Orphan Nuclear Receptor ROR γ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells. *Cell* *126*, 1121–1133.
- Ivanov, I.I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E.L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K.C., Santee, C.A., Lynch, S.V., et al. (2009a). Induction of Intestinal Th17 Cells by Segmented Filamentous Bacteria. *Cell* *139*, 485–498.
- Ivanov, I.I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E.L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K.C., Santee, C.A., Lynch, S.V., et al. (2009b). Induction of Intestinal Th17 Cells by Segmented Filamentous Bacteria. *Cell* *139*, 485–498.
- Jain, R., Chen, Y., Kanno, Y., Joyce-Shaikh, B., Vahedi, G., Hirahara, K., Blumenschein, W.M., Sukumar, S., Haines, C.J., Sadekova, S., et al. (2016). Interleukin-23-Induced Transcription Factor Blimp-1 Promotes Pathogenicity of T Helper 17 Cells. *Immunity* *44*, 131–142.
- Jang, M.H., Sougawa, N., Tanaka, T., Hirata, T., Hiroi, T., Tohya, K., Guo, Z., Umemoto, E., Ebisuno, Y., Yang, B.-G., et al. (2006). CCR7 Is Critically Important for Migration of Dendritic Cells in Intestinal Lamina Propria to Mesenteric Lymph Nodes. *J Immunol* *176*, 803–810.
- Jiang, Y., Liu, Y., Lu, H., Sun, S.-C., Jin, W., Wang, X., and Dong, C. (2018). Epigenetic activation during T helper 17 cell differentiation is mediated by Tripartite motif containing 28. *Nat Commun* *9*, 1424.
- Johansson, M.E.V., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., and Hansson, G.C. (2008). The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *MEDICAL SCIENCES* *6*.
- Johansson-Lindbom, B., Svensson, M., Pabst, O., Palmqvist, C., Marquez, G., Förster, R., and Agace, W.W. (2005). Functional specialization of gut CD103⁺ dendritic cells in the regulation of tissue-selective T cell homing. *J Exp Med* *202*, 1063–1073.
- Josefowicz, S.Z., Lu, L.-F., and Rudensky, A.Y. (2012). Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function. *Annu. Rev. Immunol.* *30*, 531–564.

- Kamada, N., Seo, S.-U., Chen, G.Y., and Núñez, G. (2013). Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat Rev Immunol* *13*, 321–335.
- Kashiwagi, I., Morita, R., Schichita, T., Komai, K., Saeki, K., Matsumoto, M., Takeda, K., Nomura, M., Hayashi, A., Kanai, T., et al. (2015). Smad2 and Smad3 Inversely Regulate TGF- β Autoinduction in *Clostridium butyricum*-Activated Dendritic Cells. *Immunity* *43*, 65–79.
- Keeney, K.M., Yurist-Doutsch, S., Arrieta, M.-C., and Finlay, B.B. (2014). Effects of Antibiotics on Human Microbiota and Subsequent Disease. *Annu. Rev. Microbiol.* *68*, 217–235.
- Kim, K.S., Hong, S.-W., Han, D., Yi, J., Jung, J., Yang, B.-G., Lee, J.Y., Lee, M., and Surh, C.D. (2016). Dietary antigens limit mucosal immunity by inducing regulatory T cells in the small intestine. *Science* *351*, 858–863.
- Kleinewietfeld, M., Manzel, A., Titze, J., Kvakan, H., Yosef, N., Linker, R.A., Muller, D.N., and Hafler, D.A. (2013). Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. *Nature* *496*, 518–522.
- Klose, C.S.N., Kiss, E.A., Schwierzeck, V., Ebert, K., Hoyler, T., d’Hargues, Y., Göppert, N., Croxford, A.L., Waisman, A., Tanriver, Y., et al. (2013). A T-bet gradient controls the fate and function of CCR6–ROR γ t⁺ innate lymphoid cells. *Nature* *494*, 261–265.
- Kong, S., Zhang, Y.H., and Zhang, W. (2018). Regulation of Intestinal Epithelial Cells Properties and Functions by Amino Acids. *BioMed Research International* *2018*, 1–10.
- Konkel, J.E., and Chen, W. (2011). Balancing acts: the role of TGF- β in the mucosal immune system. *Trends in Molecular Medicine* *17*, 668–676.
- Korn, T., Bettelli, E., Gao, W., Awasthi, A., Jäger, A., Strom, T.B., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. (2007). IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory TH17 cells. *Nature* *448*, 484–487.
- Kostic, A.D., Chun, E., Robertson, L., Glickman, J.N., Gallini, C.A., Michaud, M., Clancy, T.E., Chung, D.C., Lochhead, P., Hold, G.L., et al. (2013). *Fusobacterium nucleatum* Potentiates Intestinal Tumorigenesis and Modulates the Tumor-Immune Microenvironment. *Cell Host & Microbe* *14*, 207–215.
- Kryczek, I., Wei, S., Vatan, L., Escara-Wilke, J., Szeliga, W., Keller, E.T., and Zou, W. (2007). Cutting Edge: Opposite Effects of IL-1 and IL-2 on the Regulation of IL-17⁺ T Cell Pool IL-1 Subverts IL-2-Mediated Suppression. *J Immunol* *179*, 1423–1426.
- Kühl, A.A., Pawlowski, N.N., Grollich, K., Blessenohl, M., Westermann, J., Zeitz, M., Loddenkemper, C., and Hoffmann, J.C. (2009). Human peripheral $\gamma\delta$ T cells possess regulatory potential: Human $\gamma\delta$ T cells have regulatory potential. *Immunology* *128*, 580–588.
- Kwong, L.N., and Dove, W.F. (2009). APC and Its Modifiers in Colon Cancer. In *APC Proteins*, I.S. Näthke, and B.M. McCartney, eds. (New York, NY: Springer New York), pp. 85–106.
- 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 γ t–Th17 Program. *J.I.* *195*, 1791–1803.
- Lazarevic, V., Chen, X., Shim, J.-H., Hwang, E.-S., Jang, E., Bolm, A.N., Oukka, M., Kuchroo, V.K., and Glimcher, L.H. (2011). T-bet represses TH17 differentiation by preventing Runx1-mediated activation of the gene encoding ROR γ t. *Nat Immunol* *12*, 96–104.

