

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie Santé
Spécialité : *Immunologie*

Par

Antoine FREUCHET

Etude de l'impact d'une déficience en interleukine-34 sur le développement et les réponses immunes.

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 18/12/2019
Unité de recherche : ITUN CRTI, UMR1064

Composition du Jury :

Pr. du jury : **Philippe BLANCOU**
Professeur des universités - Université Côte d'Azur, IPMC, Nice

Rapporteur : **Sylvaine YOU**
Chargée de recherche - Institut Cochin, U1016, Paris

Examinateur : **Christophe BLANQUART**
Chargé de recherche - CRCINA UMR1232, Nantes

Dir. de thèse : **Ignacio ANEGON**
Directeur de recherche - ITUN CRTI UMR1064, Nantes

Carole GUILLONNEAU
Directeur de recherche - ITUN CRTI UMR1064, Nantes

« Il n'y a pas de réussites faciles, ni d'échecs définitifs »

Marcel Proust

Remerciements

Tout d'abord, je souhaite remercier les rapporteurs de mon jury de thèse, le Dr. Sylvaine You et le Pr. Philippe Blancou d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse, pour leur temps, leur analyse et leur intérêt pour mon projet. Je remercie également le Dr. Christophe Blanquart pour son implication et sa participation à mon jury de thèse.

Je remercie également les membres du jury de mon comité de suivi de thèse, les Dr. Cristina Cuturi et Dr. Yves Delneste pour leur temps, leurs conseils et leurs remarques quant à mon projet.

Ensuite, je remercie mon directeur de thèse, le Dr. Ignacio Anegon pour son accueil dans l'équipe et sa disponibilité. Son exigence, sa rigueur et ses conseils m'ont permis de gagner en maturité tout au long de ces trois années.

Merci à ma co-directrice de thèse, le Dr. Carole Guillonnet de m'avoir fait confiance sur le projet IL-34 dès le master 2. Même si certains moments ont été difficiles, merci de m'avoir permis d'intégrer cette super équipe ! Je te remercie de ta disponibilité, de tes conseils et de tes remarques qui m'ont permis de gagner en confiance en moi et d'aiguiser mes compétences.

Ces trois années n'auraient pas été pareilles sans toutes les personnes de l'UMR 1064 ! Merci pour votre bonne humeur, vos blagues de couloir, vos conseils, vos échanges, vos sourires et j'en passe !

Je souhaite très sincèrement remercier Séverine B. pour tout ton temps accordé à mes (très très) nombreuses questions, parfois pertinentes, parfois non. A ton aide pour les calculs, pour les couleurs, pour ses précieux conseils techniques et scientifiques. Après trois années d'aide, je peux faire des calculs mentaux (mais pas trop compliqués non plus), des FACS multi couleurs, des tris simultanés sur les ARIA, écrire mon proto sur les vitres des PSM et bien d'autres. J'ai appris à allier efficacité et rapidité pour éviter les petites tapes sur la tête ! Il me manque le coup de talon sur le sol et la longue chevelure blonde.

Je souhaite également remercier chaleureusement Laetitia pour ta gentillesse, ta bonne humeur et tes blagues. Merci pour nos pauses à discuter sciences et de la vie, mais pas de la terre. Tu es un modèle dans la manipulation animale pour moi ! Je te remercie moins pour tes photos paparazzi non flatteuses.

Merci à la nouvelle recrue de la team IL-34, Apolline pour ta personnalité si gentille, si passionnée et si bienveillante. Tu as toujours proposé ton aide, soutenu et encouragé ! L'IL-34 est entre de très bonnes mains.

Je te remercie Lola, pour ta joie de vivre, tes petites blagues et tes petites fautes de français qui nous font rire !

Bien qu'ayant passé un bref moment avec nous, merci à toi Naïl pour ta bonne humeur et tes exploits de temps.

Je remercie bien évidemment les membres de la sous-équipe : Marine, Nadège, Juliette et Céline participant activement à cette super ambiance !

Je remercie également Justine pour l'organisation millimétrée de toutes les soirées ! Merci pour ta bonne humeur et ton rire communicatif !

Dans la continuité des personnalités espagnoles (mais bon tu es Andorain), merci Eros pour tes anecdotes sur la mythologie grecque, les dinosaures et tes phrases espagnoles tournées en français !

Je remercie Amandine pour ta bonne humeur à toute épreuve !

Merci à la team Bootlegger, Séverine B., JN, Laetitia, Léa, Delphine, Justine, Naïl, Lola, Guillaume, Eros, Mélanie L. et bien sûr Thomas et Kévin pour les nombreuses soirées passées dans cette grotte ! Mon compte en banque en a souffert, mais ça valait nettement le coup !

Ensuite, je remercie Laurence D. pour sa formation experte sur les FACS, je repars en ayant tellement appris sur ces petites machines parfois capricieuses ! Je te remercie pour ta bonne humeur, tes petits mots d'encouragement et ta compréhension. Tu fais partie des piliers indispensables du labo !

Merci au maître incontesté de la biologie moléculaire, Laurent T. ! J'ai comblé de nombreuses lacunes grâce à toi. Merci aussi pour tous tes jeux de mots recherchés qui font rire tout le monde !

Séverine R., je te remercie de m'avoir formé à l'électroporation (en association avec Malika), au prélèvement de cerveau (qui n'est pas si gore qu'il n'y paraît), à mes questions sur les saisines ainsi qu'au modèle d'EAE toujours dans une bonne ambiance !

Je remercie également toutes les personnes de l'animalerie Manu, Jean-Marc et Pierre de la bonne ambiance instaurée et du travail fourni au maintien de mes nombreux

animaux ! Merci à toi Claire de m'avoir formé aux différents gestes techniques dans une atmosphère détendue, pour tes conseils, tes petites astuces, tes petites anecdotes rigolotes, ta disponibilité ainsi que pour nos discussions amusées !

Merci à la personne qui a été une voisine (parfois très envahissante), une confidente, une voix de la sagesse, une pâtissière hors-pair, un puits de connaissances, Laure-Hélène (LHO pour les intimes). Pendant ces trois années, tu as été un soutien indispensable. Tu m'as permis d'apprendre de tes expériences, de prendre du recul, de gagner en confiance en moi, de m'informer des ragots du labo et me rendre compte que les Ficoll ne sont pas si faciles pour tout le monde. Il est vrai que je t'ai beaucoup chambré, mais tu me le rendais bien et surtout qui aime bien, châtie bien ! Tu as mis la barre très haute pour mes prochains voisins. PS : maintenant que ma thèse est finie, il va falloir annoncer à Léa que je suis ton préféré.

Bien que notre amitié soit partie sur la mauvaise voie après ta fausse accusation de vol de bureau, nous avons réussi à s'en tamponner le coquillard et enterrer la hache de guerre ! Tu as su identifier le vrai moi (je brise les rêves et les cœurs, mais j'ai bon fond promis). Après cet épisode, nous avons créé une des amitiés les plus importantes à mes yeux. Alors merci à toi Léa, pour ta personnalité de jobard, pour tes expressions rocambolesques, pour ton écoute, pour ton soutien, pour ton sens de l'orientation indispensable à ma survie au Japon, pour ta voix si douce à mes oreilles qu'elles en saignent, pour tes infusions aux odeurs de pisse de chat que tu fais partager dans le bureau, pour tes avis tranchés, pour nos concerts improvisés dans le bureau, pour Jordan Moore qui m'aura fait tellement rire et tous les autres moments à venir !

PS : tu es une personne merveilleuse ;).

Le trio infernal ne serait pas au complet sans toi Delphine ! Avec Léa, nous avons vécu de nombreuses péripéties. Je te remercie d'avoir été présente, de m'avoir soutenu, d'avoir été à l'écoute, d'être rigoureuse sur la sémantique, de m'avoir appris les caractéristiques de l'insuffisance cardiaque et surtout de m'avoir fait rire ! Merci des karaokés de folie, de nous avoir fait découvrir le Japon, de nous avoir partagé ton ski agressif, d'organiser des soirées mémorables, de nous fournir en IPP (parce qu'on a plus 20

ans), de ta passion survoltée et de ton optimisme à toute épreuve : c'est beau la folie. Sans oublier que grâce à toi, on sait où se trouve le Marlowe ! Et ça, c'est sacrément important.

Pour compléter la team des X-Men, merci à toi Aurélie F. de m'avoir fait découvrir les autres nombreux bars de Nantes que le Bootlegger, pour les discussions sur les non adaptés, pour tes flick d'ELISA a en réveiller les morts, pour les petites ballades de darons, pour tes bons plans concerts/ciné, pour tes expressions et pour tout le reste !

Toutes les trois, vous m'avez permis de prendre de recul dans les moments difficiles et surtout de me changer les esprits. Vous êtes des amies en or ! Bon courage à vous trois pour la fin, vous allez tout défoncer, personne ne peut vous stopper !

Notre amitié a débuté en Master, fraîchement débarquée de ta patrie bretonne, il nous a fallu peu de temps pour devenir amis. Merci à toi Ô Grande Déesse et Docteur, Mélanie L. ! Nous nous sommes suivis, encouragés, plaints, chambrés, et nous avons appris l'un de l'autre au cours de ces plusieurs années, toujours dans la bonne humeur. Comment allons-nous faire en post-doc si nous ne sommes plus dans la même ville ?? Merci aussi à Mél B. pour nos soirées avec Mél L. qui durent (quasiment) jusqu'au bout de la night et nos discussions enflammées !

Je tiens à remercier la personne qui a vécu avec moi mes débuts dans la recherche et le début de ma thèse, ma cagette et caribou Estelle. Je suis certain que nos 3 ans de colocation resteront gravés dans ma mémoire toute ma vie tellement c'était génial ! Nos petits apéros de gros bien (trop ?) arrosés suivis de repas digne de jour de fête, nos discussions sans fin, les visionnages des épisodes de confessions intimes à 2h du matin après nos soirées respectives, nos courses de darons, notre fameuse sortie plage, enfin bref chaque moment était vraiment chouette ! T'es un peu devenue une sœur pour moi !

Merci à Marion, Noémie et Nono pour leur soutien indéfectible pendant ces 3 dernières années à l'aide de bières, de BBQ et du voyage au pays des caribous ! C'était l'fun présentement !

Je remercie Alice et Cédric pour les verres, les chants, les jeux qui m'ont permis de me changer les idées surtout cette soirée du 14 juillet 2018 qui fut mémorable !

Je remercie également Ade, Flo et Coco pour leur soutien, leurs encouragements et leur compréhension. Vous êtes de chics amis !

Je remercie chaleureusement toute ma famille qui ont supporté mes humeurs parfois bonnes et souvent moins bonnes. Nos week-ends famille ont beaucoup aidé à ma stabilité mentale, alors merci à vous tonton Wilfrid, tonton Fabrice, tatate Patou et tatate Dridrine !

Merci à mes petits cousins et cousines de me rappeler que le temps passe et que mes 20 ans s'éloignent lentement mais sûrement. Profitez bien de vos années d'étudiant, ce sont les plus fun !

Merci à ma cousine et quasi sœur Noémie du temps passé ensemble, garde ta fraîcheur et ta spontanéité !

Je remercie du fond du cœur mes deux grands frères adorés Thomas et Simon pour leur soutien, leur intérêt et l'exemple que vous m'avez véhiculé depuis tout petit. Merci des moments passés ensemble avec mes belles sœurs Marion et Marine et mes petits neveux Lucas, Robin, Hugo et X (X ou Y) qui m'ont permis de changer d'air et de me ressourcer. Vous avez été un pilier nécessaire pendant ces trois ans. Ça y est, le petit dernier a fini ses études !

Papi et Mamie, en écrivant ces mots je pense fort à vous. Votre présence à ma soutenance m'aurait fait très plaisir.

Pour finir, je tiens à remercier les deux personnes sans qui tout ceci n'aurait été possible. Merci de m'avoir accompagné depuis le début, merci de m'avoir soutenu même si je n'ai pas toujours été très agréable et je m'en excuse, merci de vous être intéressé à ce sujet qui a fait plus que partie de ma vie pendant trois ans, merci d'avoir été des modèles d'honnêteté, de travail, de persévérance et surtout merci de toujours me pousser à aller plus loin. Merci à vous deux, papa et maman.

Abréviations	1
Liste des figures	1
Liste des tableaux	1
I. Introduction.....	1
II. L'interleukine-34, véritable représentante de la complexité des cytokines	1
1. Les cytokines, cheffes d'orchestre de la communication cellulaire	1
1.1. Le rôle des cytokines dans l'embryogénèse	2
1.2. Les cytokines, des facteurs solubles indispensables dans l'immunité	3
2. L'IL-34, bien plus qu'un analogue de CSF-1 dans la triade IL-34/CSF-1/CSF-1R.....	6
2.1. La découverte et structure de l'IL-34	6
2.2. Les récepteurs et voies de signalisation de l'IL-34 diffèrent du CSF-1	8
a. Le CSF-1R (CD115 ou M-CSFR), partagé avec le CSF-1.....	8
b. Le protéin-tyrosine phosphatase ζ (PTP ζ), un second récepteur de l'IL-34.....	10
c. Le CD138 ou Syndecan-1, un co-récepteur de CSF-1R modulant la biodisponibilité et fonction de l'IL-34	11
2.3. Le CSF-1, une cytokine aux fonctions définies	13
2.4. L'expression de l'IL-34	18
a. Son expression en conditions physiologiques	18
b. Les cellules T régulatrices, actrices de la tolérance périphérique	19
i. Les Tregs CD4 ⁺	22
ii. Les Tregs CD8 ⁺	25
iii. Les mécanismes d'action des cellules T régulatrices.....	28
2.5. Comparaison des modèles déficients en Il34, Csf1 et Csf1r.....	32
3. L'IL-34 et la lignée myéloïde.....	36
3.1. L'ontogénie des macrophages résidents, implication de l'IL-34 dès l'embryogénèse	36
3.2. Implication de l'IL-34 dans la différenciation et polarisation des macrophages à partir des monocytes.....	41
4. Régulation de l'IL-34.....	43
III. Les rôles biologiques de l'IL-34 dans les pathologies: une cytokine aux multiples facettes	44
1. L'IL-34 est exprimée dans de nombreuses pathologies	44
2. Les rôles de l'IL-34 dans le SNC à travers la génération/homéostasie de la microglie	46
2.1. Le rôle dichotomique de l'IL-34 dans les maladies neurologiques	46

a.	Les implications neuro-protectrices de l'IL-34	47
i.	La maladie d'Alzheimer	47
ii.	La sclérose en plaque	48
iii.	Le rétablissement de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique.....	50
b.	L'implication neurodégénérative de l'IL-34 dans la maladie d'Huntington	50
3.	Les rôles de l'IL-34 à travers la génération/homéostasie des cellules de Langerhans.....	51
4.	Les rôles de l'IL-34 à travers la génération de macrophages	53
4.1.	Le rôle néfaste de l'IL-34 dans les cancers via les TAM.....	53
4.2.	Les rôles de l'IL-34 dans les maladies auto-immunes	56
a.	L'implication délétère de l'IL-34 dans la polyarthrite rhumatoïde via les ostéoclastes	56
b.	Le lupus érythémateux systémique, un rôle de l'IL-34 à confirmer	59
c.	La participation néfaste de l'IL-34 dans le syndrome de Sjögren.....	61
d.	Les autres implications : psoriasis et sclérodémie systémique.....	62
4.3.	Les rôles de l'IL-34 dans les maladies inflammatoires.....	62
a.	L'effet délétère de l'IL-34 dans la parodontite via les ostéoclastes	63
b.	Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, le rôle de l'IL-34 est à élucider	64
c.	Une implication néfaste de l'IL-34 dans la maladie stéatosique non alcoolique du foie à travers la génération de fibrose.....	65
d.	Le rôle délétère de l'IL-34 dans l'ischémie/reperfusion	66
4.4.	Le rôle controversé de l'IL-34 en transplantation d'organe	67
4.5.	Récapitulatif de l'impact d'une déficience/blocage et injection d'IL-34/CSF-1 dans différents modèles animaux	70
4.6.	L'implication dichotomique de l'IL-34 dans les infections	72
a.	Les infections virales, un rôle de l'IL-34 à approfondir.....	72
b.	Les infections fongiques/bactériennes.....	73
4.7.	Le rôle régulateur de l'IL-34 à l'interface materno-fœtale.....	75
5.	Les rôles de l'IL-34 dans les maladies présentant des perturbations métaboliques	77
5.1.	La corrélation de l'IL-34 avec l'obésité	77
5.2.	Le diabète de type II, un rôle de l'IL-34 à éclaircir.....	77
6.	Le rôle de l'IL-34 dans les insuffisances cardiaques, une implication plus délétère dans les formes associées à une dysfonction rénale.....	78
7.	Récapitulatif des rôles principaux de l'IL-34 en conditions physiologiques et pathologiques .	79
	
Projet de recherche		81
Partie I - Critical role of the regulatory cytokine IL-34 in Treg function.		85

Résultats complémentaires.....	115
Partie II - Etude du potentiel de l'IL-34 comme marqueur prédictif en transplantation...	123
Discussion et perspectives	132
Bibliographie	144

Abréviations

AA : acide aminé
AKI : acute kidney injury (insuffisance rénale aigüe)
ALPS : autoimmune lymphoproliferative syndrome ou adult-onset leukoencephalopathy with axonal spheroids and pigmented glia
Arg : arginase
BHE- barrière hémato-encéphalique
CAR : chimeric antigen receptor
CCL : CC chemokine ligand
CHS : contact hypersensitivity
CKD : chronic kidney injury (insuffisance rénale chronique)
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
CPA : cellule présentatrice de l'antigène
CSC : cancer stem cell
CSF : colony stimulating factor
CSH : cellule souche hématopoïétique (ou HSC)
CXCL : CXC chemokine ligand
DAMP : damage-associated molecular pattern
EAE : encéphalomyélite auto-immune expérimentale
EMP : erythro-myeloid progenitors
ERK : extracellular Signal-regulated Kinase
FAK : focal adhesion kinase
FIRE : super enhancer *fms*-intronic regulatory element
FoxP3 : forkhead box P3
Gata-3 : Gata binding protein 3
GVHD : graft-versus-host-disease (maladie du greffon contre l'hôte)
GVL : graft-versus-leukemia
HBC : hepatitis B virus
HCC : hépatocarcinome cellulaire
HCV : hepatitis C virus
HIV : human immunodeficiency virus
HSC (foie) : hepatic stellate cells (cellules stellaires hépatiques)
IDO : indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase
IFN : interféron
IL : interleukine
ILC : innate lymphoid cell
IMC : indice de masse corporelle
iNOS : nducible T-cell COStimulator
IPEX : immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked
iTregs : induced Tregs
JNK : c-Jun N-terminal kinase
LC : cellule de Langerhans
M1 : macrophage de type 1 (pro-inflammatoire)
M2 : macrophage de type 2 (anti-inflammatoire)
MAPK : mitogen-activated protein kinase
mTEC : cellule épithéliale thymique médullaire

NAFLD : Non-alcoholic fatty liver disease (maladie non stéatosique non alcoolique du foie)
NF- κ B : Nuclear Factor Kappa B
NK : natural killer
NMDA : anti-N-methyl-D-aspartate
nTregs : natural Tregs
PAMP : pathogen-associated molecular patterns
pDC : cellule dendritique plasmacytoïde
PRR : pattern recognition receptor
PTP ζ : protein tyrosin phosphatase ζ
RANKL : receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
ROR γ t : retinoid-related orphan receptor
ROS : reactive oxygen species
SNC : système nerveux central
Stat : signal transducer and activator of transcription
T-bet : T-box-containing protein expressed in T cells
TAM : tumor associated macrophage
Tc : T cytotoxique
TCR : T cell receptor
TEC : cellule tubulaire épithéliale
Tfh : T follicular helper
TGF : transforming growth factor
Th : T helper
TLR : toll like receptor
TNF : tumor necrosis factor
TRAIL : tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand
Tregs : cellules T régulatrices
TSDR : Treg-specific demethylated region

Liste des figures

Figure 1: Différenciation des lymphocytes T CD4 ⁺ naïfs vers les différentes lignées selon le signal cytokinique.....	5
Figure 2: Différenciation des lymphocytes T CD8 ⁺ naïfs vers les différentes lignées selon le signal cytokinique.....	6
Figure 3: Représentation de la structure de l'IL-34 humaine sous forme dimérique (Ma et al., 2012c).....	7
Figure 4: Schéma représentant les voies de signalisation induites par l'interaction IL-34/CSF-1R (adapté de Zhou et al., 2016a).....	9
Figure 5: Représentation schématique des différences d'interactions entre IL-34/CSF-1R et CSF-1/CSF-1R (Felix et al., 2013).....	10
Figure 6: Schéma représentant les voies de signalisation induites par l'interaction IL-34/PTPζ au niveau du SNC (adapté de Zhou et al., 2016a).....	11
Figure 7: Schéma représentant l'interaction IL-34/CD138/CSF-1R en fonction du niveau d'expression de CD138 (Segaliny et al., 2015b).....	12
Figure 8: Schéma représentant les rôles principaux de CSF-1 dans l'homéostasie et dans les pathologies.	18
Figure 9: Schéma représentant la signalisation de CD45 et ses différentes isoformes (Rheinländer et al., 2018).	27
Figure 10: Schéma représentant les différents mécanismes d'action des Tregs CD8 ⁺ (Bézie et al., 2018b).	32
Figure 11: Représentation schématique de l'ontogénie des macrophages au cours de l'embryogénèse (adapté de Li and Barres, 2018)	39
Figure 12: Schéma représentant les stimuli d'induction des différents sous-types de macrophages et leurs phénotype/fonctions associés.	43
Figure 13: Schéma représentant les implications de l'IL-34 dans les pathologies du SNC... ..	51
Figure 14: Schéma représentant les implications de l'IL-34 dans les cancers (Baghdadi et al., 2017).....	56
Figure 15: Représentation schématique des rôles de l'IL-34 dans la polyarthrite rhumatoïde	59

Figure 16: Schéma représentant le rôle de l'IL-34 dans l'ischémie/reperfusion rénale (adapté de (Sanchez-Niño et al., 2016)).....	67
Figure 17: Schéma représentant le rôle de l'IL-34 dans le modèle d'allo-transplantation cardiaque chez le rat.	69
Figure 18: Schéma représentant les différents rôles de l'IL-34 dans les infections (adapté de Baghdadi et al., 2017).....	75
Figure 19: Représentation schématique des mécanismes d'induction d'un environnement tolérogène à l'interface materno-fœtale (Svensson-Arvelund et al., 2015).	76
Figure 20: Stratégie d'analyse des MNP et des cellules dendritiques du colon et l'iléon..	117
Figure 21 : La déficience en <i>Il34</i> impacte légèrement l'environnement de la rate et du foie ainsi que les MNP de l'iléon et du colon.....	118
Figure 22: Les Teff CD4 ⁺ des rats <i>Il34</i> ^{-/-} ne permettent pas d'induire la wasting disease. .	120
Figure 23 : Les Teff CD4 ⁺ des animaux <i>Il34</i> ^{-/-} présentent une diminution de l'expression des gènes <i>Junb</i> , <i>Srsf5</i> et <i>Zpf36</i>	120
Figure 24: Le taux sérique de CSF-1, à l'inverse de l'IL-34 permet de discriminer les patients ayant présenté un rejet des patients stables	126
Figure 25: A 3 mois, une plus forte expression d'IL-34 parmi les Tregs CD8 ⁺ CD45RC ^{low/-} semble être un facteur de bon pronostic dans une cohorte de patients greffés avec du sang placentaire..	128
Figure 26: Les rats <i>Il34</i> ^{-/-} semblent présenter une inflammation et une infiltration diminuée en réponse à l'Imiquimod par rapport aux rats <i>Il34</i> ^{+/+}	135
Figure 27: L'ajout de CSF-1 recombinant permet d'induire l'expression de CSF-1 par les monocytes de rat <i>Il34</i> ^{+/+}	136
Figure 28: Schéma bilan du rôle de l'IL-34 et de son potentiel d'utilisation.....	143

Liste des tableaux

Tableau I: Tableau regroupant les principales populations de cellules régulatrices, l'expression des principaux marqueurs et sécrétion de cytokines/molécules.....	21
Tableau II: Comparaison des modèles déficients en <i>Csf1r</i> , <i>Csf1</i> et <i>Il34</i> chez l'Homme, la souris et le rat	35
Tableau III: Tableau regroupant l'expression de l'IL-34 dans les différentes pathologies...	45
Tableau IV: Tableau récapitulatif de l'impact de l'injection/surexpression et d'une déficience/blocage de l'IL-34 et de CSF-1 dans différent modèle d'étude chez la souris et le rat.	71
Tableau V: Tableau récapitulatif des rôles principaux de l'IL-34 en conditions physiologiques et pathologiques.	80
Tableau VI: Liste des amorces utilisées.....	115
Tableau VII: Liste des anticorps utilisés.	117
Tableau VIII: Résumé des caractéristiques démographiques et cliniques des patients transplantés rénaux pour la quantification de l'IL-34.....	124
Tableau IX: Résumé des caractéristiques démographiques et cliniques des patients transplantés rénaux pour la quantification de CSF-1	125

I. Introduction

La notion d'immunité remonte au V^{ème} siècle av. J-C en Grèce grâce à l'historien Thucydides. La peste faisait rage à Athènes et il introduit le terme « immune » pour définir les personnes ayant survécu une première fois à la maladie et qui n'y succombaient plus par la suite. Plusieurs siècles plus tard différentes découvertes dont la variolisation par Edward Jenner (1798), la vaccination par Louis Pasteur (années 1880), la distinction entre l'immunologie cellulaire et humorale par Metchnikoff (fin des années 1800) et le modèle soi/non-soi par Burnet et Fenner (1949) ont permis de définir les bases de l'immunologie moderne. La découverte des cytokines est plus tardive, en 1957 Isaacs et Lindenmann identifient des « facteurs solubles » dont l'interféron de type I (IFN) capable d'interférer avec la réplication virale (Isaacs and Lindenmann, 1957). Puis, en 1969 Dumonde *et al.* proposent les appellations « lymphokines » et « monokines » selon leur origine cellulaire de sécrétion, lymphocytes ou monocytes/macrophages agissant sur l'immunité cellulaire comme facteurs de « communication » entre différentes cellules (Dumonde et al., 1969). C'est en 1974, suite à la découverte d'une sécrétion de ces facteurs solubles non restreinte au système immunitaire, que le terme « cytokine » est proposé (Cohen et al., 1974). Le développement de nouvelles techniques de biologie moléculaire dans les années 1980 aboutit aux premiers clonages de cytokines, tels que les IFNs définissant plus précisément ces cytokines : leurs récepteurs, leurs origines de sécrétion et leurs fonctions principales. Puis dans un second temps, le développement de techniques de quantification permet aux scientifiques d'adresser les différences d'expressions entre des conditions physiologiques et pathologiques (Feldmann, 2008). L'identification des cytokines apporte une nouvelle piste de recherche dans la compréhension de la communication intercellulaire notamment au niveau du système immunitaire.