- Lee, J.S., Tato, C.M., Joyce-Shaikh, B., Gulen, M.F., Cayatte, C., Chen, Y., Blumenschein, W.M., Judo, M., Ayanoglu, G., McClanahan, T.K., et al. (2015). Interleukin-23-Independent IL-17 Production Regulates Intestinal Epithelial Permeability. *Immunity* 43, 727–738.
- Lee, Y., Awasthi, A., Yosef, N., Quintana, F.J., Xiao, S., Peters, A., Wu, C., Kleiweietfeld, M., Kunder, S., Hafler, D.A., et al. (2012). Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nat Immunol* 13, 991–999.
- Lee, Y.K., Turner, H., Maynard, C.L., Oliver, J.R., Chen, D., Elson, C.O., and Weaver, C.T. (2009). Late Developmental Plasticity in the T Helper 17 Lineage. *Immunity* 30, 92–107.
- Lexberg, M.H., Taubner, A., Albrecht, I., Lepenies, I., Richter, A., Kamradt, T., Radbruch, A., and Chang, H.-D. (2010). IFN- γ and IL-12 synergize to convert in vivo generated Th17 into Th1/Th17 cells. *Eur. J. Immunol.* 40, 3017–3027.
- Liang, J., Huang, H.-I., Benzatti, F.P., Karlsson, A.B., Zhang, J.J., Youssef, N., Ma, A., Hale, L.P., and Hammer, G.E. (2016). Inflammatory Th1 and Th17 in the Intestine Are Each Driven by Functionally Specialized Dendritic Cells with Distinct Requirements for MyD88. *Cell Reports* 17, 1330–1343.
- Lighvani, A.A., Frucht, D.M., Jankovic, D., Yamane, H., Aliberti, J., Hissong, B.D., Nguyen, B.V., Gadina, M., Sher, A., Paul, W.E., et al. (2001). T-bet is rapidly induced by interferon- in lymphoid and myeloid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 15137–15142.
- Lin, F., Meng, X., Guo, Y., Cao, W., Liu, W., Xia, Q., Hui, Z., Chen, J., Hong, S., Zhang, X., et al. (2019). Epigenetic initiation of the T_H 17 differentiation program is promoted by Cxxc finger protein 1. *Sci. Adv.* 5, eaax1608.
- Lyons, R.M. (1988). Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast-conditioned medium. *The Journal of Cell Biology* 106, 1659–1665.
- Ma, Q., Xing, C., Long, W., Wang, H.Y., Liu, Q., and Wang, R.-F. (2019). Impact of microbiota on central nervous system and neurological diseases: the gut-brain axis. *J Neuroinflammation* 16, 53.
- 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- β induces development of the TH17 lineage. *Nature* 441, 231–234.
- Manichanh, C. (2006). Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn’s disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* 55, 205–211.
- Mantovani, A., Cassatella, M.A., Costantini, C., and Jaillon, S. (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 11, 519–531.
- Marchesi, J.R., Adams, D.H., Fava, F., Hermes, G.D.A., Hirschfield, G.M., Hold, G., Quraishi, M.N., Kinross, J., Smidt, H., Tuohy, K.M., et al. (2016). The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut* 65, 330–339.
- Marie, J.C., Liggitt, D., and Rudensky, A.Y. (2006). Cellular Mechanisms of Fatal Early-Onset Autoimmunity in Mice with the T Cell-Specific Targeting of Transforming Growth Factor- β Receptor. *Immunity* 25, 441–454.
- Maxwell, J.R., Zhang, Y., Brown, W.A., Smith, C.L., Byrne, F.R., Fiorino, M., Stevens, E., Bigler, J., Davis, J.A., Rottman, J.B., et al. (2015). Differential Roles for Interleukin-23 and Interleukin-17 in Intestinal Immunoregulation. *Immunity* 43, 739–750.

- McCarron, M.J., and Marie, J.C. (2014). TGF- β prevents T follicular helper cell accumulation and B cell autoreactivity. *J. Clin. Invest.* *124*, 4375–4386.
- McDole, J.R., Wheeler, L.W., McDonald, K.G., Wang, B., Konjufca, V., Knoop, K.A., Newberry, R.D., and Miller, M.J. (2012). Goblet cells deliver luminal antigen to CD103⁺ dendritic cells in the small intestine. *Nature* *483*, 345–349.
- McGeachy, M.J., Bak-Jensen, K.S., Chen, Y., Tato, C.M., Blumenschein, W., McClanahan, T., and Cua, D.J. (2007). TGF- β and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain TH-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol* *8*, 1390–1397.
- Meyer zu Horste, G., Wu, C., Wang, C., Cong, L., Pawlak, M., Lee, Y., Elyaman, W., Xiao, S., Regev, A., and Kuchroo, V.K. (2016). RBPJ Controls Development of Pathogenic Th17 Cells by Regulating IL-23 Receptor Expression. *Cell Reports* *16*, 392–404.
- Meyer zu Horste, G., Przybylski, D., Schramm, M.A., Wang, C., Schnell, A., Lee, Y., Sobel, R., Regev, A., and Kuchroo, V.K. (2018). Fas Promotes T Helper 17 Cell Differentiation and Inhibits T Helper 1 Cell Development by Binding and Sequestering Transcription Factor STAT1. *Immunity* *48*, 556–569.e7.
- Mikhak, Z., Fleming, C.M., Medoff, B.D., Thomas, S.Y., Tager, A.M., Campanella, G.S., and Luster, A.D. (2006). STAT1 in Peripheral Tissue Differentially Regulates Homing of Antigen-Specific Th1 and Th2 Cells. *J Immunol* *176*, 4959–4967.
- Miyazawa, K., and Miyazono, K. (2017). Regulation of TGF- β Family Signaling by Inhibitory Smads. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *9*, a022095.
- Monin, L., and Gaffen, S.L. (2018). Interleukin 17 Family Cytokines: Signaling Mechanisms, Biological Activities, and Therapeutic Implications. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *10*, a028522.
- Monteleone, G. (2012). Role of Smad7 in inflammatory bowel diseases. *WJG* *18*, 5664.
- Monticelli, L.A., Osborne, L.C., Noti, M., Tran, S.V., Zaiss, D.M.W., and Artis, D. (2015). IL-33 promotes an innate immune pathway of intestinal tissue protection dependent on amphiregulin–EGFR interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* *112*, 10762–10767.
- Morrison, D.J., and Preston, T. (2016). Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes* *7*, 189–200.
- Muranski, P., and Restifo, N.P. (2013). Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *Blood* *121*, 2402–2414.
- Nakato, G., Hase, K., Suzuki, M., Kimura, M., Ato, M., Hanazato, M., Tobiume, M., Horiuchi, M., Atarashi, R., Nishida, N., et al. (2012). Cutting Edge: *Brucella abortus* Exploits a Cellular Prion Protein on Intestinal M Cells as an Invasive Receptor. *J.I.* *189*, 1540–1544.
- Nava, P., Koch, S., Laukoetter, M.G., Lee, W.Y., Kolegraff, K., Capaldo, C.T., Beeman, N., Addis, C., Gerner-Smidt, K., Neumaier, I., et al. (2010). Interferon- γ Regulates Intestinal Epithelial Homeostasis through Converging β -Catenin Signaling Pathways. *Immunity* *32*, 392–402.
- Neu, J., and Rushing, J. (2011). Cesarean Versus Vaginal Delivery: Long-term Infant Outcomes and the Hygiene Hypothesis. *Clinics in Perinatology* *38*, 321–331.
- Ng, K.M., Ferreyra, J.A., Higginbottom, S.K., Lynch, J.B., Kashyap, P.C., Gopinath, S., Naidu, N., Choudhury, B., Weimer, B.C., Monack, D.M., et al. (2013). Microbiota-liberated host sugars facilitate post-antibiotic expansion of enteric pathogens. *Nature* *502*, 96–99.