II. L'interleukine-34, véritable représentante de la complexité des cytokines

1. Les cytokines, cheffes d'orchestre de la communication cellulaire

Aujourd'hui, les cytokines regroupent plus de 100 protéines ou glycoprotéines généralement de faible poids moléculaire (<30kDa) (Feldmann, 2008), divisées en six groupes : les interférons (IFN), les interleukines (IL), les chimiokines, les facteurs de

croissance, les facteurs de nécrose tumorale (TNF) et plus récemment les adipokines, chaque groupe rassemblant plusieurs cytokines partageant certaines fonctions. Les cytokines jouent un rôle important dans la communication intercellulaire et peuvent être divisées en deux grandes catégories selon leur action pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire. Mais selon le contexte donné, certaines cytokines ne sont pas régies par cette classification dichotomique notamment dans le cadre du système immunitaire. Par exemple, l'IFN γ est sécrété par les lymphocytes T CD4⁺, CD8⁺ et natural killer (NK) et agit comme médiateur dans la défense immunitaire via l'immunité innée et adaptative en participant, entre autres, à l'activation de macrophages pro-inflammatoires (Nathan et al., 1983; Murray, 2017). Mais différentes études ont mis en évidence que l'IFN γ était aussi exprimé par les cellules T régulatrices (Tregs) CD8⁺CD45RC^{low/-} et Tregs CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ et jouait un rôle protecteur en transplantation, dans le lupus érythémateux systémique ou encore dans le diabète (Mühl and Pfeilschifter, 2003; Guillonnet et al., 2007a; Thebault et al., 2007).

De par leurs actions pléiotropes, les cytokines sont impliquées dans de nombreux processus biologiques cruciaux dès le développement embryonnaire, dans l'homéostasie, l'activation et l'inhibition des systèmes immunitaires inné et adaptatif ainsi que dans les mécanismes du vieillissement (Dinarello, 2007).

1.1. Le rôle des cytokines dans l'embryogénèse

Lors de l'embryogénèse, l'embryon est hautement sensible aux cytokines notamment lors des phases d'implantation et de placentation. En effet, de nombreux leucocytes sont présents dans la muqueuse de l'endomètre et la sécrétion de cytokines par les cellules épithéliales telles que les *colony stimulating factors* (CSF), l'IL-34 (Lindau et al., 2018), le *transforming growth factor β* (TGF β) ou encore l'IL-10 favorisent la tolérance de l'embryon (Cheng and Sharma, 2015; Qiu et al., 2016). A l'inverse, un déséquilibre de la balance vers un environnement pro-inflammatoire, en particulier le TNF, l'IFN γ et le *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL), agit de façon néfaste sur l'embryon pouvant aboutir à un avortement spontané (Robertson et al., 2018). De façon intrinsèque à l'embryon, les cytokines jouent aussi un rôle clé dans le développement des différentes populations cellulaires. Les cytokines participent également au développement du système nerveux central dans lequel elles ont, entre autres, un rôle de neuro-protection en induisant la survie

des cellules ayant formé des connections, et à l'inverse déclenchant l'apoptose des cellules échouant à la formation de ces connections (Deverman and Patterson, 2009).

1.2. Les cytokines, des facteurs solubles indispensables dans l'immunité

Les cytokines orchestrent la mise en place de la réponse inflammatoire nécessaire à l'élimination du pathogène, tout en la modulant dans le but d'éviter une inflammation chronique délétère. Lorsqu'un pathogène pénètre dans l'organisme, l'immunité innée constitue la première ligne de défense. En particulier, les monocytes/macrophages et cellules dendritiques possèdent des *pattern-recognition receptors* (PRRs) à leur surface qui, lorsqu'ils reconnaissent des déterminants d'origine virale ou microbienne, agissent directement sur l'agent pathogène via la phagocytose ou indirectement par l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que les interférons (Brubaker et al., 2015). Ces cellules sont aussi nommées cellules présentatrices de l'antigène (CPA) et sont capables de présenter à leur surface des dérivés peptidiques du pathogène via le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Cette étape primaire d'activation est cruciale dans la mise en place de la réponse adaptative qui est fortement dépendante des cytokines. En effet, l'activation des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ naïfs est régie par trois signaux ; le premier représente la reconnaissance du complexe CMH/peptide présenté à la surface des CPA par le *T-cell receptor* (TCR). Puis le second, le signal de co-stimulation tel que la liaison du CD28 au CD80/CD86 des CPAs. Enfin le signal cytokinique, en plus de la force d'interaction avec le TCR (Boyton and Altmann, 2002), permet de différencier les cellules T naïves en lymphocytes T cytotoxiques (CTL) ou Tc1, Tc2, Tc17 et Tregs pour les T CD8⁺ et en *T helper* (Th)1, Th2, Th17, *T follicular helper* (Tfh) ou Tregs induits (iTregs) pour les T CD4⁺. Chacune des lignées est définie par l'environnement cytokinique et l'induction de facteur(s) de transcription.

Les lymphocytes T CD4⁺ helper ont un rôle indirect mais prépondérant dans la réponse immune via leur sécrétion de cytokines (**Figure 1**). Par exemple, sous l'action d'IFN γ et d'IL-12, les facteurs de transcription *signal transducer and activator of transcription* (Stat) 1 et Stat4 amorcent l'expression de *T-box-containing protein expressed in T cells* (T-bet) aboutissant à la différenciation des T CD4⁺ naïfs en Th1. Ces cellules expriment l'IFN γ et l'IL-12 et sont spécialisées dans l'immunité cellulaire contre les microorganismes intracellulaires et virus (Szabo et al., 2000). Les cellules Th2 sécrétrices d'IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 et IL-13 sont

impliquées dans la réponse humorale et l'immunité contre les parasites extracellulaires. Sous l'influence d'IL-4 et d'IL-33 (Murakami-Satsutani et al., 2014), plusieurs facteurs de transcription sont induits comme Stat3, Stat5 et Stat6 et activent *Gata binding protein 3* (Gata-3) permettant la différenciation en Th2 (Stritesky et al., 2011). Découverte plus récemment, les Th17 ont un rôle de protection dans la muqueuse intestinale via la sécrétion d'IL-17A/F, d'IL-21 et d'IL-22 (Wei et al., 2007). Une combinaison de TGF β , IL-6, IL-21 et IL-23 permet d'activer l'expression du facteur de transcription *retinoid-related orphan receptor* (ROR) γ t induisant la phosphorylation de Stat3 (Chen et al., 2007). Les lymphocytes B jouent aussi un rôle prépondérant dans la réponse adaptative en sécrétant des immunoglobulines (Ig) spécifiques de l'antigène. La commutation isotypique de ces cellules est induite par les *T follicular helper* (Tfh) différenciés grâce à l'IL-21 (Nurieva et al., 2008; Vogelzang et al., 2008). Les cytokines jouent un rôle crucial dans l'orchestration de la réponse immune, mais aussi dans sa modulation puisqu'une stimulation via le TCR des lymphocytes T CD4⁺ naïfs en présence de TGF β permet d'induire des iTregs. Ces Tregs différenciés en périphérie diffèrent des Tregs naturels (nTregs) générés dans le thymus (Chen et al., 2003). Des liens étroits de rétrocontrôles existent entre chacune des lignées maintenant la stabilité de la réponse immune et inversement à son déséquilibre pour enclencher les mécanismes de réparation tissulaire après une infection, ainsi que l'inhibition des cellules activées. En effet, l'IFN γ exprimé par les Th1 inhibe la capacité des Th2 à produire l'IL-4 et l'IL-5 (Wensky et al., 2001). Inversement l'IL-4 inhibe les Th1 par blocage de l'IFN γ (Wurtz et al., 2004). Néanmoins, un mauvais rétrocontrôle de ces boucles peut aboutir au développement de pathologies.

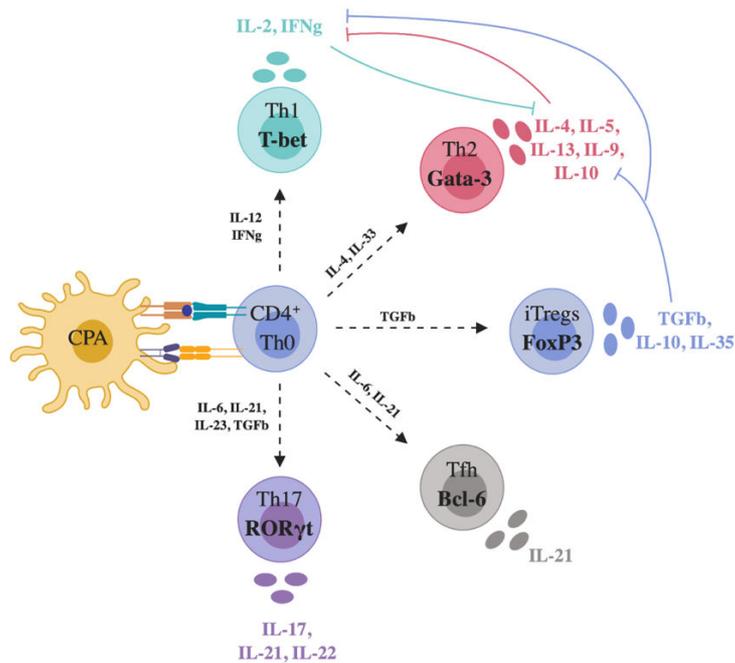


Figure 1: Différenciation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs vers les différentes lignées selon le signal cytokinique. CPA : cellule présentatrice de l'antigène ; Th : T helper ; Tfh, *T follicular helper*. ---▶ : différenciation ; —| : inhibition.

A la différence des lymphocytes T CD4⁺, les sous-populations de lymphocytes T CD8⁺ sont impliquées directement dans la lyse des cellules cibles grâce à leur TCR restreint au CMH-I, néanmoins leur différenciation induit des rôles différents en fonction des tissus (**Figure 2**). Les CTLs, activés via l'IL-12 ou les interférons de type I, agissent de façon directe via le relargage de granzyme et/ou de perforine ainsi que l'expression de *Fas ligand* lysant ainsi la cellule cible (Cox et al., 2011). Les Tc2 sont induites en présence d'IL-4 activant Gata-3, aboutissant à l'expression des cytokines IL-4, IL-5, IL-13 ainsi que de perforine et granzyme leur permettant de lyser la cible, mais de façon moindre que les CTL (Carter and Dutton, 1995). Un environnement où l'IL-6, l'IL-17 et le TGFβ sont présents permet d'induire des Tc17 caractérisés par l'expression des facteurs de transcription RORγt, Stat3 et IRF4 nécessaires à l'expression d'IL-17 et d'IL-21 (Liang et al., 2015). Enfin de manière similaire aux Tregs CD4⁺, les nTregs CD8⁺CD28⁺ émergent du thymus et expriment le TGFβ et l'IL-10 (Vuddamalay et al., 2016). Les iTregs CD8⁺ induits en périphérie par différents mécanismes dont l'utilisation de cytokines comme le TGFβ, l'IL-2 et l'IL-15 sécrètent différentes molécules immunosuppressives telles que l'IL-10, l'IL-34, l'IFNγ, le TGFβ ou le FGL2 (Gunnlaugsdottir et al., 2013; Bézie et al., 2018a, 2018b; Flippe et al., 2019a).

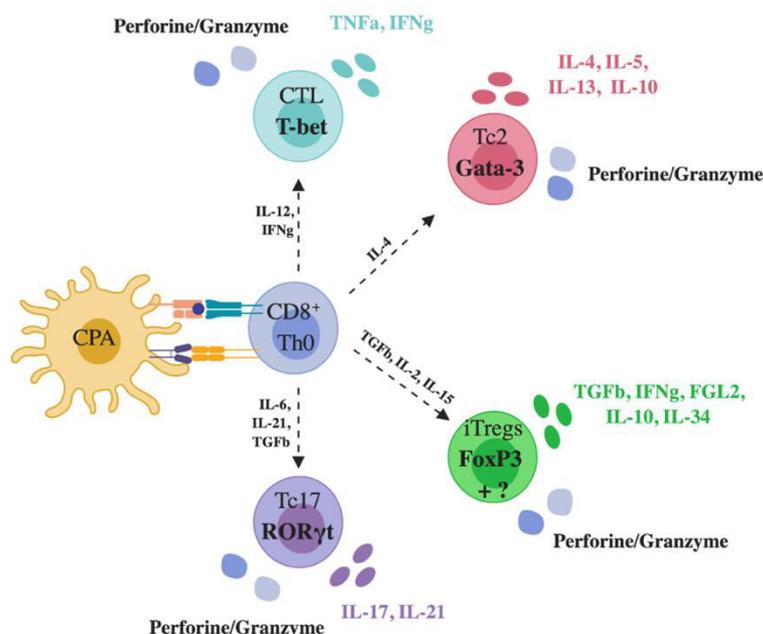


Figure 2: Différenciation des lymphocytes T CD8⁺ naïfs vers les différentes lignées selon le signal cytokinique. CPA : cellule présentatrice de l'antigène ; Th : T helper ; CTL : lymphocytes T cytotoxiques ; Tc : T cytotoxique. ---▶ : différenciation ; —| : inhibition.

En conclusion, les cytokines sont de formidables actrices de la communication aux fonctions vastes et régulées avec des boucles de rétroactions. De nombreuses cytokines partagent des fonctions communes, d'autres ont un rôle dichotomique selon le contexte démontrant la complexité du système biologique. Ce réseau peut aboutir en cas de dérégulation au développement d'inflammations chroniques. L'IL-34 est une cytokine représentant cette complexité, c'est pourquoi il est important de comprendre son rôle physiologique ainsi que ses implications dans les pathologies afin de pouvoir établir des stratégies thérapeutiques efficaces.

2. L'IL-34, bien plus qu'un analogue de CSF-1 dans la triade IL-34/CSF-1/CSF-1R

2.1. La découverte et structure de l'IL-34

En 2008, l'équipe de Lin *et al.* a réalisé une vaste étude dans le but d'identifier de nouvelles protéines et récepteurs impliqués dans les interactions cellulaires. Pour cela, environ 3400 ADNc codant pour des protéines sécrétées ou des domaines extracellulaires de protéines transmembranaires ont été transfectés dans les cellules 293T et analysés dans différents tests de réponse cellulaire. Après une analyse statistique, seuls 9 candidats ayant

la plus grande spécificité et sélectivité parmi lesquels figurent le CSF-1 (ou M-CSF) et l'IL-15, ont été retenus. L'attention a été portée sur une protéine encore non caractérisée : l'IL-34. Cette cytokine se fixe de façon spécifique aux monocytes humains CD14⁺ et induit leur survie/prolifération (Lin et al., 2008).

La séquence de l'IL-34 ne varie que d'un seul acide aminé (AA) par rapport à sa séquence hypothétique enregistrée dans la banque de données GenBank (C16orf77, NP_689669) et est conservée entre les espèces parmi tous les vertébrés, avec une similarité de la séquence humaine de 99,6%, 72% et 71% avec le chimpanzé, rat et souris respectivement (Garceau et al., 2010). Le gène humain *IL34* est situé sur le chromosome 16q22.1 entre deux gènes : les loci *Vac14* et *Snord111*, et de manière homologue chez le chimpanzé, le rat et la souris. De façon intéressante, la séquence ne présente aucun domaine ou motif consensus pouvant être retrouvés dans d'autres cytokines. L'IL-34 est une cytokine homodimérique de 242 AA chez l'Homme et 235 AA chez la souris d'une masse moléculaire de 39kDa par monomère (Lin et al., 2008). Chez l'Homme et la souris, les pré-ARN de l'*IL34* peuvent être épissés d'un codon CAG aboutissant à la formation de deux isoformes, avec ou sans une glutamine en position 81. Par ailleurs, l'isoforme ne présentant pas la glutamine (-Q81) est moins active *in vitro* (Wei et al., 2010a). Les études cristallographiques ont mis en évidence la présence de 2 feuillets β et de 6 hélices α (1-6) en formation antiparallèle et les hélices 1, 3, 4 et 6 forment la structure centrale à quatre hélices caractéristique des cytokines hélicoïdales (Ma et al., 2012c) (**Figure 3**). Par ailleurs, plusieurs N-glycosylations vitales pour la stabilité de la cytokine sont présentes sur les asparagines (Asn)76 et Asn100. La dimérisation se réalise via des interactions hydrophobes en formation « head-to-head » connectant la boucle α 1- β 1 et la boucle α 3- α 4 d'un autre monomère (Liu et al., 2012).

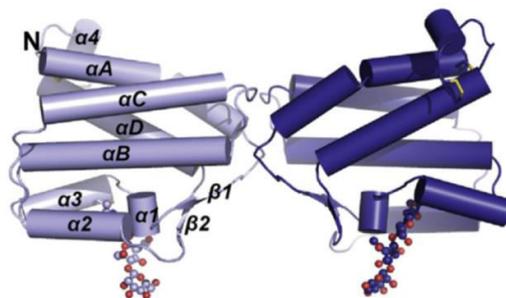


Figure 3: Représentation de la structure de l'IL-34 humaine sous forme dimérique (Ma et al., 2012c).

2.2. Les récepteurs et voies de signalisation de l'IL-34 diffèrent du CSF-1

a. Le CSF-1R (CD115 ou M-CSFR), partagé avec le CSF-1

Parallèlement à la découverte de l'IL-34, Lin *et al.* ont aussi identifié son récepteur le CSF-1R (CD115 ou M-CSFR) mettant en évidence un ligand alternatif au CSF-1. En effet, son blocage par un anticorps inhibe les effets de l'IL-34 sur la survie et la prolifération des monocytes (Lin *et al.*, 2008). CSF-1R est une glycoprotéine exprimée à la surface cellulaire encodée par le proto-oncogène *c-fms* ou *CSF1R* associée à une activité de tyrosine kinase (Sherr *et al.*, 1985). Exprimé de façon pléiotropique notamment par les monocytes/macrophages, les ostéoclastes, les cellules de Langerhans, la microglie et les cellules de Paneth, le CSF-1R est un régulateur important dans leur survie, leur prolifération et leur différenciation. Son expression a aussi été retrouvée au niveau des progéniteurs neuronaux, des neurones, des cellules de la lignée trophoblastique, des lymphocytes B, des cellules du muscle lisse, et des cellules épithéliales du rein et du colon (Stanley and Chitu, 2014; Guillonnet al., 2017a).

Les souris et rats déficients en *Csf1r* ont un phénotype sévère comprenant une absence de dents, un défaut en monocytes/macrophages, une ostéopétrose, un retard de croissance, une faible fertilité et espérance de vie et un défaut du squelette (Dai *et al.*, 2002; Pridans *et al.*, 2018). De manière intéressante, en comparaison à des souris déficientes en *Csf1*, les souris déficientes en *Csf1r* présentent des symptômes majoritairement similaires, mais l'ostéopétrose est plus sévère, ainsi que le défaut en macrophages, notamment en microglie et en cellules de Langerhans au niveau du système nerveux central et de la peau respectivement (Leonard *et al.*, 1974; Dai *et al.*, 2002). Ces résultats ont permis d'émettre l'hypothèse d'un second ligand aux fonctions indépendantes de CSF-1. De plus, une délétion du *super enhancer fms-intronic regulatory element* (FIRE) situé dans l'intron 2 induit une déficience en macrophages dans l'embryon, en microglie, et en macrophages résidents de la peau, du rein, du cœur et du péritoine. Chez ces souris, les monocytes et leurs progéniteurs n'expriment pas *Csf1r*, mais l'homéostasie des autres populations de macrophages n'est pas impactée. De manière intéressante, les souris déficientes en *FIRE* ne présentent aucun des symptômes ostéopétroriques, ni retard de croissance ou de fertilité présents chez les souris *Csf1r*^{-/-} (Rojo *et al.*, 2019).

La fixation d'un ligand sur CSF-1R induit une rapide dimérisation suivie d'une auto-phosphorylation de plusieurs tyrosine kinases dont Tyr807, Tyr559 et Tyr 544 situées sur le domaine cytoplasmique (**Figure 4**). Ces phosphorylations induisent le recrutement de protéines adaptatrices et d'autres kinases aboutissant à l'activation de plusieurs voies de signalisation dont *extracellular signal-regulated kinases* (ERK)1/2, Stat3, *focal adhesion kinase* (FAK), *protein kinase B* (PBK)/AKT et *nuclear Factor Kappa B* (NF-κB) permettant l'induction de la survie, la prolifération, la différenciation, l'angiogenèse, l'adhésion et la migration de la cellule cible (Chihara et al., 2010).