- Nicholson, J.K., Holmes, E., Kinross, J., Burcelin, R., Gibson, G., Jia, W., and Pettersson, S. (2012). Host-Gut Microbiota Metabolic Interactions. *Science* 336, 1262–1267.
- Niess, J.H. (2005). CX3CR1-Mediated Dendritic Cell Access to the Intestinal Lumen and Bacterial Clearance. *Science* 307, 254–258.
- Nurieva, R., Yang, X.O., Martinez, G., Zhang, Y., Panopoulos, A.D., Ma, L., Schluns, K., Tian, Q., Watowich, S.S., Jetten, A.M., et al. (2007). Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* 448, 480–483.
- Ogawa, A., Andoh, A., Araki, Y., Bamba, T., and Fujiyama, Y. (2004). Neutralization of interleukin-17 aggravates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Clinical Immunology* 110, 55–62.
- Ohno, H. (2016). Intestinal M cells. *J Biochem* 159, 151–160.
- Omenetti, S., Bussi, C., Metidji, A., Iseppon, A., Lee, S., Tolaini, M., Li, Y., Kelly, G., Chakravarty, P., Shoaie, S., et al. (2019). The Intestine Harbors Functionally Distinct Homeostatic Tissue-Resident and Inflammatory Th17 Cells. *Immunity* 51, 77-89.e6.
- Ottman, N., Smidt, H., de Vos, W.M., and Belzer, C. (2012). The function of our microbiota: who is out there and what do they do? *Front. Cell. Inf. Microbio.* 2.
- Panzer, M., Sitte, S., Wirth, S., Drexler, I., Sparwasser, T., and Voehringer, D. (2012). Rapid In Vivo Conversion of Effector T Cells into Th2 Cells during Helminth Infection. *J.I.* 188, 615–623.
- Park, I.-K., Shultz, L.D., Letterio, J.J., and Gorham, J.D. (2005). TGF- β 1 Inhibits T-bet Induction by IFN- γ in Murine CD4⁺ T Cells through the Protein Tyrosine Phosphatase Src Homology Region 2 Domain-Containing Phosphatase-1. *J Immunol* 175, 5666–5674.
- Parks, O.B., Pociask, D.A., Hodzic, Z., Kolls, J.K., and Good, M. (2016). Interleukin-22 Signaling in the Regulation of Intestinal Health and Disease. *Front. Cell Dev. Biol.* 3.
- Pesu, M., Watford, W.T., Wei, L., Xu, L., Fuss, I., Strober, W., Andersson, J., Shevach, E.M., Quezado, M., Bouladoux, N., et al. (2008). T-cell-expressed proprotein convertase furin is essential for maintenance of peripheral immune tolerance. *Nature* 455, 246–250.
- Pickard, J.M., Zeng, M.Y., Caruso, R., and Núñez, G. (2017). Gut microbiota: Role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. *Immunol Rev* 279, 70–89.
- Purvis, H.A., Stoop, J.N., Mann, J., Woods, S., Kozijn, A.E., Hambleton, S., Robinson, J.H., Isaacs, J.D., Anderson, A.E., and Hilkens, C.M.U. (2010). Low-strength T-cell activation promotes Th17 responses. *Blood* 116, 4829–4837.
- Qin, H., Wang, L., Feng, T., Elson, C.O., Niyongere, S.A., Lee, S.J., Reynolds, S.L., Weaver, C.T., Roarty, K., Serra, R., et al. (2009). TGF- β Promotes Th17 Cell Development through Inhibition of SOCS3. *J Immunol* 183, 97–105.
- Raetz, M., Hwang, S., Wilhelm, C.L., Kirkland, D., Benson, A., Sturge, C.R., Mirpuri, J., Vaishnava, S., Hou, B., DeFranco, A.L., et al. (2013). Parasite-induced TH1 cells and intestinal dysbiosis cooperate in IFN- γ -dependent elimination of Paneth cells. *Nat Immunol* 14, 136–142.
- Ribot, J.C., deBarros, A., Pang, D.J., Neves, J.F., Peperzak, V., Roberts, S.J., Girardi, M., Borst, J., Hayday, A.C., Pennington, D.J., et al. (2009). CD27 is a thymic determinant of the balance between interferon- γ - and interleukin 17-producing $\gamma\delta$ T cell subsets. *Nat Immunol* 10, 427–436.

- Rochereau, N., Drocourt, D., Perouzel, E., Pavot, V., Redelinguys, P., Brown, G.D., Tiraby, G., Roblin, X., Verrier, B., Genin, C., et al. (2013). Dectin-1 Is Essential for Reverse Transcytosis of Glycosylated SIgA-Antigen Complexes by Intestinal M Cells. *PLoS Biol* *11*, e1001658.
- Rubinstein, M.R., Wang, X., Liu, W., Hao, Y., Cai, G., and Han, Y.W. (2013). *Fusobacterium nucleatum* Promotes Colorectal Carcinogenesis by Modulating E-Cadherin/ β -Catenin Signaling via its FadA Adhesin. *Cell Host & Microbe* *14*, 195–206.
- Sano, T., Huang, W., Hall, J.A., Yang, Y., Chen, A., Gavzy, S.J., Lee, J.-Y., Ziel, J.W., Miraldi, E.R., Domingos, A.I., et al. (2015). An IL-23R/IL-22 Circuit Regulates Epithelial Serum Amyloid A to Promote Local Effector Th17 Responses. *Cell* *163*, 381–393.
- Schlenner, S.M., Weigmann, B., Ruan, Q., Chen, Y., and von Boehmer, H. (2012). Smad3 binding to the foxp3 enhancer is dispensable for the development of regulatory T cells with the exception of the gut. *J Exp Med* *209*, 1529–1535.
- Schraml, B.U., Hildner, K., Ise, W., Lee, W.-L., Smith, W.A.-E., Solomon, B., Sahota, G., Sim, J., Mukasa, R., Cemurski, S., et al. (2009). The AP-1 transcription factor Batf controls TH17 differentiation. *Nature* *460*, 405–409.
- Schulz, O., Jaensson, E., Persson, E.K., Liu, X., Worbs, T., Agace, W.W., and Pabst, O. (2009). Intestinal CD103⁺, but not CX3CR1⁺, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions. *J Exp Med* *206*, 3101–3114.
- Sefik, E., Geva-Zatorsky, N., Oh, S., Konnikova, L., Zemmour, D., McGuire, A.M., Burzyn, D., Ortiz-Lopez, A., Lobera, M., Yang, J., et al. (2015). Individual intestinal symbionts induce a distinct population of ROR γ + regulatory T cells. *Science* *349*, 993–997.
- Shi, H.Y., and Ng, S.C. (2018). The state of the art on treatment of Crohn's disease. *J Gastroenterol* *53*, 989–998.
- Shimizu, T., Marusawa, H., Endo, Y., and Chiba, T. (2012). Inflammation-mediated genomic instability: roles of activation-induced cytidine deaminase in carcinogenesis. *Cancer Sci* *103*, 1201–1206.
- Shnyreva, M., Weaver, W.M., Blanchette, M., Taylor, S.L., Tompa, M., Fitzpatrick, D.R., and Wilson, C.B. (2004). Evolutionarily conserved sequence elements that positively regulate IFN- γ expression in T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *101*, 12622–12627.
- Shull, M.M., Ormsby, I., Kier, A.B., Pawlowski, S., Diebold, R.J., Yin, M., Allen, R., Sidman, C., Proetzel, G., Calvin, D., et al. (1992). Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* *359*, 693–699.
- Singh, U.P., Singh, S., Singh, R., Cong, Y., Taub, D.D., and Lillard, J.W. (2008). CXCL10-Producing Mucosal CD4⁺ T Cells, NK Cells, and NKT Cells Are Associated with Chronic Colitis in IL-10^{-/-} Mice, Which Can Be Abrogated by Anti-CXCL10 Antibody Inhibition. *Journal of Interferon & Cytokine Research* *28*, 31–43.
- Smith, P.M., Howitt, M.R., Panikov, N., Michaud, M., Gallini, C.A., Bohlooly-Y, M., Glickman, J.N., and Garrett, W.S. (2013). The Microbial Metabolites, Short-Chain Fatty Acids, Regulate Colonic Treg Cell Homeostasis. *Science* *341*, 569–573.
- Song, X., Dai, D., He, X., Zhu, S., Yao, Y., Gao, H., Wang, J., Qu, F., Qiu, J., Wang, H., et al. (2015). Growth Factor FGF2 Cooperates with Interleukin-17 to Repair Intestinal Epithelial Damage. *Immunity* *43*, 488–501.