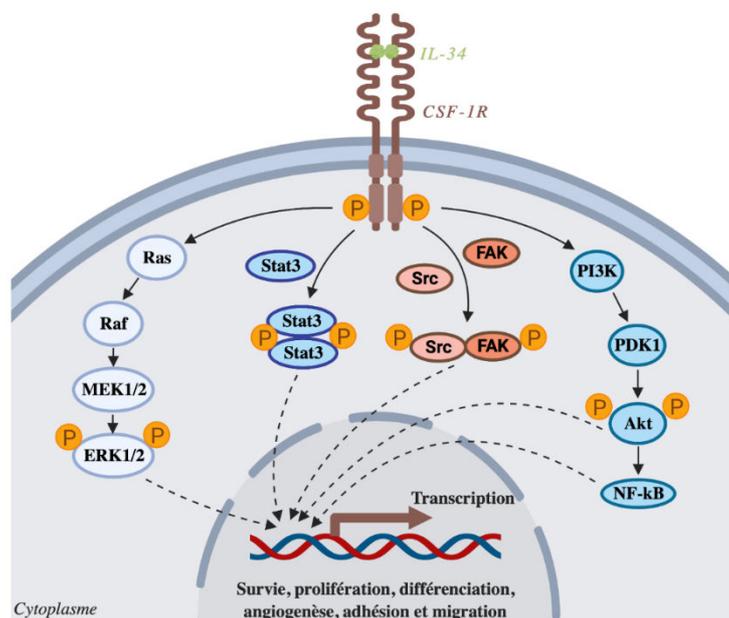


Figure 4: Schéma représentant les voies de signalisation induites par l'interaction IL-34/CSF-1R (adapté de Zhou et al., 2016a). P : phosphorylation.

L'IL-34 et le CSF-1 partagent le même récepteur, néanmoins des études cristallographiques ont montré que les fixations de l'IL-34 et du CSF-1 à ce récepteur sont différentes (**Figure 5**). D'une part, l'interaction IL-34/CSF-1R dépend d'acides aminés hydrophobes et de liaisons hydrogènes alors que l'interaction CSF-1/CSF-1R repose sur des liaisons salines, ainsi l'affinité de l'IL-34/CSF-1R est plus importante que l'interaction CSF-1/CSF-1R (Wei et al., 2010a; Liu et al., 2012). En effet la constante de dissociation de l'IL-34 est de 1 pM contre 34 pM pour le CSF-1 (Lin et al., 2008). Cette différence suggère que la fixation de l'IL-34 induit des signaux transmembranaires plus importants (Garceau et al., 2010). Ces différences induisent une activation différente en aval de CSF-1R. L'IL-34

phosphoryle plus intensément Tyr546 et Tyr699 tout comme FAK et *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) aboutissant à des différences entre les macrophages différenciés. De manière générale, les macrophages différenciés avec l'IL-34 ou le CSF-1 partagent un phénotype similaire, mais l'IL-34 induit des macrophages exprimant moins de CD54 et de *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1) et à l'inverse HLA-DR et eotaxin-2 sont plus exprimés par rapport à des macrophages différenciés avec le CSF-1 (Chihara et al., 2010). De plus, Boulakirba *et al.* ont mis en évidence que la fixation de l'IL-34 au CSF-1R présent à la surface des monocytes induit l'activation des caspases et des voies de signalisation de l'autophagie nécessaires à la différenciation des monocytes en macrophages (Boulakirba et al., 2018). Enfin de manière intéressante, l'équipe de Ségaliny *et al.* ont mis en évidence la capacité de l'IL-34 et du CSF-1 à former un hétérodimère se fixant sur CSF-1R induisant une signalisation intracellulaire plus forte et des effets sur la viabilité et la prolifération plus importants à faible dose (Ségaliny et al., 2015a). Des études supplémentaires sont nécessaires afin de comprendre ce nouveau rôle et son implication dans l'homéostasie cellulaire.

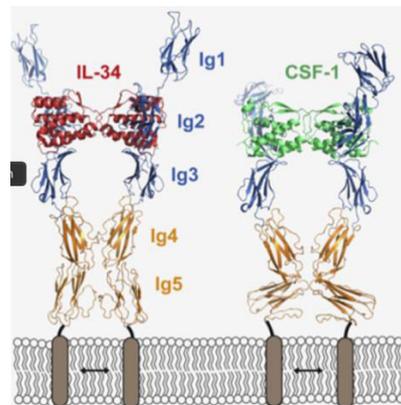


Figure 5: Représentation schématique des différences d'interactions entre IL-34/CSF-1R et CSF-1/CSF-1R (Felix et al., 2013).

b. Le *proteïn-tyrosine phosphatase* ζ (PTP ζ), un second récepteur de l'IL-34

En 2013, un second récepteur pour l'IL-34 (non partagé avec le CSF-1) a été identifié, le *proteïn-tyrosine phosphatase* ζ (PTP ζ) par l'équipe de Nandi *et al.* augmentant les fonctions possibles de l'IL-34. C'est un protéoglycane à base de sulfate de chondroïtine exprimé par différents types cellulaires comme les progéniteurs neuronaux, la glie, les

cellules de glioblastome (Nandi et al., 2013) ou encore par les lymphocytes B (Cohen et al., 2012), les cellules tubulaires du rein (Baek et al., 2015) ainsi que par les monocytes/macrophages mais à un plus faible niveau que CSF-1R (Zwicker et al., 2016). Une expression du transcrite au niveau du colon et de l'iléon a aussi été démontrée (Zwicker et al., 2015). En plus de l'IL-34, PTP ζ possède d'autres ligands comme le facteur de croissance pleiotrophin ou la protéine de la matrice extra-cellulaire tenascin-R. La fixation de l'IL-34 induit la phosphorylation de FAK, paxilline et *G protein-coupled receptor kinase interactor 1/Cool-associated, tyrosine phosphorylated-1* (GIT1/Cat-1) aboutissant à l'inhibition de la prolifération, de la clonogénicité et de la motilité de la lignée de glioblastome U251 (Nandi et al., 2013) (**Figure 6**). De par son expression préférentielle dans le système nerveux central et aberrante dans les glioblastomes, les lignées de glioblastomes humain U251 et de rat C6 sont des modèles tumoraux très fortement utilisés où PTP ζ est utilisé comme cible thérapeutique inhibant la croissance tumorale (Fujikawa et al., 2016, 2017). A noter que ces cellules expriment aussi le CSF-1R (De et al., 2016).

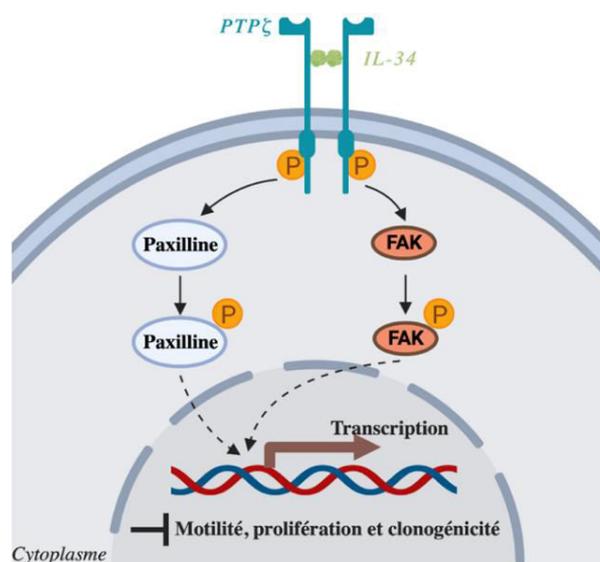


Figure 6: Schéma représentant les voies de signalisation induites par l'interaction IL-34/PTP ζ au niveau du SNC (adapté de Zhou et al., 2016a). P : phosphorylation.

c. Le CD138 ou Syndecan-1, un co-récepteur de CSF-1R modulant la biodisponibilité et fonction de l'IL-34

Dans une étude s'intéressant à la possibilité d'un autre récepteur de l'IL-34 modulant sa biodisponibilité et/ou ses fonctions, Ségaly et al. ont mis en évidence la fixation de l'IL-

34 de faible affinité au CD138 ou syndécan-1, et ceci de manière indépendante du CSF-1 (Segaliny et al., 2015a) (**Figure 7**). Syndécan-1 fait partie de la famille des protéoglycanes à base de chaînes de sulfate de chondroïtine et de sulfate d'héparane et est principalement exprimé par les cellules épithéliales (Saunders et al., 1989), les plasmocytes ou les cellules cancéreuses (Teng et al., 2012). Les facteurs de croissance sont les ligands principaux des syndécans (Kresse and Schönherr, 2001) qui peuvent réguler leur activité en influençant leur stabilité, leur conformation, leur oligomérisation ou leur compartimentalisation. Les syndécans agissent comme co-récepteurs catalysant la fixation entre un ligand et son récepteur et sont impliqués dans de nombreux processus biologiques dont la chimiotaxie cellulaire et l'adhésion cellulaire. Bien qu'étant impliqué dans de nombreux processus cruciaux, les souris déficientes en syndécan-1 ne présentent pas de symptômes sévères à l'état basal, mais l'induction d'une pathologie chez ces souris aboutit à des conséquences dramatiques mettant en évidence ses rôles dont la résolution de l'inflammation et le remodelage de la matrice extra-cellulaire (Teng et al., 2012).

Ségaliny *et al.* ont identifié une faible expression de CD138 par les macrophages de type M2a. CD138 agit comme co-récepteur de CSF-1R, ainsi la fixation de l'IL-34 module la signalisation en aval de CSF-1R induisant la migration des cellules myéloïdes. En effet, en plus des voies induites via le CSF-1R, la phosphorylation de Tyr223 est augmentée, laquelle est associée aux voies de signalisation impliquées dans la migration cellulaire (Segaliny et al., 2015a). Une faible expression de CD138 permet de moduler la biodisponibilité de l'IL-34 en la séquestrant limitant son action sur CSF-1R. A l'inverse une forte expression du co-récepteur CD138 va induire une signalisation plus importante de CSF-1R pouvant expliquer les différences d'intensité de signalisation entre IL-34 et le CSF-1.

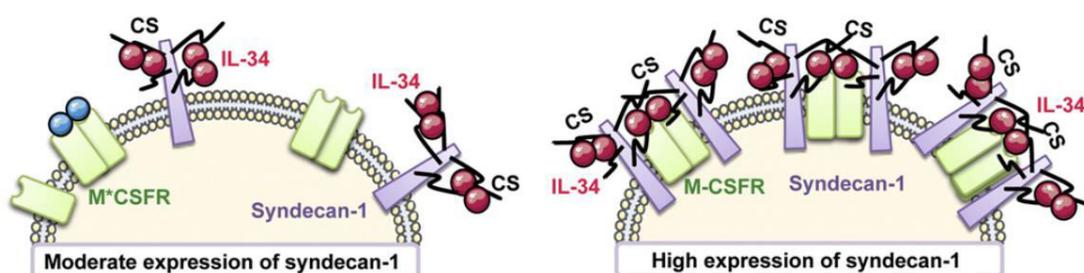


Figure 7: Schéma représentant l'interaction IL-34/CD138/CSF-1R en fonction du niveau d'expression de CD138 (Segaliny et al., 2015b). CS : sulfate de chondroïtine.

2.3. Le CSF-1, une cytokine aux fonctions définies

Le CSF-1, découvert en 1980, partage avec l'IL-34 le récepteur CSF-1R dont le rôle et les fonctions sont mieux définies. Le CSF-1 appartient aux CSF connus comme stimulant la production des granulocytes et macrophages à partir des précurseurs hématopoïétiques *in vitro* (Das et al., 1980). Selon leur cible, quatre différentes sous classes ont aujourd'hui été identifiées : le CSF-1, le *granulocyte macrophage-CSF* (GM-CSF), le *granulocyte-CSF* (G-CSF) et le *multipotential-CSF* ou IL-3 (Metcalf, 2013).

Situé sur le chromosome 1p13.3 chez l'Homme, sur le chromosome 3 chez la souris et 2 chez le rat (Chockalingam and Ghosh, 2014), trois différentes isoformes de CSF-1 actives sous forme dimérique ont été identifiées selon l'épissage alternatif et les modifications post-traductionnelles : une isoforme prédominante sous forme de protéoglycane sécrétée, une glycoprotéine sécrétée et une forme ancrée à la surface cellulaire (Shadle et al., 1989; Pandit et al., 1992).

A la différence de l'IL-34, le CSF-1 est exprimé de manière constitutive par les fibroblastes, les cellules endothéliales, les cellules stromales, les macrophages, les cellules du muscle lisse et les ostéoblastes. Le CSF-1 induit, via son récepteur CSF-1R, la différenciation des macrophages à partir de leurs précurseurs hématopoïétiques ainsi que leur survie et prolifération (Hamilton, 2008). Le CSF-1 agit principalement sur les cellules de la lignée trophoblastique et les cellules hématopoïétiques du compartiment monocytaire (Sasmono and Williams, 2012), mais l'expression de son récepteur étant plus large, le CSF-1 peut aussi agir sur les cellules de Paneth de l'intestin grêle (Huynh et al., 2009, 2013), les cellules neuronales (Nandi et al., 2012) ainsi que les cellules épithéliales tubulaires du rein (Menke et al., 2009a). La régulation de CSF-1 dans des conditions homéostatiques est réalisée via l'endocytose du complexe CSF-1/CSF-1R (Bartocci et al., 1987).

L'étendu du rôle de CSF-1 dans le développement et l'homéostasie des macrophages a été mis en évidence, en partie, grâce aux études des souris *op/op* qui présentent une mutation dans la région codante du gène *Csf1* aboutissant à une expression nulle de cette cytokine (Wiktor-Jedrzejczak et al., 1990; Yoshida et al., 1990) (**Figure 8**). L'impact de cette déficience est pléiotrope, la conséquence majeure est un phénotype ostéopétrotique dû à une déficience en ostéoclastes bien que spontanément corrigée avec l'âge via les facteurs de croissance vasculaires endothéliaux (Begg and Bertoncello, 1993; Niida et al., 1999). Le rôle

de CSF-1 dans l'ostéoclastogénèse a aussi été étudié chez le rat grâce à la souche tl/tl présentant un décalage du cadre de lecture spontané dans la séquence *Csf1* aboutissant à une absence d'expression transcriptionnelle et protéique (Cotton and Gaines, 1974). Malgré une déficience en *Csf1* similaire à la souris op/op, le rat tl/tl (déficient en *Csf1*) présente un phénotype ostéopétrotique plus sévère et non corrigé avec l'âge. Mais l'injection de CSF-1 recombinant permet de corriger la majorité des symptômes (Wesenbeeck et al., 2002) via l'induction de l'ostéoclastogénèse en association au receptor activator of *nuclear factor* κ -*B* *ligand* (RANKL) (Weir et al., 1996). Les souris op/op présentent aussi une déficience des dents, un retard de croissance accompagné d'une faible prise de poids, un défaut de fertilité, des anomalies du squelette, neurologiques ainsi qu'un important défaut en monocytes/macrophages résidents, cellules dendritiques, cellules de Kupffer et microglie (Wiktor-Jedrzejczak et al., 1982; Felix et al., 1990; Chitu and Stanley, 2006). De manière intéressante la déficience en cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) et en cellules dendritiques CD11c^{high} est expliquée par leur expression du récepteur *Csf1r* (MacDonald et al., 2005). Confirmé par une étude *in vitro*, le CSF-1 est capable de différencier les pDC et cellules dendritiques CD11c^{high} à partir de précurseurs de la moelle osseuse (Fancke et al., 2008).

Le CSF-1 est capable d'induire des macrophages de type 2 *in vitro*. Néanmoins certaines études considèrent que le CSF-1 permet d'induire des macrophages M0 qui selon l'environnement cytokinique seront polarisés en macrophages de type 1 (M1 : pro-inflammatoire) ou de type 2 (M2 : anti-inflammatoire) (Murray et al., 2014). CSF-1 a premièrement été décrit comme un facteur d'expansion des cellules monocytaires chez la souris (Hume et al., 1988), le rat (Ulich et al., 1990), le primate non humain (Munn et al., 1990) et l'Homme (VandePol and Garnick, 1991). Puis l'équipe de Verreck *et al.* a étudié le phénotype des monocytes différenciés par le CSF-1. Les macrophages acquièrent un phénotype de type M2 incluant une expression élevée d'IL-10, de *C-C motif chemokine ligand 2* (CCL2 ou MCP-1) et de CD163 et au contraire une expression plus faible de CD86 et de HLA-DR et quasi nulle d'IL-12 et d'IL-23 inhibant ainsi la réponse Th1 (Fleetwood et al., 2007). Les macrophages induits par le CSF-1 expriment aussi des cytokines telles que l'IL-8, le CCL5 (ou RANTES), le CCL3 (ou MIP-1 α), le CCL4 (ou MIP-1 β), le *C-X-C motif chemokine ligand 10* (CXCL10 ou IP-10) et les marqueurs *toll like receptor 2* (TLR2) et TLR4, leur permettant de recruter les cellules sur le lieu de l'infection afin d'exercer une activité de

phagocytose (Verreck et al., 2004, 2006). Des études suggèrent que le CSF-1 permet de maintenir l'homéostasie via un mécanisme de résistance où le milieu doit être suffisamment concentré en cytokines pro-inflammatoires (GM-CSF par exemple) pour surpasser l'effet du CSF-1. En effet, à l'état basal les macrophages ont plus de chance d'être exposés au CSF-1 qu'à des cytokines pro-inflammatoires favorisant un environnement tolérogène (Fleetwood et al., 2007; Hamilton, 2008). Cette fonction de maintien de l'état homéostatique suggère que les macrophages différenciés par le CSF-1 permettent d'éviter l'activation anarchique du système immunitaire.

De par son rôle dans la survie, la prolifération, la différenciation et l'activation des macrophages, le CSF-1 a été étudié dans différentes pathologies inflammatoires, auto-immunes et cancers.

La contribution de CSF-1 dans le développement du lupus néphrétique a été mise en évidence grâce au modèle murin MRL-Fas^{lpr}. Les cellules tubulaires épithéliales (TEC) rénales expriment fortement le CSF-1 et le taux sérique de cette cytokine corrèle avec le développement de la maladie (Yui et al., 1991; Menke et al., 2009b, 2009a). De plus, les souris *op/op*, déficientes en *Csf1* sont résistantes au développement du lupus néphrétique (Lenda et al., 2004) alors que l'injection de CSF-1 induit un développement plus rapide et sévère du lupus. Au niveau rénal, le CSF-1 induit le recrutement de monocytes différenciés en macrophages qui vont détruire les TEC par apoptose (Menke et al., 2009b). Chez l'Homme, une expression élevée de CSF-1 corrèle aussi positivement avec le développement du lupus (Menke et al., 2015), ainsi qu'avec l'infiltration et la prolifération des macrophages intra-glomérulaires chez les patients souffrant de glomérulonéphrite (Matsuda et al., 1996). Cependant dans un autre modèle de lupus chez la souris NZB/W F1 développant un lupus accéléré via une surexpression d'IFN α , le blocage du CSF-1 par un anticorps n'a aucun effet sur la cinétique et sévérité de la pathologie (Lin et al., 2019). Le CSF-1 est aussi associé à la polyarthrite rhumatoïde. En effet chez le rat l'injection de cette cytokine induit une pathologie plus sévère (Abd et al., 1991). De plus, les souris déficientes en CSF-1 sont résistantes à l'induction de cette pathologie confirmant l'implication du CSF-1 (Campbell et al., 2000) (**tableau IV, p71**). Chez les patients, le taux de CSF-1 est aussi plus élevé, il est exprimé par les fibroblastes synoviaux et en association RANKL, le CSF-1 induit des ostéoclastes détruisant l'os à partir des macrophages CD14⁺ présents dans le liquide synovial (Danks et al., 2002).

L'implication de CSF-1 dans le cadre des cancers a aussi été mis en évidence. En effet, chez l'Homme, CSF-1 est un marqueur du carcinome mammaire, ovarien, de l'endomètre (Kacinski, 1995), pulmonaire (Baghdadi et al., 2018a), hépatique (Budhu et al., 2006) et des cellules géantes téno-synoviales (Cupp et al., 2007). Dans ce cadre, le CSF-1 participe au recrutement, à la survie, à la prolifération des *tumor-associated macrophages* (TAM) vers un phénotype immunosuppresseur grâce au *leukemia inhibitory factor* (LIF) et l'IL-6 (Duluc et al., 2007). Ces cellules sont l'une des populations majoritaires du microenvironnement tumoral et participent à la croissance tumorale ainsi qu'à la malignité de la tumeur (Pyonteck et al., 2013; Noy and Pollard, 2014). Une étude sur les souris op/op menée par Lin *et al.* a mis en évidence que l'absence de CSF-1 n'avait pas d'effet sur la croissance de la tumeur mammaire primaire, mais que le CSF-1 était impliqué dans le développement de métastases pulmonaires via le recrutement de macrophages (Lin et al., 2001) (**tableau IV, p71**). L'équipe de Foucher *et al.* a mis en évidence que les macrophages différenciés avec le CSF-1 permettait d'induire des macrophages de phénotype M2 similaires aux TAM. Ces macrophages sont capables d'inhiber la prolifération de lymphocytes allogéniques de la même manière que des macrophages différenciés avec l'IL-34, et ceci à l'inverse de macrophages polarisés avec le GM-CSF de phénotype M1 (Foucher et al., 2013). Dans les épanchements pleureux des patients atteints de mésothéliome, les monocytes sont recrutés sous l'influence de CCL2 et de fortes concentrations de CSF-1 sont retrouvées. Cette cytokine permet, de façon indépendante de l'IL-34, d'induire des macrophages de type 2 CD14^{high}CD163^{high} favorisant l'environnement pro-tumoral (Chéné et al., 2016). C'est pourquoi de nombreux essais cliniques utilisent des inhibiteurs de CSF-1R ou des anticorps bloquants anti-CSF-1 dans le cadre de cancer pour limiter la progression tumorale et augmenter la survie. Les anticorps anti-CSF-1 sont en cours d'essai dans les cancers à cellules géantes (NCT01643850), dans les cancers à tumeurs solides (NCT02554812) ou dans les mélanomes (NCT02807844) par exemple (Cannarile et al., 2017). Dans d'autres études, le CSF-1 est bénéfique. En effet, l'administration de CSF-1 est utilisée dans la prévention des métastases de mélanome de phase I (Cole et al., 1994). Dans le cadre du glioblastome, une forte expression de CSF-1 est un facteur de bon pronostic (Serão et al., 2011).

En transplantation, le rôle de CSF-1 reste à élucider. En effet, l'administration d'un anticorps bloquant dirigé contre le CSF-1 réduit l'accumulation et la prolifération des macrophages lors d'une allo-transplantation rénale chez la souris (Jose et al., 2003). Lors d'

une greffe de moelle osseuse allogénique murine, l'injection de CSF-1 augmente le rejet via la stimulation de monocytes et l'activité des cellules NK (Blazar et al., 1992). De plus dans une greffe de peau xénogénique d'un rat donneur vers une souris op/op receveuse, le rejet est retardé (Zhao et al., 2003) suggérant que le CSF-1 est impliqué dans le rejet. Mais dans un contexte de greffe de peau allogénique murine, l'injection d'une forte dose de CSF-1 retarde le rejet via l'inhibition de cytokines pro-inflammatoires (Nishina et al., 2004). De manière similaire, un prétraitement avec du CSF-1 des souris receveuses de cellules hématopoïétiques allogéniques induit l'expansion de macrophages et réduit la prolifération des lymphocytes T du donneur aboutissant à une maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) diminuée (Hashimoto et al., 2011). Ces études suggèrent que le rôle prépondérant de CSF-1 serait de maintenir l'homéostasie des macrophages, mais lors d'une surexpression, CSF-1 pourrait agir sur ces macrophages en les polarisant vers un profil M2 bénéfique en transplantation. En effet, dans un modèle d'allotransplantation cardiaque chez la souris, une déficience en *Csf1* rompt la tolérance médiée par le blocage de la voie de co-stimulation CD40-CD40L. Fonctionnellement, dans ce modèle, CSF-1 est produit par les neutrophiles et permet la génération de M2 inhibant la prolifération des CTL (Braza et al., 2018) (**tableau IV, p71**). De plus, suite au blocage de la voie de co-stimulation CD40-CD40L induisant une tolérance à l'allotransplantation cardiaque chez la souris, des macrophages DC-SIGN⁺ s'accumulent intra-greffon sous la dépendance de CSF-1. Ces macrophages induisent alors un environnement tolérogène via l'inhibition des CTL et l'expansion des Tregs CD4⁺FoxP3⁺ (Conde et al., 2015). Riquelme *et al.* ont démontré que CSF-1 en association à l'IFN γ permettait d'induire des macrophages au phénotype régulateur chez la souris différents des macrophages décrits. Ces macrophages inhibent la prolifération des lymphocytes T *in vitro* de façon dépendante d'*inducible nitric oxide synthase* (iNOS) et prolongent la survie d'allogreffe cardiaque (Riquelme et al., 2012). C'est pourquoi les macrophages différenciés avec le CSF-1 et l'IFN γ à partir de monocytes humains CD14⁺ sont actuellement en phase I/II de l'essai clinique de la One Study « ONEmreg12 » (clinicaltrials.gov: NCT02085629) (Broichhausen et al., 2012).