- Stritesky, G.L., Yeh, N., and Kaplan, M.H. (2008). IL-23 Promotes Maintenance but Not Commitment to the Th17 Lineage. *J Immunol* *181*, 5948–5955.
- Sugimoto, K., Ogawa, A., Mizoguchi, E., Shimomura, Y., Andoh, A., Bhan, A.K., Blumberg, R.S., Xavier, R.J., and Mizoguchi, A. (2008). IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J. Clin. Invest.* JCI33194.
- Suzuki, T. (2013). Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell. Mol. Life Sci.* *70*, 631–659.
- Suzuki, K., Ha, S., Tsuji, M., and Fagarasan, S. (2007). Intestinal IgA synthesis: A primitive form of adaptive immunity that regulates microbial communities in the gut. *Seminars in Immunology* *19*, 127–135.
- Tanaka, K., Martinez, G.J., Yan, X., Long, W., Ichiyama, K., Chi, X., Kim, B.-S., Reynolds, J.M., Chung, Y., Tanaka, S., et al. (2018a). Regulation of Pathogenic T Helper 17 Cell Differentiation by Steroid Receptor Coactivator-3. *Cell Reports* *23*, 2318–2329.
- Tanaka, S., Jiang, Y., Martinez, G.J., Tanaka, K., Yan, X., Kurosaki, T., Kaartinen, V., Feng, X.-H., Tian, Q., Wang, X., et al. (2018b). Trim33 mediates the proinflammatory function of Th17 cells. *J. Exp. Med.* jem.20170779.
- Teng, M.W.L., Bowman, E.P., McElwee, J.J., Smyth, M.J., Casanova, J.-L., Cooper, A.M., and Cua, D.J. (2015). IL-12 and IL-23 cytokines: from discovery to targeted therapies for immune-mediated inflammatory diseases. *Nat Med* *21*, 719–729.
- Tezuka, H., Abe, Y., Asano, J., Sato, T., Liu, J., Iwata, M., and Ohteki, T. (2011). Prominent Role for Plasmacytoid Dendritic Cells in Mucosal T Cell-Independent IgA Induction. *Immunity* *34*, 247–257.
- Thomas, D.A., and Massagué, J. (2005). TGF- β directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* *8*, 369–380.
- Travis, M.A., and Sheppard, D. (2014). TGF- β Activation and Function in Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* *32*, 51–82.
- Tsuji, M., Suzuki, K., Kitamura, H., Maruya, M., Kinoshita, K., Ivanov, I.I., Itoh, K., Littman, D.R., and Fagarasan, S. (2008). Requirement for Lymphoid Tissue-Inducer Cells in Isolated Follicle Formation and T Cell-Independent Immunoglobulin A Generation in the Gut. *Immunity* *29*, 261–271.
- Ueno, A., Jeffery, L., Kobayashi, T., Hibi, T., Ghosh, S., and Jijon, H. (2018). Th17 plasticity and its relevance to inflammatory bowel disease. *Journal of Autoimmunity* *87*, 38–49.
- Utech, M., Ivanov, A.I., Samarin, S.N., Bruewer, M., Turner, J.R., Mrsny, R.J., Parkos, C.A., and Nusrat, A. (2005). Mechanism of IFN- γ -induced Endocytosis of Tight Junction Proteins: Myosin II-dependent Vacuolarization of the Apical Plasma Membrane. *Molecular Biology of the Cell* *16*, 13.
- Van der Sluis, M., De Koning, B.A.E., De Bruijn, A.C.J.M., Velcich, A., Meijerink, J.P.P., Van Goudoever, J.B., Büller, H.A., Dekker, J., Van Seuningen, I., Renes, I.B., et al. (2006). Muc2-Deficient Mice Spontaneously Develop Colitis, Indicating That MUC2 Is Critical for Colonic Protection. *Gastroenterology* *131*, 117–129.
- Van der Waaij, D., Berghuis-de Vries, J.M., and Lekkerkerk-van der Wees, J.E.C. (1971). Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice. *J. Hyg.* *69*, 405–411.