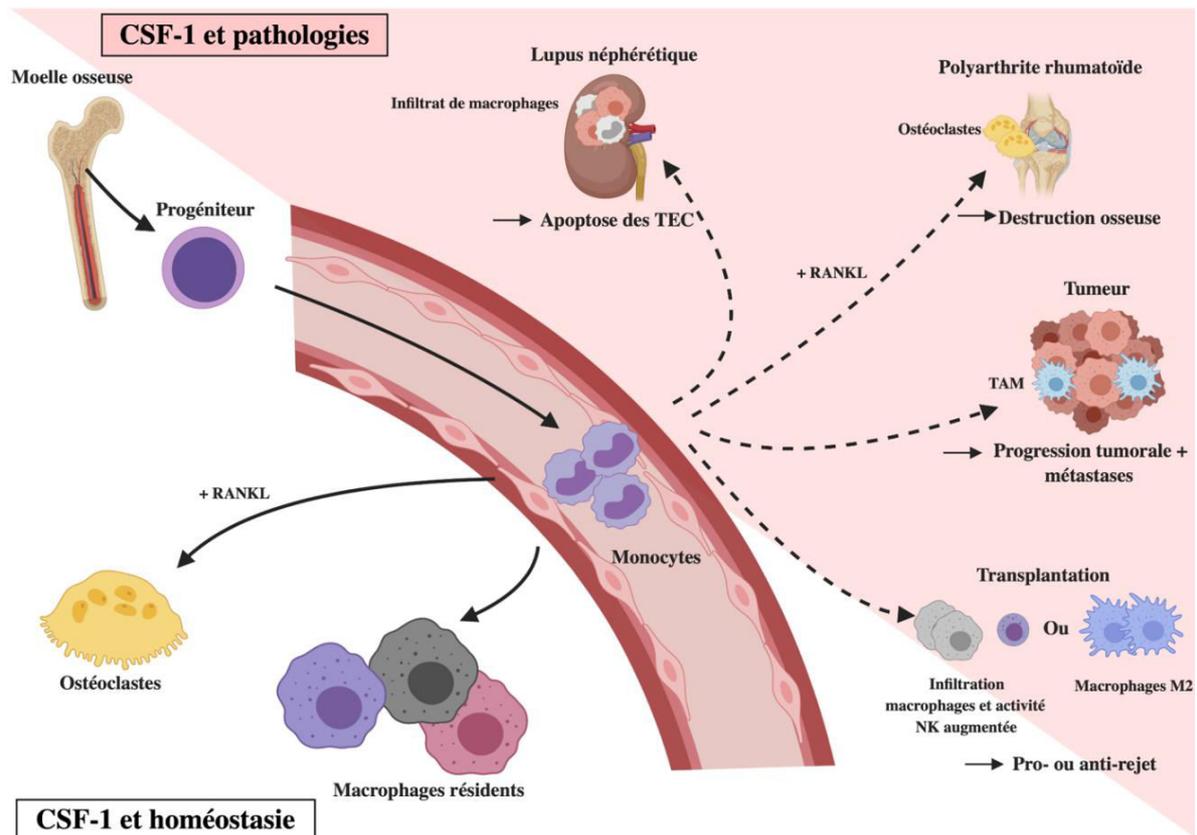


Figure 8: Schéma représentant les rôles principaux de CSF-1 dans l'homéostasie et dans les pathologies. TEC : cellules épithéliales tubulaires (rein) ; NK : natural killer ; Macrophages M2 : macrophages pro-régulateurs. \rightarrow : rôle dans l'homéostasie ; \dashrightarrow : rôle en conditions pathologiques.

2.4. L'expression de l'IL-34

a. Son expression en conditions physiologiques

L'IL-34 est une cytokine impliquée dès le développement embryonnaire où son expression est fortement retrouvée dans le cerveau de l'embryon de souris à E11.5 et E17.5 et ceci bien avant l'expression de *Csf1*. Dans la peau de l'embryon à E17.5, *Csf1* est détectable seulement dans le derme, à l'inverse l'*Il34* est spécifiquement exprimée dans l'épiderme et son taux reste élevé tout au long de la vie de l'animal. A l'âge adulte, l'expression d'*Il34* est plus importante dans la majorité des zones du cerveau et du cœur, mais inférieure à celle du *Csf1* dans l'utérus (Wei et al., 2010a; Greter et al., 2012).

Dans le but d'identifier les sources cellulaires d'IL-34, Wang *et al.* ont généré des souris transgéniques dans lesquelles les exons 3 à 5 du gène *Il34* ont été remplacés par une cassette LacZ (*Il34^{LacZ/LacZ}*), permettant de visualiser les expressions tissulaire et cellulaire de l'IL-34 grâce au substrat de la β -galactosidase le X-gal. A l'âge adulte, l'IL-34 est exprimée

dans différents tissus incluant la peau, les reins, les testicules et le cerveau au niveau du cortex cérébral, l'hippocampe et le liquide céphalo-rachidien mais pas dans le cervelet. Cette équipe et de façon reproductible avec Greter *et al.*, ont aussi identifié les sources cellulaires d'IL-34 dont les majoritaires sont les neurones et les kératinocytes, et dans une moindre mesure les follicules pileux, les cellules rénales du tubule proximal et les cellules germinales des tubules séminifères (Greter et al., 2012; Wang et al., 2012a).

Chez l'Homme, Lindeau *et al.*, ont montré que l'*IL34* est présente à l'interface fœto-maternelle via une expression par les cellules stromales résiduelles et par les cyto- et syncytiotrophoblastes placentaires (Lindau et al., 2018). A l'âge adulte, l'ARNm de l'*IL34* est retrouvé dans divers tissus comprenant le cœur, le cerveau, la peau, les poumons, le foie, les reins, la rate, le thymus, les testicules, les ovaires, l'intestin grêle, le colon et la prostate (Lin et al., 2008). Au niveau du cerveau, de façon similaire à la souris, l'*IL34* est majoritairement exprimée dans le cortex cérébral et l'hippocampe, à l'inverse *Csf1* prédomine dans le cervelet (Kana et al., 2019a). Les cellules ostéoclastes-like ont aussi été rapportées comme source d'IL-34 mais pas les ostéoblastes (Baud'huin et al., 2010). Enfin, notre équipe a récemment montré que les Tregs CD4⁺FoxP3⁺ et Tregs CD8⁺FoxP3⁺ du rongeur et de l'Homme expriment l'IL-34 (Bézie et al., 2015a), mettant en évidence une nouvelle source cellulaire et adressant la question de son rôle dans les fonctions suppressives des Tregs.

b. Les cellules T régulatrices, actrices de la tolérance périphérique

Les cellules régulatrices appartiennent à l'immunité adaptative et participent activement à la tolérance périphérique via la suppression/régulation de la réponse immune nécessaire au maintien de l'homéostasie. En 1970, Gershon et Kondo démontrent l'existence de cellules suppressives dans un modèle murin thymectomisé, irradié, reconstitué avec des cellules syngéniques de la moelle osseuse et traité avec une forte dose de globules rouges de mouton (SRBC). En effet, l'injection de thymocytes précédant une seconde exposition aux SRBC induit une absence de réponse anti-SRBC. Ces résultats mettent en évidence une population qui dérive des thymocytes impliquée dans la suppression (Gershon and Kondo). Peu étudiés dans les années qui suivent, c'est l'équipe de Sakaguchi *et al.* en 1995 qui identifie le premier marqueur des Tregs CD4⁺, le CD25. En effet, chez la souris la déplétion

néonatale des cellules CD25⁺ par un anticorps induit l'apparition de symptômes auto-immuns, alors que l'injection de lymphocytes T CD4⁺CD25⁺ permet de rétablir l'équilibre immun (Sakaguchi et al., 1995). La découverte du facteur de transcription FoxP3 a permis de mieux définir les cellules T régulatrices. En effet, le gène *Foxp3* est situé sur le chromosome X et sa mutation spontanée est retrouvée chez les souris scurfy (Brunkow et al., 2001) qui présentent une auto-immunité létale et une absence de Tregs. Ce phénotype est similaire aux patients souffrant d'*Immune-dysfunction, Polyendocrinopathy, Enteropahty, X-linked* (IPEX) chez lesquels le gène *FOXP3* est aussi muté (Chatila et al., 2000; Wildin et al., 2001). Ces patients possèdent des lymphocytes T CD4⁺CD25^{hi} n'exprimant pas FOXP3 aboutissant à l'absence de fonctions régulatrices (Bacchetta et al., 2006). Ces travaux ont permis d'identifier *FOXP3* comme un marqueur des Tregs CD4⁺CD25⁺, néanmoins FOXP3 est aussi exprimé de façon transitoire par les lymphocytes T activés, en particulier chez l'Homme par rapport à la souris. L'étude des marques épigénétiques notamment de l'état de la méthylation du locus *FoxP3*, a permis de préciser que l'expression de FoxP3 est contrôlée par la méthylation d'une région conservée de FoxP3 riche en CpG, le *Treg-specific demethylated region* (TSDR). La déméthylation de TSDR est associée à une expression stable de Foxp3 par les Tregs, à l'inverse des lymphocytes T effecteurs présentant un TSDR méthylé (Polansky et al., 2008). De plus, dans le cadre de la transplantation, le niveau d'expression de FoxP3 par les Tregs CD4⁺CD25⁺ corrèle positivement avec leur activité suppressive (Chauhan et al., 2009).

Deux types de Tregs existent, les nTregs sont générés dans le thymus et sont ainsi spécifiques du soi, cependant les mécanismes exacts d'évasion à la sélection sont peu connus. Il semblerait que les lymphocytes possédant une spécificité pour un tissu sont stimulés de façon modérée par les CPA thymiques via leur TCR induisant les signaux nécessaires à la formation des Tregs dont l'expression de FoxP3 (Jordan et al., 2001; Apostolou et al., 2002; Morikawa and Sakaguchi, 2014). La spécificité des nTregs pour les antigènes du soi les rend très importants dans la prévention des maladies auto-immunes. De plus, les nTregs expriment le facteur de transcription Helios (Thornton et al., 2010) et Nr1 (Yadav et al., 2012) les distinguant des Tregs induits. Les iTregs (*in vitro*) ou pTregs (*in vivo*) sont induits en dehors du thymus à partir des T CD4⁺CD25⁻ en présence de TGFβ et d'IL-2 induisant l'expression de FoxP3 (Horwitz et al., 2008). Leurs fonctions sembleraient être dédiées à l'induction d'une tolérance envers les bactéries commensales, les aliments, les

allergènes, le fœtus ainsi que lors d'inflammations/infections. Mais les iTregs sont moins stables que les nTregs, ceci pourrait être dû à l'état de méthylation de FoxP3. Les manipulations des marques épigénétiques des iTregs notamment du TSDR permettraient d'améliorer leur stabilité pour leur utilisation en thérapie cellulaire (Kanamori et al., 2016). Par ailleurs, des études récentes ont mis en évidence la capacité des Tregs CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺CCR6⁺ périphériques à re-circuler dans le thymus. Cette migration est dépendante de AIRE, un facteur de transcription impliqué dans la sélection négative, qui induit l'expression de CCL20 par les mTEC (Cowan et al., 2018), les Tregs périphériques inhibent alors spécifiquement le développement des Tregs *de novo* par déprivation d'IL-2 (Thiault et al., 2015). Ce mécanisme identifie un nouveau rôle de AIRE différent de son rôle de facteur de transcription médiant la sélection négative.

Aujourd'hui, il existe de nombreuses populations de Tregs mais le nombre de marqueurs spécifiques est assez restreint (**Tableau I**). Les Tregs plus décrites sont les Tregs CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, d'autres populations comme les Tregs CD8⁺, les Tregs CD4⁺ Tr1, les Tregs CD4⁺ Th3, les Tregs $\gamma\delta$ et les NKTregs ont aussi été étudiées (Zhao et al., 2017; Bézie et al., 2018b; Flippe et al., 2019a; Romano et al., 2019).

	Marqueurs	Sécrétion
Tregs CD4 ⁺ CD25 ⁺	FoxP3 ⁺ , CTLA-4 ⁺ , GITR ⁺ , CD103 ⁺ , CD127 ^{low}	IFN γ , IL-10, TGF β , IL-35, perforine/granzyme
Tregs CD4 ⁺ CD45RC ^{low/-}		IL-4, IL-5, IL-10, IL-13
CD4 ⁺ Tr1	FoxP3 ⁻ , CD49b ⁺ , LAG-3 ⁺ , CTLA-4 ⁺ , PD-1 ⁺	IL-10, TGF β , perforine/granzyme
CD4 ⁺ Th3	CD4 ⁺ , FoxP3 ⁻	TGF β , IL-4, IL-10
Tregs CD8 ⁺ CD45RC ^{lo}	FoxP3 ^{+/-} , CD25 ⁺ , GITR ⁺ , PD-1 ⁺ , CD127 ^{low} , CCR7 ⁻	IFN γ , FGL2, IL-10, IL-34, TGF β , IL-2
Tregs CD8 ⁺ CD28 ⁻	FoxP3 ⁺ , CD25 ⁺ , CTLA-4 ⁺ , GITR ⁺	IL-10, TGF β
Tregs CD8 ⁺ $\alpha\alpha$	FoxP3 ⁻ , NKR ⁺ , LAG3 ⁺ , TCRV β 6	
Tregs CD8 ⁺ CD122 ⁺	FoxP3 ⁻ , PD-1 ⁺ , CD28 ⁺ , CD25 ⁻	IL-10, TGF β , IFN γ
Tregs CD8 ⁺ CD103 ^{high}	FoxP3 ⁺ , CD25 ⁺ , CTLA-4 ⁺ , PD-1 ⁺ , CD39 ⁺	IL-10, IFN γ , TGF β
Tregs CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻	CD27 ⁺ , CD28 ⁻ , CD95 ⁺ , CD25 ⁻	IFN γ , TNF α , perforine
Tregs $\gamma\delta$	FoxP3 ⁻ , CD39 ⁺ /CD73 ⁺ , Fas	TGF β , IL-10, IL-4
NKTregs	TCR $\alpha\beta$ ⁺ , CD161 ⁺ , CD56 ⁺⁺ , CD27 ⁺	IL-10, IFN γ , IL-13, TNF β , GM-CSF

Tableau I: Tableau regroupant les principales populations de cellules régulatrices, l'expression des principaux marqueurs et sécrétion de cytokines/molécules.

i. Les Tregs CD4⁺

Les Tregs CD4⁺ sont les populations régulatrices les mieux décrites. En plus des Tregs CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, les Th3 et les Tr1 possèdent aussi des capacités suppressives malgré l'absence d'expression de FoxP3. Les Tr1 sont des cellules induites en périphérie n'exprimant que transitoirement FoxP3 en réponse à une stimulation d'IL-10. Ce sont des cellules mémoires exprimant CD49b, LAG-3, PD-1, ICOS, TIGIT, CD39, CD73, TIM-3, GITR, OX40, TNFRSF9 et CEACAM-1 (Gagliani et al., 2013; White and Wraith, 2016) et produisant de fortes quantités d'IL-10 et de TGFβ. Leur activation primaire dépend de leur activation spécifique via leur TCR, mais une fois activées, les Tr1 conservent une forte expression d'IL-10 leur permettant de diminuer une réponse inflammatoire médiée par différents clones de lymphocytes T. Elles agissent via différents mécanismes : la sécrétion de granzyme B leur permet de tuer les CPA, les interactions CTLA-4/CD80 et PD-1/PD-L1 avec les lymphocytes T effecteurs leur permettent d'inhiber leur prolifération. De plus, via l'expression de CD39/CD73, les Tr1 induisent des perturbations métaboliques des lymphocytes T limitant leur prolifération (Gregori and Roncarolo, 2018).

Grâce à la découverte des marqueurs CD25 et FoxP3, les Tregs CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ sont les plus documentées. Parmi ces Tregs, il est possible d'identifier trois sous-populations en fonction de l'expression des marqueurs CD45RA et FoxP3 : les Tregs naïves (FoxP3^{low}CD45RA⁺), les Tregs activés (FoxP3^{high}CD45RA⁻) et les Tregs productrices de cytokines (FoxP3^{low}CD45RA⁻) (Miyara et al., 2009). Les Tregs CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ retrouvés intra-greffon est un facteur de bon pronostic en transplantation rénale (Bestard et al., 2011). Par ailleurs, en transplantation l'induction d'une tolérance spécifique représente l'un des enjeux majeurs, c'est pourquoi différentes études s'intéressent aux patients tolérants qui ne présentent aucun signe de rejet en l'absence de prise de traitement immunosuppresseur. Chez ces patients transplantés hépatiques, le nombre de Tregs CD4⁺CD25⁺ est plus élevé par rapport aux patients non tolérants et individus sains (Martínez-Llordella et al., 2007). De plus, les patients transplantés rénaux en rejet chronique ont un nombre de Tregs CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ périphériques diminué par rapport aux patients stables (absence de signes de rejet sous traitement immunosuppresseur), tolérants et volontaires sains mais un profil régulateur équivalent. A l'inverse, les patients stables possèdent un nombre similaire de Tregs aux patients sains (Braudeau et al., 2007). Dans un contexte

d'auto-immunité comme la sclérose en plaque, le diabète de type I, le lupus érythémateux systémique ou la polyarthrite rhumatoïde, la défaillance des Tregs est attribuée à un nombre de cellules diminué et/ou à une fonction de prolifération/suppression non efficace (Miyara et al., 2011). Néanmoins, certaines études caractérisent les Tregs CD4⁺ seulement avec la forte expression du CD25 ne discriminant pas exclusivement les Tregs. De plus, d'autres études analysent le nombre de Tregs CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ seulement en périphérie et peut ainsi simplement refléter la migration de ces cellules en dehors de la périphérie comme c'est le cas dans la polyarthrite rhumatoïde (Möttönen et al., 2005). A l'inverse, dans les cancers un nombre plus élevé des Tregs dans le microenvironnement tumoral inhibe l'immunité anti-tumorale (Shitara and Nishikawa, 2018). C'est pourquoi, les Tregs CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ sont utilisés comme outil thérapeutique en transplantation et maladies auto-immunes et à l'inverse ciblées dans les cancers. Néanmoins, FoxP3 étant un marqueur intracellulaire, il est impossible d'isoler spécifiquement les Tregs CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ à partir du sang, du sang de cordon ou du thymus dans un but de thérapie. Mais, l'équipe de Liu *et al.* a mis évidence qu'environ 70% des cellules FoxP3⁺ sont comprises dans les Tregs CD4⁺CD25⁺ exprimant faiblement le CD127 (CD4⁺CD25⁺CD127^{low}) (Liu et al., 2006) permettant leur isolation par tri. Par ailleurs, dans un but d'augmenter et de stabiliser l'expression de FoxP3, l'ajout d'un immunosuppresseur comme la rapamycine induisant le blocage de la voie de signalisation Akt-mTOR-Smad3 augmente l'expression de FoxP3 (Scottà et al., 2013). Le potentiel thérapeutique des Tregs CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ a premièrement été mis en évidence dans les modèles animaux. En effet, après une greffe de moelle osseuse allogénique chez la souris Balb/c, l'injection de Tregs CD4⁺CD25⁺ permet d'inhiber efficacement la GVHD (Hoffmann et al., 2002). D'autres études ont mis en évidence que ces Tregs pouvaient être amplifiés *ex vivo* et atténuaient la GVHD tout en préservant l'effet *graft-versus-leukemia* (GVL) (Taylor et al., 2002; Trenado et al., 2006). Dans un contexte d'auto-immunité, les Tregs CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ se sont aussi montrés efficaces. En effet, l'injection de ces cellules induit l'inhibition des lymphocytes T dans un modèle de cholangite auto-immune (Tanaka et al., 2014) ou encore dans le modèle d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale, les Tregs CD4⁺CD25⁺ réduisent la sévérité de la pathologie en inhibant la prolifération et la sécrétion d'IFN γ par les lymphocytes T CD4⁺CD25⁻ (Kohm et al., 2002). En transplantation, l'injection de ces Tregs permet de retarder le rejet de greffe de peau (Sagoo et al., 2011) et des îlots de Langerhans (Xiao et al., 2014). Ces études prometteuses ont abouti à l'utilisation des Tregs

CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ chez l'Homme. Premièrement étudié dans les modèles chez la souris humanisée, le transfert de Tregs CD4⁺CD25⁺ permet entre autres de prolonger la survie des îlots de Langerhans (Wu et al., 2013; Xiao et al., 2014) et de prévenir le développement de la GVHD xénogénique (Mutis et al., 2006). Ces résultats ont abouti aux premiers essais cliniques. Notamment en 2009, les Tregs CD4⁺CD25⁺CD127^{low} ont été utilisés chez l'Homme dans le cadre d'un essai clinique comme traitement de patients souffrant de GVHD après une greffe de CSH allogéniques. Leur injection après expansion *ex vivo*, a permis de réduire les symptômes et immunosuppresseurs dans la GVHD chronique. Dans le cadre de la GVHD aiguë, l'amélioration de l'état des patients n'a été que transitoire mais de manière plus longue qu'avec l'utilisation des immunosuppresseurs (Trzonkowski et al., 2009). De plus, un autre essai, l'injection de Tregs CD4⁺CD25⁺ amplifiés *ex vivo* chez des patients atteints de GVHD aiguë a permis de démontrer la sécurité et la non-toxicité de ces cellules. De plus, bien que ce fut un essai de phase I, les auteurs ont rapporté une diminution de l'incidence des grades II-IV dans la GVHD sans aucun effet secondaire délétère (Brunstein et al., 2011). D'autres essais cliniques ont suivi dont « The One Study » et « ThRIL » qui sont des essais de phase I/II ayant pour visée d'évaluer l'innocuité des Tregs dans la transplantation de rein et de foie respectivement. Plus récemment, l'attention est portée sur les Tregs possédant une spécificité antigénique. En effet, des études ont mis en évidence que les Tregs spécifiques d'un antigène étaient plus efficaces dans la prévention du rejet de greffe que les Tregs polyclonaux (Sagoo et al., 2011; Putnam et al., 2013). C'est pourquoi plusieurs groupes ont développé des stratégies de transduction d'un TCR ou d'un chimeric antigen receptor (CAR) (Zhang et al., 2018b). En transplantation chez la souris humanisée l'utilisation d'un CAR spécifique du HLA-A2 exprimé à la surface des Tregs CD4⁺CD25⁺CD45RA⁺ amplifiés permet de prévenir plus efficacement le développement de la GVHD induite par des lymphocytes T HLA-A2⁺ comparé à des Tregs transduits avec un CAR contrôle (Ma et al., 2016b; MacDonald et al., 2016; Noyan et al., 2017)(Bézie *et al.*, accepté dans Blood Advances).

Enfin, une population de Tregs CD4⁺ a été identifiée sur le niveau d'expression de l'isoforme CD45RC. En effet, Powrie *et al.* ont mis évidence pour la première fois chez le rat, qu'un marquage avec un anticorps anti-CD45RC (clone OX22) permettait de diviser les lymphocytes T CD4⁺ en deux populations : CD45RC^{high} et CD45RC^{low/-} aux fonctions différentes. L'injection des lymphocytes T CD4⁺CD45RC^{high} dans des rats nude induit une pathologie nommée « wasting disease » avec des lésions au niveau du foie, du pancréas, des

poumons, de l'estomac et de la thyroïde qui s'accompagnent d'une perte de poids létale. A l'inverse, l'injection de T CD4⁺CD45RC^{low/-} n'induit pas cette pathologie et lorsque ces cellules sont co-injectées avec les T CD4⁺CD45RC^{high}, la wasting disease est nettement moins sévère et non létale démontrant le rôle régulateur de la population T CD4⁺CD45RC^{low/-} (Powrie, 1990). Ces résultats sont confirmés par l'équipe de Xystrakis *et al.* dans un modèle semi-allogénique chez le rat, les T CD4⁺CD45RC^{high} permettent l'induction d'une GVHD à l'inverse des T CD4⁺CD45RC^{low/-} (Xystrakis *et al.*, 2004a). Chez la souris, le niveau d'expression de l'isoforme CD45RB permet de différencier les cellules effectrices des cellules régulatrices. Le transfert des T CD4⁺CD45RB^{high} qui ont un phénotype de Th1 et sécrètent de l'IFN γ induit le développement d'une colite. Une co-injection de ces cellules avec les T CD4⁺CD45RB^{low/-} permet de la même façon que chez le rat, d'inhiber le développement de la maladie (Powrie *et al.*, 1994). Chez l'Homme, les T CD4⁺CD45RC^{low/-} ont aussi un rôle régulateur dans la prévention des maladies inflammatoires comme la vascularite associée à ANCA. En effet, les patients en rémission présentent un nombre augmenté de ces cellules (Ordonez *et al.*, 2009). De plus, notre équipe a mis en évidence que les Tregs CD4⁺CD45RC^{lo}FoxP3⁺ expriment l'IL-34 qui joue un rôle dans leur fonction suppressive puisque son blocage via un anticorps lève la suppression *in vitro* (Bézie *et al.*, 2015a).

ii. Les Tregs CD8⁺

Malgré une découverte datant de 1972 (Gershon *et al.*, 1972), et ce avant celle des Tregs CD4⁺, les Tregs CD8⁺ ne sont étudiés plus intensément que depuis une vingtaine d'année (Noble *et al.*, 1998) dans des contextes de GVHD, de transplantation (Zheng *et al.*, 2013; Bézie *et al.*, 2018a; Flippe *et al.*, 2019a) et de maladies auto-immunes (Lee *et al.*, 2008; Endharti *et al.*, 2011). La diversité des différents marqueurs retrouvés au sein des Tregs CD8⁺ rend leur étude difficile, néanmoins différentes équipes ont mis en évidence la présence de ces cellules chez le rat (Xystrakis *et al.*, 2004b; Guillonnet *et al.*, 2007a; Picarda *et al.*, 2014) et chez l'Homme (Zheng *et al.*, 2013; Bézie *et al.*, 2018a). Chez la souris, les Tregs CD8⁺FoxP3^{EGFP+} sont induites dans un modèle de GVHD et sont impliquées dans l'inhibition de la sévérité de la pathologie (Beres *et al.*, 2012). Il a été démontré que FoxP3 est exprimé par les Tregs CD8⁺ mais à moindre niveau que par les Tregs CD4⁺ (Lin *et al.*, 2007).

L'un des enjeux majeurs de l'étude des Tregs CD8⁺ est l'identification d'un marqueur plus restreint, en effet selon les études différents marqueurs ont été associés au phénotype des Tregs CD8⁺ : CD122, CD28, PD-1, CTLA-4, CD25, CD39, CD73, CD62L, CD44, GITR, CCR7, FasL et CD45RC. Par ailleurs, ces cellules peuvent sécréter différentes cytokines telles que l'IL-10, l'IL-34, l'IL-35, l'IFN γ , le TGF β et FGL-2 (Bézie et al., 2018b). Les Tregs CD8⁺ peuvent être divisés en Tregs effecteurs mémoires avec l'absence d'expression de CD62L⁻, CD122⁻ et CD28⁻, en Tregs centraux mémoires via l'expression de CD44, CCR7 et CD62L ou encore avec l'expression de CD122 associée ou non à CD28 (Bézie et al., 2018b).

Les différentes isoformes de CD45 sont aussi utilisées afin de diviser les populations de lymphocytes T dont les Tregs CD8⁺ (**Figure 9**). En effet, la protéine CD45 est une tyrosine phosphatase transmembranaire jouant un rôle dans la transduction des signaux à travers les TCR et BCR en modulant l'activation des kinases appartenant à la famille des Src (Lck pour les lymphocytes T ou Lyn, Fyn et Lck pour les lymphocytes B) (Hermiston et al., 2003; Clark and Baum, 2012). Selon l'épissage alternatif des 3 derniers exons (codant pour l'isoforme C, B et A de C' au N' terminal respectivement), plusieurs isoformes peuvent être générées (Streuli et al., 1987; Thomas, 1989). Théoriquement 8 isoformes pourraient être générées, cependant l'exon 5 ne peut pas être éliminé par épissage alternatif aboutissant à la présence de 5 isoformes : CD45RABC, CD45RAB, CD45RBC, CD45RB et CD45RO qui ne comprend aucun des 3 derniers exons. La fonction précise de chacune des isoformes est encore inconnue, néanmoins leur expression a été associée à l'état d'activation des lymphocytes T. Ainsi, l'expression des isoformes CD45RA et CD45RB à la surface des lymphocytes T régule de façon plus ou moins importante les signaux générés par le TCR, et est associée aux cellules naïves ou aux *terminally differentiated effector memory* (TEMRA), alors que CD45RO est exprimée à la surface des cellules activées et mémoires (Birkeland et al., 1989; Altin and Sloan, 1997; Hermiston et al., 2003; Rocha and Tanchot, 2004).

L'isoforme CD45RC permet de distinguer deux populations parmi les lymphocytes T CD8⁺ selon le niveau d'expression de l'isoforme : CD45RC^{high} et CD45RC^{low/-}. Les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{high} sont associés à une réponse Th1 et ces cellules sont impliquées dans les maladies auto-immunes de type Th1 (Fournie et al., 2001; Xystrakis, 2004; Ordonez et al., 2009; Pedros et al., 2013) et le rejet de greffe rénale (Ordonez et al., 2013; Garnier et al., 2019). A l'inverse, les T CD8⁺CD45RC^{low/-} sont associés à une réponse Th2/régulatrice inhibant le rejet de greffe et le développement de la GVHD (Spickett et al., 1983; Xystrakis et

al., 2004c, 2004b; Guillonneau et al., 2007a; Picarda et al., 2017) et sont aussi impliqués dans des modèles d'auto-immunité de type Th2 chez le rat (Cautain et al., 1999, 2001; Fournie et al., 2001). De plus, l'expression de FoxP3 corrèle inversement avec l'expression de la molécule CD45RC (Xystrakis et al., 2004b; Guillonneau et al., 2007a; Picarda et al., 2014). Ceci a été confirmé par l'analyse des modèles animaux dans lesquels la GFP est sous contrôle de l'expression du gène *FoxP3*, la population CD45RC^{low/-} comprend toutes les cellules FoxP3⁺ chez la souris (Wang et al., 2008) et le rat (Ménoret *et al.*, manuscrit en préparation).

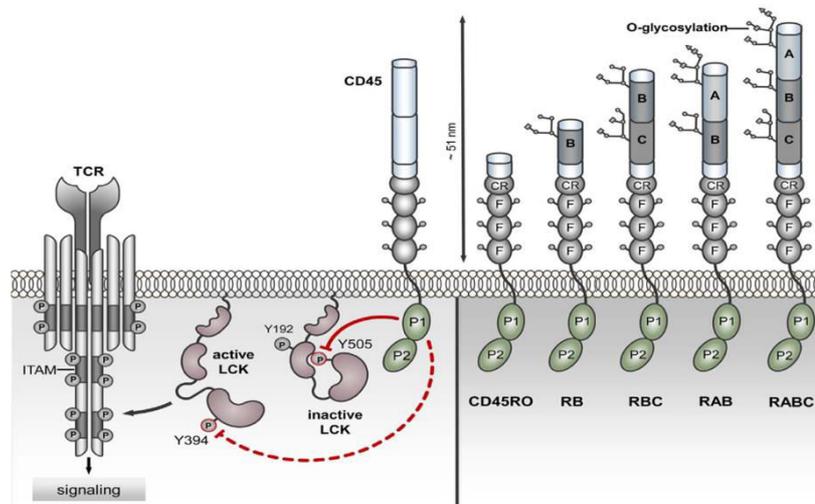


Figure 9: Schéma représentant la signalisation de CD45 et ses différentes isoformes (Rheinländer et al., 2018).

Notre équipe a mis en évidence dans un modèle d'allo-transplantation cardiaque chez le rat, que les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} permettaient d'induire et de transférer la tolérance via l'expression d'IFN γ , de FGL-2 et d'IL-34 (Guillot et al., 2002; Guillonneau et al., 2007a; Li et al., 2010; Picarda et al., 2014; Bézie et al., 2015b, 2015a). Par ailleurs, un traitement avec un anticorps monoclonal anti-CD45RC permet d'éliminer les lymphocytes T CD45RC^{high} enrichissant ainsi la population régulatrice CD45RC^{low/-} et induisant la tolérance à l'allogreffe cardiaque chez le rat ou l'inhibition de la GVHD chez la souris humanisée (Picarda et al., 2017). Chez l'Homme, les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} permettent d'inhiber le développement de la GVHD et le rejet allogénique de peau humaine chez la souris humanisée. De plus, de la même façon que pour les Tregs CD4⁺CD25⁺, l'ajout de rapamycine permet d'améliorer l'expansion et la capacité suppressive des Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} en comparaison à des cellules cultivées sans immunosuppresseur (Bézie et al., 2018a).

iii. Les mécanismes d'action des cellules T régulatrices

Dans le but d'inhiber la réponse immune et de rétablir l'équilibre immun, les Tregs CD4⁺ et CD8⁺ disposent de différents mécanismes : la production de cytokines régulatrices, la cytolyse, la perturbation métabolique et la modulation des cellules dendritiques (**Figure 10**). Certains de ces mécanismes sont communs aux Tregs CD4⁺ et CD8⁺ et d'autres sont distincts, leur conférant un effet synergique et complémentaire dans certaines conditions (Flippe et al., 2019a). En effet dans un contexte de transplantation, le CMH-I est présent à la surface de toutes les cellules nucléées permettant leur reconnaissance par les Tregs CD8⁺. Pour les Tregs CD4⁺, bien que l'expression du CMH-II puisse être augmentée par l'IFN γ (Collins et al., 1984) et/ou le TNF α (Leeuwenberg et al., 1988), l'ensemble des cellules n'expriment pas le CMH-II limitant le nombre de cellules pouvant être reconnues. Dans un greffon l'allo-reconnaissance peut donc être médiée par les cellules endothéliales, ainsi le potentiel d'action des Tregs CD8⁺ est plus vaste. De façon synergique, les Tregs CD4⁺ inhibent efficacement les réponses naïves mais pas les réponses mémoires (Yang et al., 2007), à l'inverse des Tregs CD8⁺ qui régulent efficacement ces réponses mémoires (Long et al., 2017).

Production de médiateurs solubles

L'expression de cytokines par les Tregs permet de moduler la réponse immune directement et indirectement. Les Tregs CD4⁺ et CD8⁺ peuvent exprimer différentes cytokines dont l'IL-10, le TGF β , l'IFN γ , le FGL-2, l'IL-34 et l'IL-35.

L'IL-10 est une cytokine régulatrice exprimée par les Tregs CD4⁺ et Tregs CD8⁺ importante dans la résolution de l'inflammation ainsi que dans le maintien de l'homéostasie. Les souris *Il10*^{-/-} développent différents symptômes auto-immuns comme des réponses immunes exacerbées et prolongées ainsi que des inflammations et des dommages tissulaires, et surtout développent parfois des colites chroniques (Kühn et al., 1993; Leon et al., 1998). Chez la souris, les Tregs CD8⁺CD122⁺ expriment plus fortement l'IL-10 par rapport aux Tregs CD4⁺CD25⁺ leur conférant un pouvoir suppresseur plus important (Dai et al., 2014). Chez le rat et l'Homme, les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} expriment aussi plus fortement l'IL-10 que la population effectrice CD8⁺CD45RC^{high} (Xystrakis et al., 2004c, 2004b; Ordonez et al., 2009). De plus, même si l'expression d'IL-10 par les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} n'est pas

impliquée dans leur fonction suppressive, la sous-population de Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-}IL-10⁺IFN γ ⁺ possède un pouvoir suppresseur plus important comparé aux sous-populations Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} n'exprimant pas l'IL-10 ou l'IFN γ (Guillonnet et al., 2007a; Bézie et al., 2018a). L'IL-10 agit directement ou indirectement sur la réponse immune. En effet, l'IL-10 inhibe l'expression du CMH-II, CD80, CD86 et CD54 par les macrophages/monocytes ainsi diminuant leur pouvoir activateur sur les lymphocytes. Et à l'inverse, favorise l'expression des molécules/cellules antagonistes via la génération de macrophages M2 (Murray, 2017). L'IL-10 agit aussi directement sur les lymphocytes T en inhibant leur différenciation en Th2 et Th17 tout en augmentant la survie des Tregs CD4⁺FoxP3⁺ (Ouyang and O'Garra, 2019). L'IL-10 est aussi impliquée dans la génération et le maintien des cellules Tr1 (Brockmann et al., 2017) et des cellules dendritiques tolérogènes (Steinbrink et al., 1997; Gregori et al., 2010).

Le TGF β est une cytokine exprimée par les Tregs CD4⁺ et Tregs CD8⁺, existant sous trois formes, le TGF β 1, TGF β 2 et TGF β 3. Le TGF β possède de puissantes capacités suppressives et est impliqué dans le maintien de la tolérance en inhibant la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ (Nakamura et al., 2001) en agissant directement sur l'inhibition de la réponse immune en induisant l'apoptose des CTL et indirectement en diminuant l'expression des molécules de co-stimulation par les CPA ne pouvant alors plus stimuler efficacement les lymphocytes T (Vieyra-Lobato et al., 2018). Les souris déficientes en *Tgfb1* présentent une sur-activation des lymphocytes T CD4⁺ aboutissant à une pathologie létale nommée « wasting disease » (Shull et al., 1992; Diebold et al., 1995). De plus, son blocage par un anticorps dans un modèle d'allo-transplantation cardiaque chez le rat aboutit au rejet du greffon (Le Texier et al., 2012). L'expression de TGF β par les Tregs CD8⁺CD122⁺ régule la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ dans un modèle d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale en association à l'IL-10 et l'IFN γ (Mangalam et al., 2012). Le TGF β participe à l'enrichissement de l'environnement tolérogénique via sa capacité à induire des Tregs CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ en périphérie (Chen et al., 2003).

L'action de l'IFN γ peut être dichotomique et jouer un rôle dans la régulation de la réponse immune. En effet, la sécrétion d'IFN γ par les Tregs CD4⁺FoxP3⁺ permet de prévenir le développement de la GVHD chez la souris (Koenecke et al., 2012). De plus, notre équipe a mis en évidence que dans un modèle de transplantation chez le rat l'IFN γ est sécrétée par les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} et Tregs CD4⁺CD25⁺. Dans ce modèle, l'IFN γ agit par induction de

molécules suppressives comme l'IDO par les cellules endothéliales du greffon et des pDC (Guillonnet al., 2007a; Thebault et al., 2007). L'IFN γ permet aussi la sécrétion de FGL2 et d'iNOS (Zhang, 2007).

En plus de son rôle dans les mécanismes de thrombose, FGL-2 possède des capacités régulatrices. En effet, elle est impliquée dans l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T, dans la différenciation des lymphocytes T vers un profil Th2 et FGL-2 diminue les capacités immuno-stimulatrices des CPA (Chan et al., 2003). FGL-2 est exprimée par les Tregs CD4⁺FoxP3⁺, les Tregs CD8⁺ $\alpha\alpha$ murin (Denning et al., 2007) et les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} induits de rat. Notre équipe a montré que sa surexpression permet d'inhiber le rejet d'allogreffe via la génération de lymphocytes B régulateurs (Bregs) (Li et al., 2010; Bézie et al., 2015b).

Notre équipe a démontré que l'IL-34 était exprimée par les Tregs CD4⁺FoxP3⁺ et CD8⁺FoxP3⁺ chez le rat et l'Homme (Bézie et al., 2015a). Comme décrit précédemment, les récepteurs de l'IL-34 ne sont pas exprimés par les lymphocytes T indiquant que l'IL-34 agit indirectement sur l'inhibition de la réponse immune. En effet, impliquée dans les fonctions suppressives des Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-}, de manière indépendante du CSF-1, l'IL-34 permet d'induire la tolérance à l'allogreffe cardiaque et l'inhibition du rejet aigu hépatique chez le rat via l'induction de macrophages M2 (Bézie et al., 2015a; Zhao et al., 2018a). De plus, chez l'Homme les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} co-exprimant l'IL-34, l'IL-10, l'IFN γ et le TGF β représentent une sous-population aux fonctions suppressives plus importantes (Bézie et al., 2018a).

Enfin, l'IL-35 est exprimée par les Tregs CD4⁺ et Tregs CD8⁺, elle permet d'inhiber la prolifération des lymphocytes T ainsi que l'induction d'iTreg35 n'exprimant pas FoxP3 mais sécrétant fortement l'IL-35 (Zhang et al., 2019). Dans un modèle de colite chez la souris induite par l'injection de cellules CD4⁺CD45RB^{high}, la co-injection de Tregs déficientes en IL-35 ne permet pas de protéger contre le développement de la maladie démontrant son implication dans les fonctions suppressives des Tregs (Collison et al., 2007).

La cytolyse

Certaines populations de Tregs peuvent induire la cytolyse des lymphocytes B et T activés, monocytes et cellules dendritiques via l'interaction Fas/FasL (Watanabe et al., 2002), ou l'expression de granzyme B seule (Gondek et al., 2005) ou en association avec la

perforine (Grossman et al., 2004). L'interaction Fas/FasL est un mécanisme d'action des Tregs CD8⁺CD122⁺PD-1⁺ murin puisque les Tregs provenant de souris *Fas*^{-/-} sont incapables d'exercer leur capacité suppressive (Akane et al., 2016). Les Tr1 sécrètent de forte quantité d'IL-10 induisant l'expression de granzyme B et de perforine permettant de tuer les cellules myéloïdes (Magnani et al., 2011). De plus, les Tregs CD4⁺CD25⁺ activés sont capables d'induire la cytolyse des lymphocytes T CD4⁺ et ainsi de prolonger la survie d'une greffe de peau via l'interaction *tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand* (TRAIL)/*death receptor 5* (DR5) (Ren et al., 2007). Grâce à l'expression de PD-L1, les Tregs inhibent l'activation des lymphocytes B auto-réactifs en périphérie (Gotot et al., 2012). Ces mécanismes de cytolyse sont restreints à certaines populations de Tregs, en effet les Tregs CD8⁺CD103⁺ et les CD8⁺CD45RC^{low/-} n'agissent pas à travers ces mécanismes (Xystrakis et al., 2004b; Guillonnet et al., 2007a; Koch et al., 2008; Bézie et al., 2018a).

La perturbation métabolique

Les perturbations métaboliques font parties de l'arsenal des Tregs. En effet, les Tregs CD4⁺CD25⁺ expriment fortement la chaîne α du récepteur à l'IL-2 (CD25). Ainsi par compétition, les Tregs vont consommer et appauvrir drastiquement le milieu en IL-2 nécessaire à leur survie et à leur prolifération, et les lymphocytes T effecteurs privés de cette cytokine vont mourir par apoptose (Pandiyani et al., 2007). Les Tregs expriment les ectoenzymes CD39 et CD73 capables de dégrader l'ATP en AMP puis en adénosine. L'adénosine sécrétée va se fixer à la surface des lymphocytes T effecteurs sur le récepteur A2A causant l'accumulation d'AMPc dans la cellule aboutissant au blocage de ZAP70, CD25 et de la sécrétion d'IL-2 engendrant une inhibition de leur activation (Bopp et al., 2007; Allard et al., 2017).

La modulation des cellules dendritiques

Enfin, les Tregs peuvent agir sur la réponse immune via la modulation des cellules dendritiques vers un phénotype immuno-modulateur. En effet, l'interaction des Tregs avec les cellules dendritiques via CTLA-4/CD80-CD86 aboutit à une diminution de l'expression des molécules de co-stimulation et à une augmentation de la sécrétion d'IL-10, d'IDO, de HLA-DR et CCR7 (Grohmann et al., 2002; Misra et al., 2004; Bayry et al., 2007). De même l'expression de LAG-3 qui interagit avec le CMH-II des cellules dendritiques et inhibent leur maturation

(Liang et al., 2008). Par ailleurs, l'expression de Nrp-1 par les Tregs induit une interaction de longue durée avec les cellules dendritiques engendrant une restriction de contact de ces cellules avec les lymphocytes T effecteurs (Sarris et al., 2008).

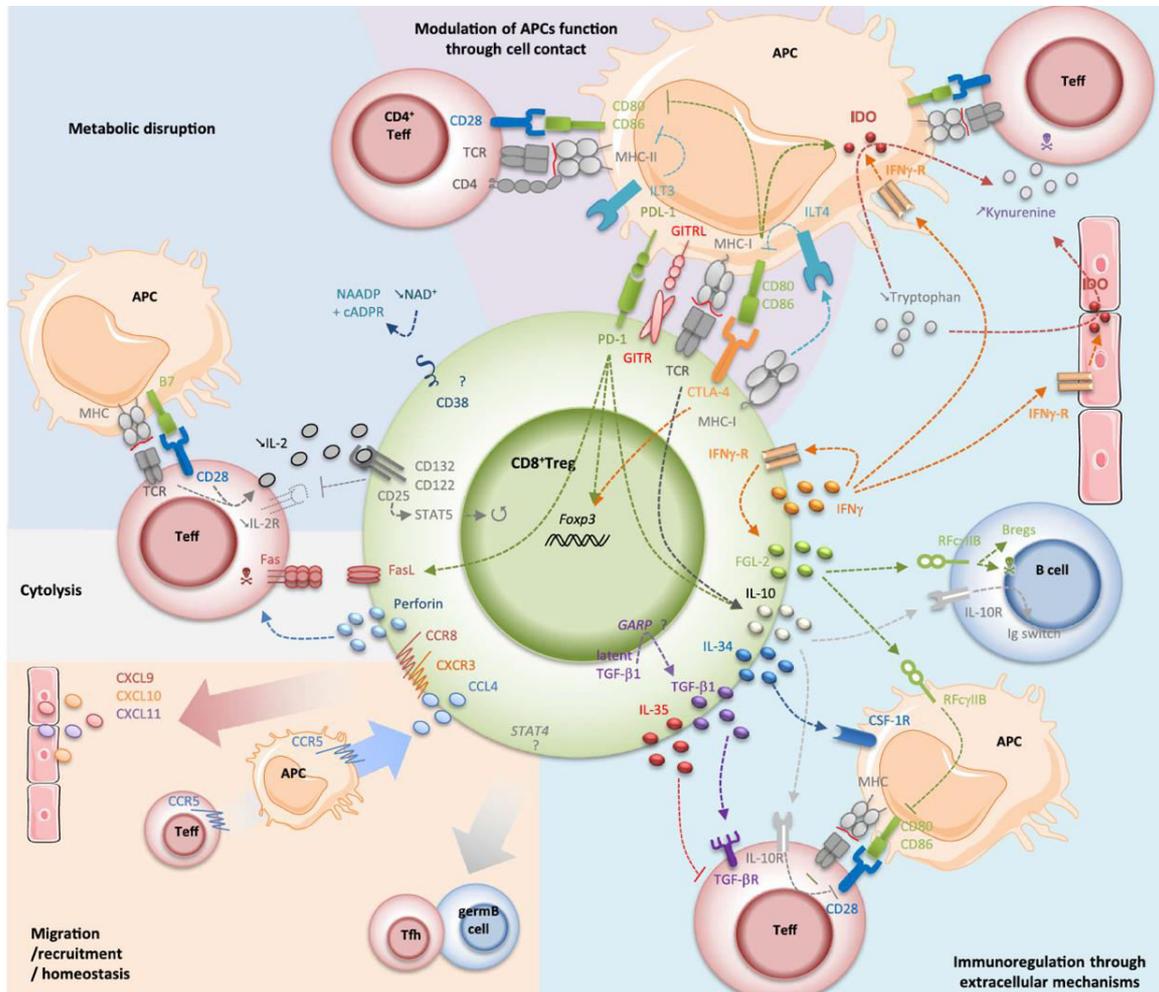


Figure 10: Schéma représentant les différents mécanismes d'action des Tregs CD8⁺ (Bézie et al., 2018b).