- Vancamelbeke, M., and Vermeire, S. (2017). The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology* *11*, 821–834.
- Veglia, F., Perego, M., and Gabrilovich, D. (2018). Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nat Immunol* *19*, 108–119.
- Velcich, A. (2002). Colorectal Cancer in Mice Genetically Deficient in the Mucin Muc2. *Science* *295*, 1726–1729.
- Veldhoen, M., Hocking, R.J., Flavell, R.A., and Stockinger, B. (2006). Signals mediated by transforming growth factor- β initiate autoimmune encephalomyelitis, but chronic inflammation is needed to sustain disease. *Nat Immunol* *7*, 1151–1156.
- Veldhoen, M., Hirota, K., Westendorf, A.M., Buer, J., Dumoutier, L., Renault, J.-C., and Stockinger, B. (2008). The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* *453*, 106–109.
- Vivier, E., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N.J., Mebius, R.E., et al. (2018). Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell* *174*, 1054–1066.
- Wang, F., Graham, W.V., Wang, Y., Witkowski, E.D., Schwarz, B.T., and Turner, J.R. (2005). Interferon- γ and Tumor Necrosis Factor- α Synergize to Induce Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction by Up-Regulating Myosin Light Chain Kinase Expression. *Immunity* *22*, 11–21.
- Wang, K., Kim, M.K., Di Caro, G., Wong, J., Shalpour, S., Wan, J., Zhang, W., Zhong, Z., Sanchez-Lopez, E., Wu, L.-W., et al. (2014a). Interleukin-17 Receptor A Signaling in Transformed Enterocytes Promotes Early Colorectal Tumorigenesis. *Immunity* *41*, 1052–1063.
- Wang, Y., Godec, J., Ben-Aissa, K., Cui, K., Zhao, K., Pucsek, A.B., Lee, Y.K., Weaver, C.T., Yagi, R., and Lazarevic, V. (2014b). The Transcription Factors T-bet and Runx Are Required for the Ontogeny of Pathogenic Interferon- γ -Producing T Helper 17 Cells. *Immunity* *40*, 355–366.
- Wei, L., Laurence, A., Elias, K.M., and O’Shea, J.J. (2007). IL-21 Is Produced by Th17 Cells and Drives IL-17 Production in a STAT3-dependent Manner. *J. Biol. Chem.* *282*, 34605–34610.
- Wei, Y., Lu, C., Chen, J., Cui, G., Wang, L., Yu, T., Yang, Y., Wu, W., Ding, Y., Li, L., et al. (2017). High salt diet stimulates gut Th17 response and exacerbates TNBS-induced colitis in mice. *Oncotarget* *8*, 1111–1121.
- Winter, S.E., Winter, M.G., Xavier, M.N., Thiennimitr, P., Poon, V., Keestra, A.M., Laughlin, R.C., Gomez, G., Wu, J., Lawhon, S.D., et al. (2013). Host-Derived Nitrate Boosts Growth of *E. coli* in the Inflamed Gut. *Science* *339*, 708–711.
- Wipff, P.-J., Rifkin, D.B., Meister, J.-J., and Hinz, B. (2007). Myofibroblast contraction activates latent TGF- β 1 from the extracellular matrix. *J Cell Biol* *179*, 1311–1323.
- Worthington, J.J., Czajkowska, B.I., Melton, A.C., and Travis, M.A. (2011). Intestinal Dendritic Cells Specialize to Activate Transforming Growth Factor- β and Induce Foxp3⁺ Regulatory T Cells via Integrin α β 8. *Gastroenterology* *141*, 1802–1812.
- Worthington, J.J., Kelly, A., Smedley, C., Bauché, D., Campbell, S., Marie, J.C., and Travis, M.A. (2015). Integrin α β 8-Mediated TGF- β Activation by Effector Regulatory T Cells Is Essential for Suppression of T-Cell-Mediated Inflammation. *Immunity* *42*, 903–915.

- Wu, C., Yosef, N., Thalhamer, T., Zhu, C., Xiao, S., Kishi, Y., Regev, A., and Kuchroo, V.K. (2013). Induction of pathogenic TH17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1. *Nature* 496, 513–517.
- Wu, G.D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y.-Y., Keilbaugh, S.A., Bewtra, M., Knights, D., Walters, W.A., Knight, R., et al. (2011). Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. *Science* 334, 105–108.
- Wu, Q., Nie, J., Gao, Y., Xu, P., Sun, Q., Yang, J., Han, L., Chen, Z., Wang, X., Lv, L., et al. (2015). Reciprocal regulation of ROR γ t acetylation and function by p300 and HDAC1. *Sci Rep* 5, 16355.
- Xu, M., Pokrovskii, M., Ding, Y., Yi, R., Au, C., Harrison, O.J., Galan, C., Belkaid, Y., Bonneau, R., and Littman, D.R. (2018). c-MAF-dependent regulatory T cells mediate immunological tolerance to a gut pathobiont. *Nature* 554, 373–377.
- Yang, X.O., Pappu, B.P., Nurieva, R., Akimzhanov, A., Kang, H.S., Chung, Y., Ma, L., Shah, B., Panopoulos, A.D., Schluns, K.S., et al. (2008a). T Helper 17 Lineage Differentiation Is Programmed by Orphan Nuclear Receptors ROR α and ROR γ . *Immunity* 28, 29–39.
- Yang, X.O., Nurieva, R., Martinez, G.J., Kang, H.S., Chung, Y., Pappu, B.P., Shah, B., Chang, S.H., Schluns, K.S., Watowich, S.S., et al. (2008b). Molecular Antagonism and Plasticity of Regulatory and Inflammatory T Cell Programs. *Immunity* 29, 44–56.
- Yang, Y., Torchinsky, M.B., Gobert, M., Xiong, H., Xu, M., Linehan, J.L., Alonzo, F., Ng, C., Chen, A., Lin, X., et al. (2014). Focused specificity of intestinal TH17 cells towards commensal bacterial antigens. *Nature* 510, 152–156.
- Yatsunenkov, T., Rey, F.E., Manary, M.J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M.G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R.N., Anokhin, A.P., et al. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 486, 222–227.
- Yosef, N., Shalek, A.K., Gaublomme, J.T., Jin, H., Lee, Y., Awasthi, A., Wu, C., Karwacz, K., Xiao, S., Jorgolli, M., et al. (2013). Dynamic regulatory network controlling TH17 cell differentiation. *Nature* 496, 461–468.
- Yu, T., Guo, F., Yu, Y., Sun, T., Ma, D., Han, J., Qian, Y., Kryczek, I., Sun, D., Nagarsheth, N., et al. (2017). *Fusobacterium nucleatum* Promotes Chemoresistance to Colorectal Cancer by Modulating Autophagy. *Cell* 170, 548-563.e16.
- Zhang, Y.E. (2009). Non-Smad pathways in TGF- β signaling. *Cell Res* 19, 128–139.
- Zhang, D., Jin, W., Wu, R., Li, J., Park, S.-A., Tu, E., Zanvit, P., Xu, J., Liu, O., Cain, A., et al. (2019). High Glucose Intake Exacerbates Autoimmunity through Reactive-Oxygen-Species-Mediated TGF- β Cytokine Activation. *Immunity* S1074761319303279.
- Zhang, S., Takaku, M., Zou, L., Gu, A., Chou, W., Zhang, G., Wu, B., Kong, Q., Thomas, S.Y., Serody, J.S., et al. (2017). Reversing SKI–SMAD4-mediated suppression is essential for TH17 cell differentiation. *Nature* 551, 105–109.
- Zheng, Y., Danilenko, D.M., Valdez, P., Kasman, I., Eastham-Anderson, J., Wu, J., and Ouyang, W. (2007). Interleukin-22, a TH17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature* 445, 648–651.
- Zheng, Y., Valdez, P.A., Danilenko, D.M., Hu, Y., Sa, S.M., Gong, Q., Abbas, A.R., Modrusan, Z., Ghilardi, N., de Sauvage, F.J., et al. (2008). Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat Med* 14, 282–289.