2.5. Comparaison des modèles déficients en *Il34*, *Csf1* et *Csf1r*

Bien que partageant des fonctions communes dans la survie, la prolifération et la différenciation des monocytes en macrophages (Wei et al., 2010b), l'IL-34 est plus qu'un analogue du CSF-1. En effet, les séquences de l'IL-34 et du CSF-1 ne partagent aucune similitude, mais leur structure quaternaire est composée d'hélices α et de feuillet β (Garceau et al., 2010). Néanmoins, l'IL-34 présente des feuillet β plus courts et partiellement substitués par 3 hélices α 1-3 par rapport au CSF-1 (Pandit et al., 1992). De plus, les études cristallographiques ont mis en évidence que la fixation de l'IL-34 sur le

récepteur CSF-1R était différente de l'interaction CSF-1/CSF-1R (Felix et al., 2013). En effet, l'interaction IL-34/CSF-1R dépend d'acides aminés hydrophobes et de liaisons hydrogènes alors que l'interaction CSF-1/CSF-1R repose sur des liaisons salines. Cette différence suggère que la fixation de l'IL-34 induit des signaux transmembranaires plus importants (Garceau et al., 2010), d'autant plus que l'affinité de l'IL-34 pour son récepteur est plus grande que le CSF-1 (Wei et al., 2010a; Liu et al., 2012) induisant une intensité de phosphorylation plus importante et des différences de phénotypes des macrophages (Cf. partie II.2.2.a). De plus, l'IL-34 possède deux autres récepteurs indépendants du CSF-1 lui conférant des fonctions supplémentaires qui sont à élucider.

Des différences spatio-temporelles d'expression entre l'IL-34 et le CSF-1 indiquent que ces cytokines ne sont pas redondantes. L'*Il34* est présente dès le développement embryonnaire et permet le développement de la microglie dans le prosencéphale et son expression par les neurones permet d'en maintenir l'homéostasie (Greter et al., 2012; Wang et al., 2012a), alors que le *Csf1* est exprimé plus tard dans l'embryogénèse et permet le développement de la microglie du cervelet (Kana et al., 2019a). L'expression de l'IL-34 et du CSF-1 sont différentes selon les zones corticales et ne se chevauchent généralement pas. De plus, l'IL-34 est exprimée par les kératinocytes dans l'épiderme et est nécessaire à la génération des cellules de Langerhans, à la différence du CSF-1 qui est retrouvé dans l'épiderme (Greter et al., 2012; Wang et al., 2012a). A l'âge adulte, les niveaux d'expression sont aussi différents. Dans le sérum de volontaires sains, l'IL-34 est indétectable alors que la concentration moyenne de CSF-1 est de 300 pg/mL. De plus, le CSF-1 est exprimé de manière constitutive par différents types cellulaires, alors que l'IL-34 semble être exprimée de manière plus spécifique et locale. Le faible niveau d'expression systémique de l'IL-34 peut être dû à sa plus grande affinité pour CSF-1R ainsi qu'à la présence de ses deux autres récepteurs rendant sa disponibilité moindre. Certaines cellules expriment l'IL-34 et le CSF-1 comme les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} induits chez le rat, néanmoins le blocage de CSF-1 n'empêche pas leur fonction suppressive à la différence du blocage de CSF-1R démontrant que la suppression est dépendante de l'IL-34 (Bézie et al., 2015a). Ces résultats renforcent la non redondance de ces deux cytokines. De manière intéressante, l'équipe de Ségaliny *et al.* a mis en évidence que l'IL-34 et le CSF-1 pouvaient former un hétérodimère se fixant de manière différente sur le récepteur CSF-1R (Ségaliny et al., 2015a) suggérant une possible synergie entre ces deux cytokines.

L'utilisation de modèles déficients en CSF-1R, CSF-1 et IL-34 permet de mieux rendre compte des différences entre les cytokines ainsi que d'identifier les rôles spécifiques de l'IL-34 et du CSF-1 (**Tableau II**). De plus, une mutation du gène *CSF1R* chez l'Homme génère un défaut dans la signalisation par les tyrosines kinases et est à l'origine de l'*adult-onset leukoencephalopathy with axonal spheroids and pigmented glia* (ALPS). L'ALPS est une maladie neurodégénérative détruisant la matière grise induisant une démence et des déficits moteurs ressemblant à la maladie de Parkinson, d'Alzheimer et à la sclérose en plaque pouvant survenir de la naissance à l'âge adulte en fonction de la mutation (Rademakers et al., 2012). De manière générale le phénotype des souris *Il34^{LacZ/LacZ}* est nettement moins sévère que les modèles déficients en *Csf1* et *Csf1r*. En effet, leur espérance de vie, leur croissance et leur fertilité ne sont pas impactées. De façon intéressante, les souris déficientes en *Csf1* ont une espérance de vie non altérée à la différence des rats t1/t1 déficients en *Csf1* et des souris *Csf1r^{-/-}* ainsi que chez l'Homme (espérance de vie est d'environ 6,8 ans). Les souris *Il34^{LacZ/LacZ}* ne présentent pas de phénotype ostéopétrotique à la différence des modèles *Csf1^{-/-}* et *Csf1r^{-/-}* et certains patients présentent une forte densité osseuse. Ces résultats démontrent que le CSF-1 compense la déficience et est majoritairement impliqué dans la formation d'ostéoclastes et l'éruption des dents. Néanmoins, l'IL-34 peut en partie jouer un rôle dans l'ostéoclastogénèse étant donné que l'ostéopétrose est plus sévère dans les modèles de souris et de rats déficients en *Csf1r* (Baud'huin et al., 2010). Concernant les différentes populations cellulaires, la microglie et les cellules de Langerhans sont absentes dans les modèles *Csf1r^{-/-}* et légèrement réduites ou non impactées dans les modèles *Csf1^{-/-}*. Ainsi, l'IL-34 a été suggérée comme nécessaire à leur développement et ceci a été confirmé par les équipes de Wang *et al.* et Greter *et al.* (Greter et al., 2012; Wang et al., 2012a). Chez les patients atteints d'ALPS, la microglie est absente, générant des déformations du cerveau et du cervelet où le corpus callosum est absent (Guo et al., 2019; Oosterhof et al., 2019). Les souris *Il34^{LacZ/LacZ}* ne présentent pas d'autres altérations des populations cellulaires myéloïdes (hormis les cellules dendritiques CD11c⁺CD11b⁺ dans les poumons) et lymphoïdes. Mais les différentes populations de lymphocytes et en particulier les Tregs n'ont pas été étudiés dans ce modèle. A l'inverse, les déficiences en *Csf1* et *Csf1r* induisent des diminutions en lymphocytes T, monocytes et macrophages résidents. Très peu d'études se sont intéressées aux populations cellulaires des patients atteints d'ALPS, néanmoins une patiente présentait une diminution des

monocytes CD14^{int} (Kraya et al., 2019). L'importance des réductions dépendent de l'organe ; elles sont plus importantes dans la moelle osseuse, le foie, la rate et les reins. Enfin, les déficiences en *Csf1* et *Csf1r* chez la souris induisent une défaillance dans le développement des cellules pancréatiques β et des cellules de Paneth. Néanmoins, des différences inter-espèces existent étant donné que cette défaillance n'est pas retrouvée chez les rats *Csf1r*^{-/-} (Marks and Lane, 1976; Wiktor-Jedrzejczak et al., 1982, 1990; Blevins and Fedoroff, 1995; Marks et al., 1997; Dai et al., 2002; Wesenbeeck et al., 2002; Li et al., 2006; Wang et al., 2012a; Greter et al., 2012; Wang et al., 2015b; Pridans et al., 2018).

	Souche	Homme	Souris	Rat	Souris	Rat	Souris
	Génotype	Mutation <i>Csf1r</i>	<i>Csf1r</i> ^{-/-}	<i>Csf1r</i> ^{-/-}	<i>Csf1</i> ^{op/op}	<i>Csf1</i> ^{tl/tl}	<i>I134</i> ^{LacZ/LacZ}
Distribution Mendélienne		Autosomique dominante	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Espérance de vie		Drastiquement réduite	Drastiquement réduite	Réduite	Normale	Drastiquement réduite	Normale
Croissance		ND	Réduite	Réduite	Réduite	Réduite	Normale
Fertilité		ND	Réduite	Réduite	Réduite	Fertile	Fertile
Squelette		Ostéopétrose (généralement)	Ostéopétrose sévère, réduction sévère des ostéoclastes	Ostéopétrose sévère, pas d'ostéoclastes	Ostéopétrose, restaurée avec l'âge	Ostéopétrose sévère, pas d'ostéoclastes	Normal
Dents		ND	Absentes	Absentes	Absentes	Absentes	Présentes
Phénotype cellulaire	Monocytes	Réduction	Réduction sévère	Réduction sévère	Réduction restaurée avec l'âge	Réduction	Normaux
	Macrophages résidents	ND	Réduction drastique	Réduction drastique	Réduction drastique, restaurée avec l'âge	Réduction	Normaux (sauf microglie et LC)
	Microglie	Absente, Développement de l'ALPS	Absente	Absente	Réduite	ND	Réduite
	LC	ND	Absentes	Absentes	Normales	ND	Drastiquement réduites
	pDC	ND	ND	Drastiquement réduites	Réduites	ND	ND
	Lymphocytes T	ND	Réduits	Réduits	Réduits	ND	Normaux
	Autres populations	ND	Réduction cellules pancréatique β et cellules de Paneth, augmentation des granulocytes	Augmentation des granulocytes et érythrocytes	Réduction cellules pancréatique β et cellules de Paneth, augmentation des granulocytes	Thrombocytopénie	Réduction des CD pulmonaires CD11c ⁺ CD11b ⁺

Tableau II: Comparaison des modèles déficients en *Csf1r*, *Csf1* et *I134* chez l'Homme, la souris et le rat (LC : cellules de Langerhans ; pDC : cellule dendritique plasmacytoïde ; CD : cellule dendritique ; ALPS : *adult-onset leukoencephalopathy with axonal spheroids and pigmented glia*).

3. L'IL-34 et la lignée myéloïde

Le rôle de l'IL-34 dans la survie, prolifération et différenciation des monocytes en macrophages a principalement été étudié à l'âge adulte. Néanmoins d'autres études ont démontré sa nécessité dès l'ontogénie des macrophages et de façon indépendante du CSF-1, indiquant son rôle crucial dès le développement embryonnaire jusqu'au maintien de l'homéostasie.

3.1. L'ontogénie des macrophages résidents, implication de l'IL-34 dès l'embryogénèse

Parmi les cellules de l'immunité innée, les macrophages sont des cellules aux propriétés plastiques jouant un rôle important dans l'homéostasie via le développement tissulaire et le maintien des fonctions spécifiques des tissus. De plus, en cas d'infection les macrophages déclenchent les réponses immunes nécessaires à l'élimination du pathogène puis au retour à l'état basal. Mais ces cellules sont aussi impliquées dans de nombreuses pathologies inflammatoires et cancéreuses ce qui en fait des cibles thérapeutiques. Néanmoins les connaissances sur leur ontogénie sont encore discutées.

La première hypothèse sur leur génération et leur développement date des années 1970 avec l'équipe de Van Furth *et al.* suggérant que les macrophages résidents tissulaires dérivent de progéniteurs situés dans la moelle osseuse et sont continuellement renouvelés grâce aux monocytes (van Furth and Cohn, 1968; van Furth and Diesselhoff-Den Dulk, 1970). Néanmoins, des études plus récentes de cartographie des précurseurs au cours du développement embryonnaire chez la souris ont permis de générer un nouveau point de vue. En effet, aujourd'hui il est admis qu'à l'état basal les monocytes circulants ne contribuent pas au développement des macrophages tissulaires à l'exception des macrophages intestinaux (Bain et al., 2014), du derme (Tamoutounour et al., 2013) et du cœur (Epelman et al., 2014). Les monocytes colonisent perpétuellement ces tissus et se différencient en macrophages. La majorité des populations de macrophages résidents à l'âge adulte sont en effet générés avant la naissance grâce aux précurseurs embryonnaires de façon indépendante des cellules souches hématopoïétiques (CSH), et les macrophages se maintiennent à l'âge adulte par auto-renouvellement (Ginhoux and Jung, 2014). Mais l'identité précise du précurseur induisant les macrophages résidents, les voies de

différenciation impliquées dans la génération des cellules matures à partir des précurseurs ainsi que les facteurs de transcription nécessaires sont encore débattus ou inconnus (Ginhoux and Guilliams, 2016).

Les différentes populations de macrophages résidents ne partagent pas forcément la même origine, ils peuvent provenir de précurseurs embryonnaires comme les macrophages dérivant du sac vitellin ou les monocytes fœtaux, ou bien être générés par les monocytes adultes. Ainsi, les macrophages peuvent être générés à partir de trois vagues de colonisation hématopoïétique survenant durant l'embryogénèse (**Figure 11**).

La première vague est l'hématopoïèse primitive qui se développe à partir de la plaque latérale du mésoderme dans les îlots sanguins du sac vitellin extra-embryonnaire à E7.0. C'est une source d'érythroblastes, mégacaryocytes et macrophages primitifs (Perdiguerro and Geissmann, 2016). Dans l'étude menée par Ginhoux *et al.*, la microglie a été mise en évidence comme la seule population présente à l'âge adulte dérivant de cette première vague. Les autres populations de macrophages sont générées lors de cette vague mais remplacées par les vagues suivantes. Dans cette étude, ils ont aussi démontré que la microglie était présente lors de l'embryogénèse chez les souris déficientes en *Csf1* mais absente chez les souris déficientes pour le récepteur *Csf1r* suggérant que l'IL-34, le ligand alternatif pour le CSF-1R soit la cytokine nécessaire pour leur génération (Ginhoux *et al.*, 2010). Cette hypothèse a été confirmée par Wang *et al.*, grâce à un modèle murin. Les souris déficientes en *Il34* présentent une déficience en microglie au niveau du cortex cérébral et de l'hippocampe mais une densité normale de microglie dans le cervelet. Ces résultats confirment le rôle de l'IL-34 dans la génération et le maintien de la microglie dans le prosencéphale (correspondant au cerveau excepté le cervelet) (Greter *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012a). Alors que le CSF-1 permet la génération de la microglie du cervelet (Kana *et al.*, 2019a). De plus, une équipe a récemment étudié l'ontogénie de la microglie présente dans la rétine où elle est présente dans la couche plexiforme externe et interne. Cette étude a mis en évidence que la microglie provient des précurseurs dérivés du sac vitellin de la même façon que la microglie de l'encéphale. L'IL-34 est aussi nécessaire au développement de la microglie mais seulement dans la couche plexiforme interne (O'Koren *et al.*, 2019). Cette première vague a été redéfinie en 2015 avec la découverte des erythro-myeloid progenitors (EMP) du sac vitellin. Les EMP dérivent du sac vitellin de l'endothélium hémogénique sont phénotypiquement définis comme $c\text{-Kit}^+CD93^+CD41^+VE\text{-cadherin}^+CD16/32^+CD45^{lo}$ (Bertrand

et al., 2005; Frame et al., 2013; McGrath et al., 2015). Les EMP diffèrent sur plusieurs aspects des cellules souches hématopoïétiques (CSH), en effet les EMP n'ont pas la capacité de génération des cellules de la lignée lymphoïde ni de repopulation cellulaire sur le long terme ou encore n'expriment pas le marqueur Sca-1 (McGrath et al., 2015). Une première vague précoce composée d'EMP CSF-1R⁺c-myb⁻ apparaît à E7.0 et génère principalement les macrophages primitifs du sac vitellin à l'origine de la microglie et peut-être des cellules de Kupffer et des cellules de Langerhans (Gomez Perdiguero et al., 2015; Hoeffel et al., 2015). Par ailleurs, en utilisant le même modèle de souris déficientes en IL-34, deux équipes ont démontré que la génération et la maintenance des cellules de Langerhans était dépendante de l'IL-34 (Greter et al., 2012; Wang et al., 2012a). Néanmoins, suite à une déplétion de ces cellules, le CSF-1 est nécessaire à la recolonisation des cellules de Langerhans à partir des monocytes circulants, l'homéostasie est ensuite médiée par l'IL-34 (Greter et al., 2012; Wang et al., 2015b).

Après cette première vague d'EMP, une vague tardive d'EMP CSF-1R^{lo}c-myb⁺ à E8.25 migrent dans le foie fœtal via la circulation sanguine à E9.5 pour générer les cellules de la lignée myéloïde dont les monocytes fœtaux jusqu'à E14.5. Selon les hypothèses, cette seconde vague peut aussi participer à la génération de la microglie et des cellules de Langerhans (**Figure 11 : modèle 1 vs 2**). A ce stade, les EMP ne seront plus détectables dans le sang fœtal. Même si l'origine des monocytes fœtaux est encore controversée, provenant soit de la vague tardive d'EMP ou des CSH (Sheng et al., 2015) (**Figure 11 : modèle 1 vs 2**), ils vont coloniser l'ensemble des tissus fœtaux excepté le cerveau, et se différencient en macrophages en remplaçant les macrophages primitifs présents à la première vague (Ginhoux et al., 2010; Chen et al., 2011a; Hoeffel et al., 2012, 2015). Les macrophages résidents dérivés des monocytes fœtaux formeront alors les populations présentes à l'âge adulte.

Enfin, la vague de colonisation de l'hématopoïèse réalisée par les CSH permet le développement des macrophages de l'intestin, du derme et du cœur. Les CSH peuvent participer au développement d'autres populations de macrophages mais avec une contribution de moins de 5% (Perdiguero and Geissmann, 2016). Mais, en cas d'inflammation, les monocytes circulants peuvent être recrutés dans le tissu et différenciés en macrophages. Ces cellules, à la différence des EMP, sont capables de générer sur le long terme toutes les populations du système immunitaire. Elles dérivent de l'aorto-gonado-

mesonephros (AGM) de l'endothélium hémogénique ainsi que des artères ombilicales et vitellines à E9.5, puis envahissent le foie fœtal à E10.5 jusqu'à la colonisation et l'initiation de l'hématopoïèse de la moelle osseuse à E15 (Godin and Cumano, 2002; Cumano and Godin, 2007).

Les macrophages résidents à l'âge adulte sont en majorité générés par des précurseurs embryonnaires et non par une différenciation des monocytes circulants. Néanmoins, en cas d'inflammation, les monocytes circulants sont capables de migrer dans le tissu et de se différencier en macrophages. Ainsi, des études supplémentaires sont nécessaires afin d'analyser les fonctions entre les macrophages développés dans l'embryogénèse et les macrophages générés via les monocytes.

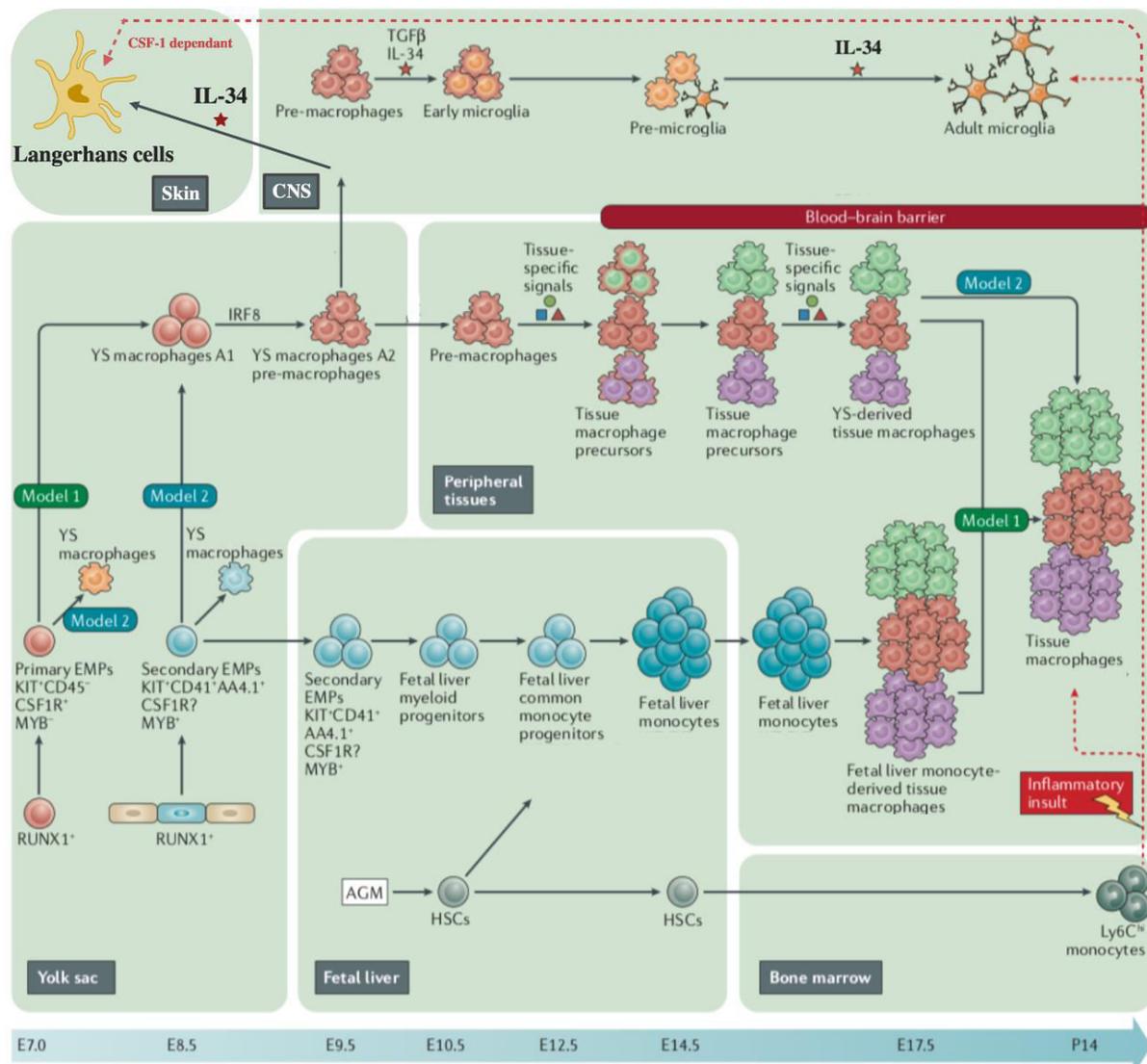


Figure 11: Représentation schématique de l'ontogénèse des macrophages au cours de l'embryogénèse (adapté de Li and Barres, 2018). EX : stade embryonnaire ; PX : stade post-natal ; AGM : aorto-gonado-mesonephros ; HSC : hematopoietic stem cells (cellules souches hématopoïétiques) ; —> : ontogénèse supposée ; - - -> : repeuplement à partir des monocytes en cas d'inflammation.

Les monocytes sont générés par les CSH dans la moelle osseuse et sont définis par leur localisation, leur phénotype, leur morphologie ainsi que leur génome et leur transcriptome (Ingersoll et al., 2010). L'une de leur fonction est de pouvoir se différencier en macrophages en cas d'inflammation en servant de réservoir (van Furth and Cohn, 1968) et ils participent aussi à l'immunosurveillance. Générés à partir des précurseurs hématopoïétiques de la lignée myéloïde dans le foie fœtal puis la moelle osseuse, leur développement et leur survie sont fortement dépendantes du CSF-1 et de l'IL-34 (Lin et al., 2008) et de leur signalisation à travers le CSF-1R. En effet, chez les souris *op/op*, déficientes en *Csf1*, les monocytes sont drastiquement diminués (Wiktor-Jedrzejczak et al., 1982, 1990). Chez l'Homme, trois sous-populations sont identifiées selon l'expression des marqueurs CD14 et CD16 : la population prédominante CD14⁺CD16⁻, les CD14⁺CD16⁺ et CD14^{lo}CD16⁺. Ces trois populations constitueraient un continuum de différenciation mais leurs fonctions et phénotypes restent encore peu connus. Les monocytes CD14⁺CD16⁻ ont une faible demi-vie dans le sang avant de se différencier en CD14⁺CD16⁺ ou de disparaître de la circulation. Les études suggèrent que les monocytes CD14⁺ représentent les monocytes classiques et sont recrutés sur les sites d'inflammation afin de servir de précurseurs aux macrophages (Coillard and Segura, 2019; Ingersoll et al., 2010; Jakubzick et al., 2013). Les monocytes CD14^{lo}CD16⁺ représenteraient la dernière étape de différenciation et ne se différencient pas en macrophages mais semblent plutôt impliqués dans une fonction de sentinelle et de gardien des tissus vasculaires (Narasimhan et al., 2019; Ziegler-Heitbrock and Hofer, 2013). Chez la souris, en se basant sur leur transcriptome les monocytes Ly6C^{hi}CX3CR1^{int}CCR2⁺ et les Ly6C^{lo}CX3CR1^{hi}CCR2⁻ sont respectivement les équivalents des monocytes humains CD14⁺CD16⁻ et CD14⁻CD16⁺ (Narasimhan et al., 2019). De plus, chez la souris, les monocytes Ly6C^{lo} représentent une population anti-inflammatoire puisqu'ils peuvent générer des macrophages pro-régulateurs (Italiani and Boraschi, 2014; Misharin et al., 2014). Cependant les souris déficientes en monocytes Ly6C^{lo} présentent un nombre normal de macrophages, suggérant que ces monocytes ne génèrent pas de macrophages à l'homéostasie (Hanna et al., 2011). Le rat étant un modèle peu utilisé, le nombre d'outils est limité pour étudier les monocytes. De plus, les marqueurs identifiés ne permettent pas, pour la majorité, de définir spécifiquement les monocytes. Néanmoins, de façon courante les monocytes de rat sont identifiés par l'expression de SIRP α (ED9), de CD11b, de CD43 et de CD68 (ED1). L'utilisation du marqueur CD163 (ED2) permet de définir les macrophages tissulaires pro-inflammatoire

(CD68⁺CD163⁻) et anti-inflammatoire (CD68⁺CD163⁺), mais cette nomenclature manque de précision (Steiniger et al., 2001; Stehling, 2004).

3.2. Implication de l'IL-34 dans la différenciation et polarisation des macrophages à partir des monocytes

Lors d'une inflammation, les monocytes sont recrutés de la circulation sanguine dans le tissu via différentes chimiokines dont le MCP-1 sécrété par les fibroblastes activés, les cellules endothéliales, les monocytes et les lymphocytes (Deshmane et al., 2009). Quand les monocytes ont migré dans le tissu, le microenvironnement comprenant des facteurs de croissance, des cytokines et des dérivés microbiens, activent et polarisent via leur PRR les monocytes en macrophages. Ces cellules peuvent alors jouer leur rôle d'élimination du pathogène, des débris cellulaires et cellules mortes via la phagocytose accompagnée de la production de différentes cytokines. En tant que CPA, les macrophages peuvent présenter des peptides dérivés du pathogène à leur surface via le CMH nécessaire à l'activation de l'immunité adaptative. Puis, une fois le pathogène éliminé, les macrophages étant des cellules aux propriétés plastiques, elles procèdent aux mécanismes de réparation et de régénération tissulaire (Wynn et al., 2013). Afin de mieux définir les différents types de macrophages, des nomenclatures ont été instaurées et tentent de définir et catégoriser les macrophages selon leurs fonctions, néanmoins elles restent très controversées majoritairement à cause du manque de marqueurs pouvant définir l'ensemble des sous populations de macrophages (Murray et al., 2014) (**Figure 12**).

De façon classique les macrophages sont catégorisés soit en macrophage de type 1 (M1) ou de type 2 (M2). Les M1, aux fonctions pro-inflammatoires, constituent la première défense immunitaire et permettent la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs en Th1. Ils sont polarisés à partir des monocytes via une stimulation au LPS et/ou avec les cytokines Th1 : IFN γ , TNF α et le GM-CSF. La diversité des signaux suggère que plusieurs sous types de M1 peuvent être générés, mais la littérature reste encore peu claire. Stat1 est activé par les interférons de type 1 aboutissant à l'expression d'iNOS, tout comme la voie NF κ -B importante dans la forte sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23 et le TNF α et de ROS. Les M1 peuvent être définis par l'expression de plusieurs

marqueurs de surface comme CD64 et CD80, et également CD86 et le CMH-II. De plus, ces M1 éliminent les pathogènes via l'activation du système NADPH générant des ROS, mais ces mécanismes induisent en contrepartie des dommages tissulaires (Murray, 2017; Shapouri-Moghaddam et al., 2018).

C'est pourquoi, afin de rétablir l'homéostasie, les macrophages M2 au phénotype anti-inflammatoire/immuno-modulateur permettent de moduler la réponse inflammatoire vers des mécanismes de réparation et régénération tissulaire tout comme l'induction de l'angiogenèse et de la fibrose. Ces cellules conservent aussi leur capacité de phagocytose des débris et cellules apoptotiques. Les macrophages M2 sont polarisés via différentes cytokines en association ou non comme l'IL-4, l'IL-13, l'IL-10, l'IL-34 ou le CSF-1 (Svensson et al., 2011; Foucher et al., 2013). Une sous-classification des macrophages M2 permet de mieux les définir : M2a, M2b, M2c et M2d. Les M2a sont générés par l'IL-4 et l'IL-13 induisant Stat6 via l'IL-4R, ces cellules expriment alors fortement CD206, CD80, IL-1RII, l'IL-1R α , l'IL-10, le TGF β , CCL17, CCL18, CCL22 et CCL24. Par ailleurs, l'ajout d'IL-33 amplifie la polarisation induite par l'IL-13 permettant d'augmenter l'expression d'Arg-1, de CCL17 et de CCL24 (Kurowska-Stolarska et al., 2009). Les M2b sont induits par les complexes immuns, les agonistes des TLR ou bien les ligands de l'IL-1R. De façon paradoxale, cette sous-classe sécrète des cytokines pro- et anti-inflammatoires comme l'IL-10, l'IL-1 β , l'IL-6, le CCL1 ou le TNF α et expriment à leur surface fortement CD80 et CD14 et faiblement HLA-DR. Pour polariser les M2c, l'ajout de glucocorticoïdes ou d'IL-10 est nécessaire. Ces macrophages sécrètent alors de fort taux d'IL-10 et de TGF β permettant d'éliminer les cellules apoptotiques. Un des marqueurs des M2c est la forte expression de CD163, à l'inverse ces cellules expriment faiblement CD86 et HLA-DR. Enfin, la sous-classe des M2d ou *tumor-associated macrophages* (TAM) qui est générée par une stimulation via des agonistes de TLR ou le récepteur à l'adénosine induit la suppression de la production de cytokines pro-inflammatoires et la forte production d'IL-10 et de *vascular endothelial growth factor* (VEGF) lui conférant des capacités d'angiogenèse (Murray, 2017; Shapouri-Moghaddam et al., 2018). Les TAM expriment à leur surface CD163, ILT2, ILT3 ainsi que l'IL-1 α membranaire (Duluc et al., 2007). De plus, Foucher *et al.* ont démontré que l'IL-34 et le CSF-1 permettaient d'induire des macrophages M2 avec un phénotype similaire aux TAM (Foucher et al., 2013, 2015).

M2

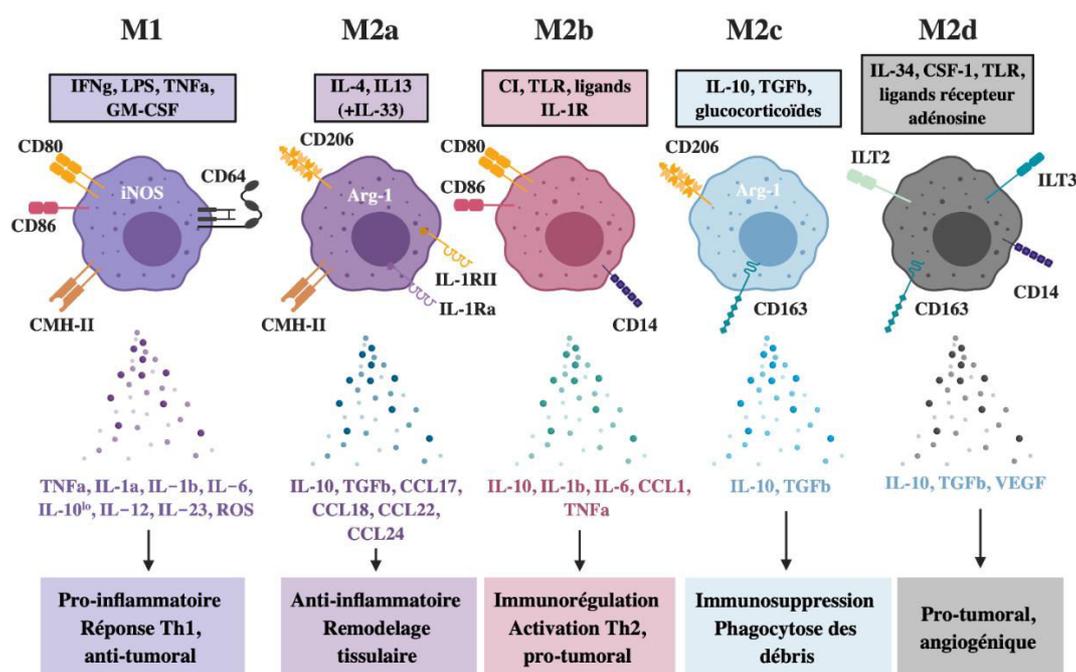


Figure 12: Schéma représentant les stimuli d'induction des différents sous-types de macrophages et leurs phénotype/fonctions associés.

Les macrophages étant des cellules aux propriétés plastiques, l'exposition de M2 à des signaux de polarisation M1 permet de reprogrammer ces cellules, et vice versa. Cet équilibre M1/M2 permet ainsi de conserver une réponse inflammatoire optimale tout en préservant à un retour à l'homéostasie. Un déséquilibre de ce ratio est associé à une inflammation chronique pouvant aboutir au développement de pathologies. Par exemple, l'IFN γ et le GM-CSF sont capables *in vitro* de modifier des M2 induits par l'IL-34 vers un phénotype de M1 en inhibant drastiquement l'expression d'IL-10 en faveur de l'IL-12, CD80 et CD86 (Foucher et al., 2013).

4. Régulation de l'IL-34

L'IL-34 est une cytokine exprimée de façon spécifique et semble agir de façon locale, ainsi l'étude des mécanismes à l'origine de son induction ou inhibition est nécessaire pour comprendre sa physiologie afin d'utiliser ces connaissances en thérapie.

Différentes études ont démontré que l'induction de l'IL-34 était dépendante de différents stimuli pro-inflammatoires et de stress cellulaire tels que les agents d'altération

de l'ADN, les ligands des TLR comme PGN, CpG et poly(I:C) ainsi que les PAMP. D'autres stimuli comme la forme active de la vitamine D et les infections virales permettent aussi l'expression de l'IL-34 par les neurones (Zhang et al., 2017) et hépatocytes respectivement. Par ailleurs, les traitements de chimiothérapie augmentent aussi l'expression de l'IL-34 notamment dans les cancers pulmonaires et les mélanomes (Baghdadi et al., 2016; Han et al., 2018). Les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et le TNF α activent l'expression de l'IL-34 via les voies de signalisation NF- κ B et JNK par les fibroblastes, les cellules épithéliales, les ligaments parodontaux, les ostéosarcomes ainsi que par les adipocytes (Guillonnet et al., 2017a; Baghdadi et al., 2018b). L'activation des TLR permet d'induire l'expression d'IL-34 par les adipocytes (Chang et al., 2014) et les cellules de la lamina propria dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Franzè et al., 2015).

A l'inverse, certaines études ont démontré que l'expression de l'IL-34 pouvait être diminuée. Dans la polyarthrite rhumatoïde, une équipe a mis en évidence que le TGF β 1 et BMP2 étaient des inhibiteurs d'IL-34 des fibroblastes synoviaux (Chemel et al., 2017). Ou encore dans l'infection par le virus de l'hépatite B, miR-28-5p est impliqué dans l'inhibition de l'IL-34 (Zhou et al., 2016b)

III. Les rôles biologiques de l'IL-34 dans les pathologies : une cytokine aux multiples facettes

1. L'IL-34 est exprimée dans de nombreuses pathologies

Depuis la découverte de l'IL-34 et de son potentiel comme cible ou outil thérapeutique, de nombreuses équipes étudient le lien entre l'IL-34 et des pathologies comme les désordres neurologiques, les maladies de la peau, les cancers, les maladies auto-immunes, les maladies inflammatoires, ou le rôle de cette cytokine en transplantation, dans les infections, les désordres métaboliques et dans les maladies cardiaques (**Tableau III**). Le rôle exact de l'IL-34 dans ces pathologies est encore controversé et parfois contradictoire. Certaines études affirment que l'IL-34 est une cytokine pro-inflammatoire (Franzè et al., 2015; Baghdadi et al., 2017; Baek et al., 2015; Khoshnan et al., 2017) mais d'autres études démontrent sa capacité à induire des macrophages pro-régulateurs ainsi que son rôle dans les fonctions suppressives des Tregs (Guillonnet et al., 2007a; Foucher et al., 2013; Bézie et al., 2015a; San Segundo et al., 2016; Zhao et al., 2018a; Baghdadi et al., 2019). Les actions de

l'IL-34 restent à être élucidées, son expression plus locale que celle de CSF-1 peut suggérer des fonctions dépendantes de l'environnement. De plus ses effets via ses autres récepteurs, PTP ζ et CD138 sont peu étudiés.

		Stimuli	Inhibition	Expression (vs HV)	Source cellulaire
Maladies neurologiques	Maladie d'Alzheimer	Vitamine D	ND	Diminution	Neurones
	Sclérose en plaque	ND	ND	Similaire	Neurones
	Maladie d'Huntington	Agrégats mHTTX1	ND	Augmentation	Neurones
	Psoriasis	ND	ND	Augmentation (dans la forme arthritique)	Kératinocytes ?
	Dermatite atopique	ND	ND	Diminution (lésions)	Kératinocytes ?
Cancers	Ostéosarcome	ND	ND	Augmentation	Ostéoclastes
	Myélome multiple	ND	ND	Augmentation	Cellules cancéreuses
	Cancer pulmonaire chimio-résistant	Chimiothérapie	ND	Augmentation	Cellules cancéreuses
	Mélanome résistant	Chimiothérapie	ND	Augmentation	Cellules cancéreuses
	Hépatocarcinome cellulaire	ND	miRNA-28-5p	Augmentation	Cellules cancéreuses
	Cancer colorectal	ND	ND	Augmentation	Cellules cancéreuses et lamina propria
Maladies auto-immunes	Polyarthrite rhumatoïde	TNF α , IL-1 β	TGF β , BPM2, anti-TNF α	Augmentation	Fibroblastes synoviaux
	Lupus érythémateux systémique	ND	ND	Augmentation	ND
	Syndrome de Sjögren	ND	ND	Augmentation	Cellules épithéliales salivaires péri-lésionnelles
Inflammation	Parodontite	TNF α , IL-1 β	ND	Augmentation	Ligaments parodontaux, fibroblastes gingivaux
	Maladie inflammatoires chroniques de l'intestin	IL-6, TNF α , PGN, poly(I:C), CpG	Anti-TNF α	Augmentation	Lamina propria
	NAFLD	TNF α	ND	Augmentation	Fibroblastes
	Ischémie/Reperfusion	ND	ND	Augmentation	Cellules épithéliales tubulaires rénales
	Transplantation	Blocage de la voie de co-stimulation CD40-CD40L, ischémie/reperfusion	ND	Augmentation	Cellules épithéliales tubulaires rénales, Tregs CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ et Tregs CD8 ⁺ FoxP3 ⁺
Infections	HCV	ND	ND	Augmentation	Hépatocytes
	HBV	ND	ND	Augmentation/Diminution	Hépatocytes
	HIV	ND	ND	Similaire chez l'Homme/Augmentation chez le cheval	ND
	Influenza A	IL-22	ND	Augmentation	PBMC
	<i>Candida albicans</i>	ND	ND	Augmentation	Kératinocytes
	Choc septique	ND	ND	Augmentation	ND
	Interface fœto-maternelle	ND	ND	Normale	Cyto- et syncytiotrophoblastes
Perturbations métaboliques	Obésité	TNF α , IL-1 β	Chirurgie "by-pass"	Augmentation	Adipocytes
	Diabète	ND	ND	Augmentation	ND
	Insuffisance cardiaque	ND	ND	Augmentation	ND

Tableau III: Tableau regroupant l'expression de l'IL-34 dans les différentes pathologies. HV : healthy volunteer (volontaires sains).

Certaines de ces études sont basées sur des corrélations entre la progression et la sévérité de la pathologie et le taux d'IL-34, néanmoins peu d'entre elles mettent en évidence si l'IL-34 est la cause ou la conséquence de l'induction de la pathologie. En effet, les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF α sont retrouvées dans différentes études comme induisant l'expression de l'IL-34. Son expression peut donc aussi être induite dans un but de compensation de l'environnement pro-inflammatoire délétère. Par ailleurs les taux moyens d'IL-34 sérique retrouvés chez les volontaires sains varient énormément entre les études. En effet, certaines études retrouvent des taux très faibles voire indétectables, et d'autres équipes indiquent des concentrations moyennes nettement plus importantes. Ces différences peuvent expliquer les conclusions contradictoires.

2. Les rôles de l'IL-34 dans le SNC à travers la génération/homéostasie de la microglie

2.1. Le rôle dichotomique de l'IL-34 dans les maladies neurologiques

Les récepteurs de l'IL-34, CSF-1R et PTP ζ sont exprimés au niveau du SNC par la microglie où l'IL-34 semble avoir des effets bénéfiques et délétères en fonction du contexte (**Figure 13**). Ce rôle dichotomique peut être lié à sa capacité de génération et d'homéostasie de la microglie. Cette population joue un rôle crucial de sentinelle du SNC ainsi que dans le remodelage des synapses neuronales pendant le développement et l'homéostasie. Les capacités de plasticité de la microglie suggèrent une hétérogénéité en fonction de son environnement (Li and Barres, 2018). Ainsi, l'étude de la contribution de la microglie en terme de prolifération et d'activation est un des enjeux dans la compréhension du développement des maladies du SNC. Dans certaines conditions le rôle de la microglie reste controversé. Par exemple, dans le cas d'une infection avec les prions, une étude indique que le blocage de CSF-1R permet de limiter la prolifération et l'activation de la microglie ainsi que de réduire les dommages neuronaux démontrant la participation délétère de la microglie (Gomez-Nicola et al., 2013). A l'inverse dans une autre étude, la déplétion de la microglie *in vitro* et *in vivo* avec l'utilisation des souris *I134^{LacZ/LacZ}* déficientes en microglie, l'infection avec les prions résulte d'un effet protecteur médié par la microglie. En effet, les agrégats de prions sont nettement augmentés *in vitro* et chez les souris *I134^{LacZ/LacZ}* suggérant qu'en cas d'infection, la microglie permettrait de phagocyter les agrégats limitant le

développement de la pathologie (Zhu et al., 2016) (**tableau IV, p71**). La microglie représente une population de cellules plastiques très sensibles à l'environnement, ainsi son rôle peut varier selon le contexte. Dans ce cadre, différentes études se sont intéressées au rôle de l'IL-34 dans les pathologies du SNC.

a. Les implications neuro-protectrices de l'IL-34

i. La maladie d'Alzheimer

Dans la maladie d'Alzheimer, l'IL-34 joue un rôle bénéfique. Cette maladie neurodégénérative multifactorielle est caractérisée par une accumulation de plaques anormales d'amyloïdes β ($A\beta$), une hyperphosphorylation de tau, un stress oxydatif et autres processus pathogéniques (James and Bennett, 2019). Néanmoins, les plaques $A\beta$ sont un critère majeur dans cette pathologie et induisent une neurotoxicité importante. En effet, elles inhibent la potentialisation à long terme de l'hippocampe (diminuant les capacités de mémoire), augmentent l'état de dépression sur le long terme et rompent la plasticité synaptique. De plus, les plaques $A\beta$ induisent des ROS suite à l'activation des récepteurs *N-methyl-D-aspartate* (NMDA). Dans la maladie d'Alzheimer, la microglie participe à la progression de la maladie via l'expression de cytokines pro-inflammatoires, de protéines du complément et de radicaux libres. Mais elle joue aussi un rôle protecteur via sa capacité de phagocytose, de sécrétion de facteurs neuro-protecteur et de dégradation des plaques $A\beta$ (Wang et al., 2017c).

Ainsi, des études se sont intéressées à l'implication de l'IL-34 dans le développement de cette pathologie. Dans le modèle transgénique murin APP/PS mimant la maladie d'Alzheimer, l'IL-34 est produite par les neurones et joue un rôle neuro-protecteur important via CSF-1R exprimé par la microglie. L'IL-34 permet d'induire la prolifération et l'expression d'IDE, d'HO-1 et du TGF β par la microglie. IDE est une enzyme requise pour la dégradation et l'élimination des plaques $A\beta$ et HO-1 est une enzyme anti-oxydante inhibant les ROS induits par les plaques $A\beta$ (Mizuno et al., 2011a). Le TGF β a été identifié comme neuro-protecteur protégeant les neurones contre l'excitotoxicité (destruction neuronale due à la sur-activation des récepteurs NDMA ou AMPA), l'hypoxie, l'ischémie et la toxicité due aux plaques $A\beta$ (Ma et al., 2012a) (**tableau V, p80**). Une autre étude a démontré une expression de *Csf1r* par une sous-population de neurones présents dans l'hippocampe (1%-2%) qui est

augmentée lors d'une inflammation. Ainsi, l'IL-34 peut agir directement sur les neurones de l'hippocampe dans le cas d'une toxicité générée par l'acide kaïnique en induisant une réparation neuronale et protéger contre l'excitotoxicité via l'activation de la voie de signalisation CREB (Luo et al., 2013a). Ce rôle protecteur dans la maladie d'Alzheimer est conforté par une étude chez l'Homme, dans laquelle l'IL-34 est nettement moins exprimée chez les patients atteints de la pathologie comparés à des patients contrôles non déments (Walker et al., 2017). De plus, la vitamine D a été suggérée comme bénéfique dans la maladie d'Alzheimer. En effet, il semblerait qu'elle permette d'améliorer la capacité de phagocytose des plaques A β par les macrophages (Lu'o'ng and Nguyen, 2013; Masoumi et al., 2009; Mizwicki et al., 2012). De plus, une autre équipe a mis en évidence que la forme active de la vitamine D : 1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ permet l'induction de l'expression de l'IL-34 par la lignée cellulaire neuronale SH-SY5Y (Zhang et al., 2017) suggérant son utilisation en thérapie dans la maladie d'Alzheimer. Ainsi, identifier les mécanismes aboutissant à la diminution d'IL-34 chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer pourrait permettre d'établir une stratégie thérapeutique dans le but d'augmenter l'IL-34. Cette dernière pourrait alors exercer ses fonctions d'homéostasie de la microglie et d'induction d'IDE et HO-1 nécessaires à l'élimination des plaques A β .