Zhou, L., 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.

Zuo, T., and Ng, S.C. (2018). The Gut Microbiota in the Pathogenesis and Therapeutics of Inflammatory Bowel Disease. *Front. Microbiol.* 9, 2247.

Résumé en français :

Il y a 10 à 100 fois plus de microorganismes dans l'intestin que de cellules dans l'ensemble du corps humain. Ces microorganismes forment le microbiote, qui est essentiel à de nombreuses fonctions physiologiques de l'organisme comme la digestion. Il est cependant crucial que le microbiote reste compartimenté dans la lumière intestinale. Le système immunitaire intestinal (SII) a un rôle majeur dans le contrôle du microbiote, mais il peut aussi être à l'origine de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) comme la maladie de Crohn ou la colite ulcéreuse lorsqu'il réagit de façon excessive contre la flore intestinale. La cytokine immunosuppressive Transforming Growth Factor- β (TGF- β) empêche l'activation non contrôlée du SII contre le microbiote, et protège donc de l'apparition de MICI. Le TGF- β est également très impliqué dans la génération des lymphocytes T helper 17 (Th17), qui participent activement au maintien de l'homéostasie intestinale et au cloisonnement du microbiote. Cependant, le rôle du TGF- β dans la biologie des Th17 déjà différenciés n'est pas clair. Mes travaux ont montré qu'en absence de TGF- β , les Th17 perdent leur phénotype et deviennent des « Th1exTh17 » fortement inflammatoires, qui sont responsables de la mise en place d'une forte inflammation intestinale pouvant évoluer en cancer.

Mots clés: Th17, TGF- β , Th1, inflammation, intestin, microbiote

English abstract:

There are 10 to 100 more microorganisms in the gut than human cells in the whole organism. Those microorganisms form the microbiota, and they are crucial to some vital functions like digestion. However, it is required to prevent microbiota dissemination in the organism. The immune system is highly involved in the control and the compartmentation of the microbiota, but can also be involved in chronic inflammatory diseases of the gut such as Crohn's disease or ulcerative colitis when it reacts against the intestinal flora. The immunosuppressive cytokine Transforming Growth Factor- β (TGF- β) prevents from over-activation of the immune cells versus the microbiota, and so protects from chronic inflammatory diseases of the gut. TGF- β is also highly involved in Th17 generation, a subset of cells with major roles in microbiota control and maintenance of gut homeostasis. However, how TGF- β acts on already differentiated Th17 is still under investigation. My results demonstrate that TGF- β signaling in Th17 is required to maintain their lineage. In absence of TGF- β , Th17 switch to Th1 phenotype and produces important amount of inflammatory cytokines, leading to a strong inflammation of the gut that may promote cancer development.

Keywords: Th17, TGF- β , Th1, inflammation, gut, microbiota