De façon intéressante, les patients atteints de la maladie d'Alzheimer présentent une expression sérique moins importante de CSF-1 (Ray et al., 2007) alors que l'expression de son messenger *Csf1* est plus élevée dans le cerveau, à l'inverse de l'*Il34* (Walker et al., 2017). L'injection de CSF-1 chez les souris APP/PS permet aussi d'améliorer les fonctions cognitives en diminuant le niveau des plaques A β (Boissonneault et al., 2009; Luo et al., 2013a).

ii. La sclérose en plaque

La sclérose en plaque est une maladie dont les mécanismes de développement et de progression sont encore peu connus. C'est une maladie chronique démyélinisante du SNC médiée par le système immunitaire. Les patients présentent une inflammation, des plaques démyélinisées et des dommages des axones. La progression de la pathologie est hétérogène entre les patients. La majorité des patients développent une phase aiguë transitoire avec des déficits neurologiques (*relapsing remitting multiple sclerosis* : RRMS). Mais au cours du temps, ces troubles neurologiques persistent après les épisodes de rechute (*secondary*

progressive multiple sclerosis : SPMS). Une minorité de patients développent une maladie progressive sans période de rémission (*primary progressive multiple sclerosis* : PPMS) (Filippi et al., 2018). Des modèles murins d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) ont été développés depuis l'identification d'antigènes du SNC capables d'induire des symptômes ressemblant aux patients. En effet, une immunisation avec des protéines telles que *myelin basic protein* (MBP) ou *myelin oligoglycoprotein* (MOG) en association avec de l'adjuvant complet de Freund permet d'expandre des clones de lymphocytes T spécifiques de l'antigène. L'ajout de toxine pertussique rompt l'intégrité de la BHE permettant aux lymphocytes T de migrer dans le SNC et d'induire des lésions axonales et déficits neuronaux. Dans ces modèles d'EAE, les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ jouent un rôle pathogénique. En effet, les lymphocytes T CD4⁺ se différencient en Th1 et Th17 selon l'environnement et sécrètent alors de l'IFN γ , de l'IL-12 et de l'IL-17. L'implication des lymphocytes T CD8⁺ a été mise en évidence dans un second temps avec l'observation que les patients atteints de sclérose en plaque présentent un nombre absolu de lymphocytes T CD8⁺ nettement plus important que de lymphocytes T CD4⁺ (Lassmann and Bradl, 2017; Glatigny and Bettelli, 2018). Néanmoins, l'utilisation de ces modèles EAE dans l'étude de la pathologie de la sclérose en plaque est très controversée étant donné que l'origine de cette pathologie n'est pas connue. En effet, l'induction de la sclérose en plaque ne semble pas provenir d'un peptide du SNC présenté en périphérie activant les lymphocytes.

Une récente étude s'est intéressée au rôle de l'IL-34 dans le développement de l'EAE. Cette équipe a mis en évidence la présence d'une sous-population de microglie CD11c⁺ qui augmente lors d'une inflammation du SNC. Cette sous-population présente une faible capacité immuno-stimulatrice de Th1 et Th17 suggérant un rôle protecteur (Wlodarczyk et al., 2014). L'administration d'IL-34 ou de CSF-1 permet de stimuler la prolifération via l'interaction avec CSF-1R de manière CCL2 dépendante. Ainsi dans un modèle d'EAE, l'équipe a démontré l'effet protecteur de ces cytokines. En effet, l'IL-34 et le CSF-1 permettent d'inhiber la sévérité de la pathologie via l'induction de la prolifération de la microglie CD11c⁺ suggérant leur potentiel thérapeutique (**tableaux IV et V, p71 et p80**). Par ailleurs, cette population n'étant pas présente à l'état basal, les auteurs suggèrent qu'elle provient du recrutement et de la différenciation de monocytes circulants (Wlodarczyk et al., 2019). L'implication de l'IL-34 dans ce modèle de sclérose en plaque semble bénéfique, mais une étude dans une cohorte de patients atteints de la forme RRMS traités ou non traités a mis en

évidence que le taux sérique d'IL-34 ne varie ni en fonction du traitement ni au cours du temps et reste similaire à des volontaires sains (Abdel-Dayem et al., 2019). Néanmoins, l'effet de l'IL-34 semble être local et spécifique, ainsi étudier son taux dans le liquide cérébro-spinal pourrait permettre de vérifier ces résultats.

iii. Le rétablissement de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique

Dans les maladies neurodégénératives du SNC, l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) est généralement rompue causée par des cytokines pro-inflammatoires qui diminuent l'expression des jonctions serrées. Or, constituée de cellules endothéliales capillaires, de péricytes et d'astrocytes, la BHE joue un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie du SNC (Sweeney et al., 2018). Une équipe a mis en évidence, que les cellules endothéliales capillaires expriment CSF-1R, l'IL-34 peut alors interagir avec les cellules endothéliales ayant pour conséquences d'antagoniser les effets des cytokines pro-inflammatoires TNF α et IL-1 β . En effet, l'IL-34 permet l'augmentation de l'expression des protéines des jonctions serrées claudin-5 et d'occludine, rétablissant l'intégrité de la BHE (Jin et al., 2014). Ces résultats suggèrent le potentiel thérapeutique de l'IL-34 dans les maladies du SNC via ses capacités à stimuler une microglie au phénotype protecteur et à rétablir l'intégrité de la BHE (**tableau V, p80**). Le rôle de CSF-1 dans la restauration de l'intégrité de la BHE n'a pas été étudié, cependant ce mécanisme est induit par le récepteur CSF-1R ainsi son implication ne peut être exclue.

b. L'implication neurodégénérative de l'IL-34 dans la maladie d'Huntington

Dans la maladie d'Huntington, le rôle de l'IL-34 semble délétère et promeut la neuro-dégénération. Cette pathologie héréditaire se caractérise par l'accumulation de protéines anormales mHTTx1 dans le système nerveux central, qui induit une activation aberrante de voies de signalisation, une modification du transcriptome et une neuro-dégénération (McColgan and Tabrizi, 2018). La microglie semble impliquée dans le développement de la pathologie puisque son état d'activation permet de prédire son initiation (Crotti et al., 2014). Les agrégats de mHTTx1 induisent l'expression d'IL-34 et de la pro-caspase 3 par les

neurones, de manière dépendante de la voie de signalisation IKK β impliquée dans le clivage des protéines mHTT amyloïdogéniques (Khoshnan et al., 2004). Mais l'IL-34 seule n'est pas impliquée dans l'accumulation de mHTTx1 ni dans le clivage de la pro-caspase 3, forme active aboutissant à l'apoptose de la cellule. Cependant, la surexpression d'IL-34 en association à une accumulation des agrégats de mHTTx1 chez le rat conduit à une forte perte neuronale médiée par la microglie (Khoshnan et al., 2017) (**tableau V, p80**).

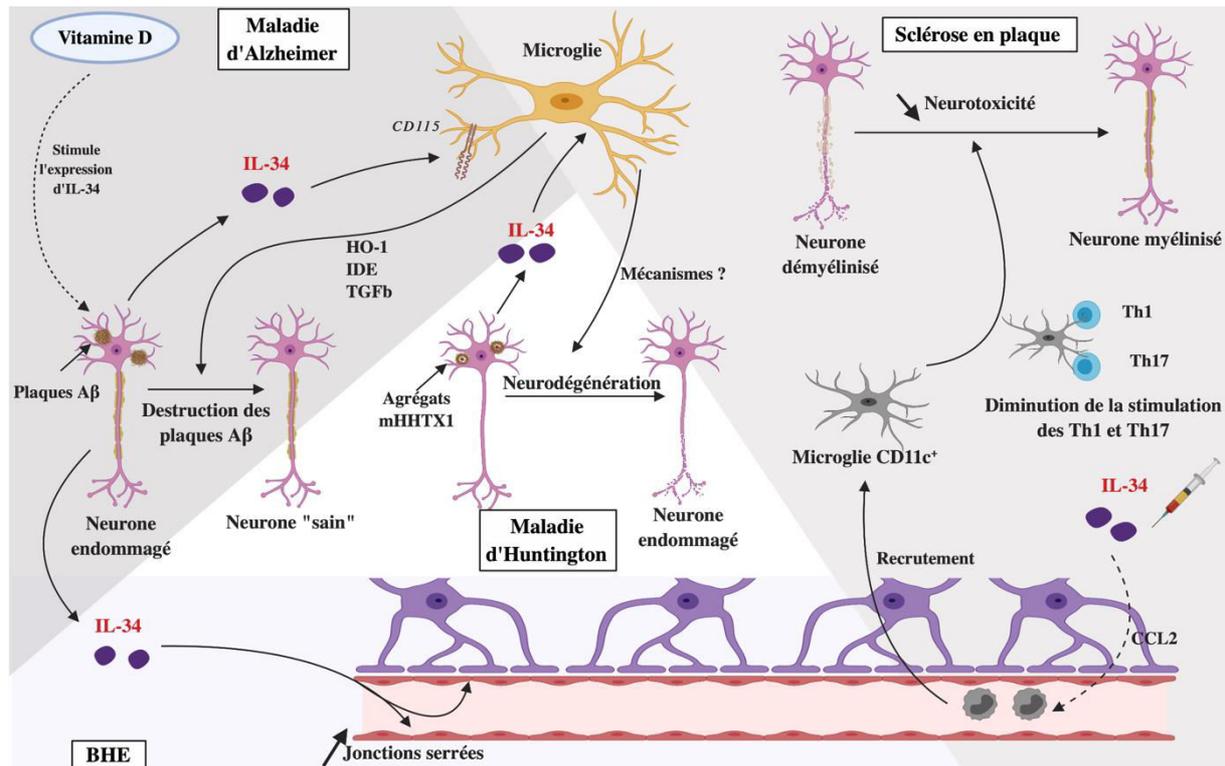


Figure 13: Schéma représentant les implications de l'IL-34 dans les pathologies du SNC. BHE : barrière hémato-encéphalique ; A β : plaques anormales d'amyloïdes β .

3. Les rôles de l'IL-34 à travers la génération/homéostasie des cellules de Langerhans

Les cellules de Langerhans partagent des fonctions spécifiques aux macrophages et cellules dendritiques, leur classification est donc paradoxale. En effet, retrouvées dans l'épiderme, l'épithélium stratifié de la cornée, buccal, gingival et dans la muqueuse intestinale, elles se maintiennent localement par prolifération comme les macrophages. Mais à l'inverse des macrophages et de façon similaire aux cellules dendritiques, les cellules de Langerhans sont capables de capturer un antigène, de migrer dans les nœuds

lymphatiques puis de stimuler les lymphocytes T afin de déclencher une réponse immunitaire. Les cellules de Langerhans deviennent pleinement matures après la naissance avec l'expression des marqueurs CD207 (langérine), CMH-II et CD11c (Doebel et al., 2017). La déficience en cellules de Langerhans dans le modèle *I134^{LacZ/LacZ}* en fait un modèle d'étude important pour définir le rôle de ces cellules.

Les souris *I134^{LacZ/LacZ}* présentent une déficience de ces cellules et sont moins sensibles à la réponse induite par l'application de l'haptène DNFB avec une production d'IFN γ par les lymphocytes T drainants moins importante que par les cellules des souris *I134^{+/+}*. De la même manière, dans un modèle d'infection par *Candida albicans*, la réponse immune est amoindrie chez les souris déficientes en *I134* (Wang et al., 2012a). Ces résultats suggèrent que les cellules de Langerhans sont nécessaires au développement de la réponse d'hypersensibilité de contact (CHS) (**tableaux IV et V, p71 et p80**).

De manière similaire dans les modèles de psoriasis, le rôle des cellules de Langerhans est à définir. L'application d'Imiquimod (un agoniste du TLR7) sur la peau des animaux génère une activation des lymphocytes T $\gamma\delta$ et des *innate lymphoid cells* (ILC) produisant de l'IL-17 à l'origine de lésions (van der Fits et al., 2009; Cai et al., 2011; Pantelyushin et al., 2012). Greter *et al.* ont montré grâce aux souris déficientes en *I134*, que les cellules de Langerhans n'avaient pas d'impact dans la réponse induite (Greter et al., 2012). Mais une autre étude met en avant que les cellules de Langerhans sont activées suite à l'administration d'Imiquimod, induisant les signaux pro-inflammatoires nécessaires à l'établissement de la réponse immune dans ce modèle (Xiao et al., 2017). Chez l'Homme, le psoriasis est une maladie auto-immune de la peau pouvant aboutir à de l'arthrite psoriasique. Le taux sérique d'IL-34 est plus élevé chez les patients souffrant de la forme arthritique par rapport aux patients non arthritique et contrôles sains, néanmoins ce taux corrélant avec le nombre d'ostéoclastes précurseurs circulants (Li et al., 2017). Ainsi, il semblerait que le rôle délétère de l'IL-34 soit majoritairement dû à sa capacité d'ostéoclastogénèse plutôt qu'à son rôle dans la génération des cellules Langerhans. Néanmoins, dans la dermatite atopique, une maladie de la peau, les taux d'IL-34 sont plus faibles dans les zones lésées que dans les zones saines suggérant un rôle protecteur de l'IL-34 dans le développement de cette pathologie (Esaki et al., 2015). Mais l'implication des cellules de Langerhans ou des macrophages dermiques n'a pas été identifiée.

4. Les rôles de l'IL-34 à travers la génération de macrophages

4.1. *Le rôle néfaste de l'IL-34 dans les cancers via les TAM*

Une analyse génomique intégrative a révélé que l'IL-34 était exprimée dans de nombreux cancers (sang, cerveau, sein, yeux, tête, cou, poumons, ovaires et peau). De plus, les résultats ont indiqué une association entre l'IL-34 et le mauvais pronostic suggérant son implication dans le développement tumoral. Cependant, les variables inter-cancers sont importantes, les auteurs précisent que l'IL-34 n'est pas soit pro- ou anti-tumoral, et peut donc participer dans l'immunité pro- et anti-tumorale (Wang et al., 2015a). L'IL-34 a été identifiée dans différents cancers comme dans les tumeurs à cellules géantes, les ostéosarcomes, les cancers ovariens, les cancers pulmonaires, les cancers du foie, les cancers colorectaux, les mélanomes et cancers du sein et est impliquée dans différents processus dans le microenvironnement tumoral (**Figure 14**).

Les tumeurs à cellules géantes se caractérisent par la présence d'ostéoclastes, de macrophages CD68⁺ et de cellules stromales induisant une destruction osseuse sévère. L'implication de CSF-1 dans ce cancer a été mise en évidence précédemment grâce à sa capacité à induire l'ostéoclastogénèse en présence de RANKL (Hodge et al., 2007). Partageant certaines des fonctions de CSF-1, l'IL-34 est exprimé par les ostéoclastes et plus faiblement par les cellules stromales des tumeurs à cellules géantes. Chez la souris et l'Homme, l'IL-34 est capable de substituer le CSF-1 dans la génération d'ostéoclastes en association au RANKL à partir de précurseurs murins CD11b⁺ et monocytes humains CD14⁺ (**tableau V, p80**). Cette génération est dépendante de la voie de signalisation ERK1/2 en aval de CSF-1R. Cependant l'IL-34 ne permet pas la survie des ostéoclastes mais favorise leur adhésion et prolifération (Baud'huin et al., 2010). Le rôle de l'IL-34 dans la formation d'ostéoclastes a aussi mis en évidence dans le myélome multiple (Baghdadi et al., 2019). Les ostéosarcomes sont dans cancers osseux hautement agressifs. L'IL-34 est exprimée fortement dans ce cancer et sa surexpression dans un modèle tumoral chez la souris induit une progression tumorale accélérée ainsi qu'une augmentation des métastases pulmonaires (**tableau IV, p71**). De façon intéressante, dans ces tumeurs le nombre de vaisseaux nouvellement formés (CD146⁺) est plus important, mettant en évidence la capacité pro-angiogénique de l'IL-34. De plus, l'IL-34 induit l'adhésion et le recrutement des TAM

favorisant l'environnement anti-inflammatoire et la progression tumorale (Ségaly et al., 2015b)(**tableau V, p80**).

Dans le microenvironnement tumoral, l'IL-34 favorise la génération de macrophages/TAM qui participent à la progression tumorale via la sécrétion de cytokines régulatrices comme l'IL-10 et le TGF β . En effet, l'IL-34 est capable d'induire des macrophages CD14⁺CD68⁺ à partir de leucémies monocytaires, néanmoins l'IL-34 ne permet pas d'induire leur croissance ou prolifération, seulement leur survie (Booker et al., 2015). De plus, dans les cancers ovariens les TAM expriment l'IL-1 α membranaire qui permet de générer des Th17 à partir de lymphocytes T CD4⁺ mémoires. De plus Foucher *et al.* ont démontré que l'IL-34 permet de différencier les monocytes en macrophages M2 IL-10^{hi}IL-12^{lo}CMH-II^{lo}CD80⁻CD86^{lo} (Foucher et al., 2013) et expriment aussi l'IL-1a membranaire, leur conférant la capacité d'induire des Th17 (Foucher et al., 2015) (**tableau V, p80**). Ces résultats démontrent que les macrophages différenciés par l'IL-34 peuvent jouer un rôle pro- et anti-tumoral. Des études supplémentaires sont nécessaires pour évaluer la participation anti-tumorale des TAM en fonction du type de cancer.

Dans les cancers chimio-résistants, l'IL-34 participe à la progression tumorale via le recrutement et induction de TAM. L'équipe de Baghdadi *et al.* a développé un modèle de cellules pulmonaires cancéreuses chimiorésistantes. Ces dernières expriment l'IL-34 qui permet d'induire des macrophages M2 CD68⁺CD163⁺IL-10⁺TGF β ⁺ similaires aux TAM capables d'inhiber efficacement la prolifération des lymphocytes T. Dans un modèle *in vivo* de croissance tumorale chez la souris humanisée, la surexpression de l'IL-34 induit une progression tumorale augmentée avec un infiltrat de TAM est plus important, démontrant le rôle de l'IL-34 dans l'induction d'un environnement tolérogène. De plus, l'expression de l'IL-34 dans le cancer pulmonaire corrèle avec un mauvais pronostic (Baghdadi et al., 2016). Par ailleurs, l'espérance de vie est nettement réduite lorsque l'IL-34 et le CSF-1 sont fortement co-exprimés par rapport à une expression faible ou absente de ces cytokines (Baghdadi et al., 2018a). L'IL-34 a aussi été étudiée dans les mélanomes résistants. Les traitements inhibiteurs des voies MAPK/ERK permettent d'améliorer la survie mais les patients finissent par rechuter. En effet, bien qu'ils inhibent efficacement ces voies, un rebond de la phosphorylation de ERK restaure l'activité de la voie MAPK aboutissant à la progression tumorale. L'IL-34 et le CSF-1 étant les ligands de CSF-1R, ils sont co-exprimés et surexprimés par les cellules cancéreuses résistantes suggérant une activité autocrine

favorisant l'invasion, la prolifération et la survie du mélanome (Giricz et al., 2018; Han et al., 2018).

Dans le cholangiocarcinome, l'initiation semble médiée par des cellules souches cancéreuses (CSC) générant un environnement immunosuppresseur. En effet, ces CSC induisent des TAM via l'expression de différentes cytokines comme l'IL-34 ou l'IL-13 (Raggi et al., 2017). L'infiltration des TAM induite par l'IL-34 dans l'hépatocarcinome cellulaire (HCC) est un facteur indépendant de mauvais pronostic et associée à la fibrose (Noda et al., 2019). L'équipe de Zhou *et al.* a identifié un micro-ARN induisant l'inhibition de l'expression de l'IL-34. En effet, *in vitro* une surexpression de miR-28-5p diminue l'expression de l'IL-34 et inversement. Dans un modèle *in vivo*, une déficience en miR28-5p accélère la progression tumorale ainsi que la formation de métastases. L'infiltration de TAM médiée par l'IL-34 induit une boucle de rétroaction via la sécrétion de TGFβ1 qui inhibe l'expression de miR-28-5p. Ainsi, les patients ayant à la fois un taux élevé de miR-28-5p et un faible taux d'IL-34 et d'infiltration de TAM ont un meilleur pronostic de survie que les patients présentant des données inverses. L'expression de miR-28-5p peut donc être utilisée comme facteur pronostic (Zhou et al., 2016b). Cependant, ces résultats sont à confirmer, en effet le modèle *in vivo* consiste en l'injection de cellules tumorales humaines chez une souris nude, or l'IL-34 murine ne possède que 68,2% d'homologie avec l'IL-34 humaine. L'infiltration des TAM par l'IL-34 est donc à confirmer. L'implication de l'IL-34 dans le développement tumoral a aussi été mise en évidence dans le cancer colorectal. L'IL-34 est exprimé par les cellules cancéreuses ainsi que par les cellules mononuclées de la lamina propria. De plus, ses récepteurs CSF-1R et PTPζ sont exprimés par les cellules cancéreuses. Ainsi l'IL-34 induit via la voie de signalisation ERK1/2, la prolifération et l'invasion des cellules cancéreuses sans affecter leur survie (Franzè et al., 2017). Néanmoins dans un modèle murin tumoral de cellules de colon (lignée MC38), l'utilisation d'un anticorps bloquant l'IL-34 n'a aucun effet sur l'infiltration du microenvironnement ni sur le phénotype des cellules. A l'inverse, bloquer le CSF-1 dans ce même modèle permet de diminuer l'infiltrat en TAM présentant une augmentation de l'expression de NOS2, CD86, Arg-1, CMH-II et PD-L1 altérant leurs fonctions. La combinaison du blocage de l'IL-34 et CSF-1 améliore légèrement les effets mais pas de façon significative (Lin et al., 2019) (**tableau IV, p71**).

A l'inverse des autres cancers décrits, une expression élevée d'IL-34 dans le cancer du sein corrèle avec l'amélioration de la survie et un meilleur pronostic mais dépend du sous-

type du cancer. Son rôle dépend de l'expression de ses récepteurs au sein du microenvironnement tumoral (Zins et al., 2018).

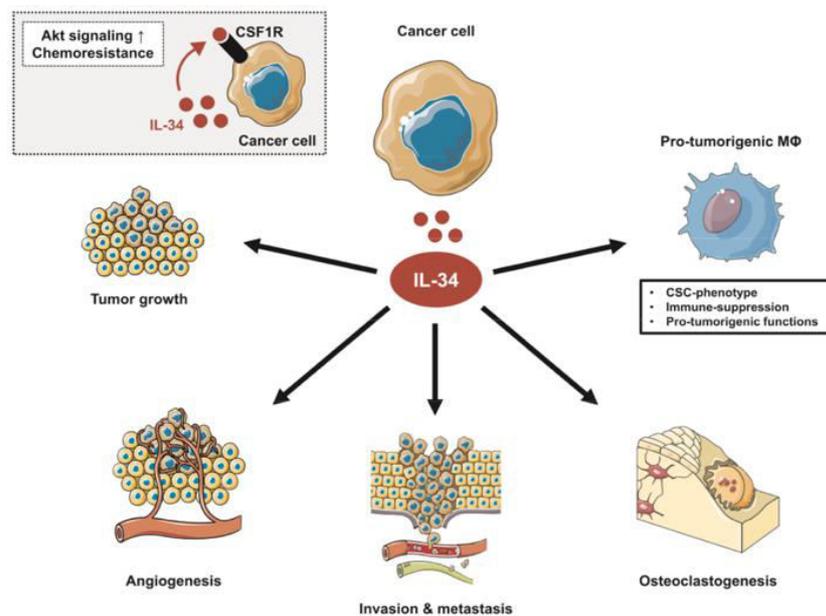


Figure 14: Schéma représentant les implications de l'IL-34 dans les cancers (Baghdadi et al., 2017).

4.2. Les rôles de l'IL-34 dans les maladies auto-immunes

a. L'implication délétère de l'IL-34 dans la polyarthrite rhumatoïde via les ostéoclastes

La polyarthrite rhumatoïde est une maladie auto-immune inflammatoire du cartilage des articulations. Elle se caractérise généralement par la présence d'auto-anticorps anti-IgG (ou facteur rhumatoïde) et anti-protéines citrullinées (ACPA). Sans traitement les patients développent une destruction osseuse importante aboutissant à des handicaps sévères. Un ensemble de facteurs de risque génétique induisent la formation de néoantigènes dus aux post-modifications traductionnelles de citrullination qui activent les CPA puis les lymphocytes T et B. Ces derniers vont migrer dans le synovium et sécréter de nombreuses cytokines telles que le $TNF\alpha$, l'IL-1, l'IL-6, l'IL17, l'IFN γ et le RANKL. L'infiltration importante de cellules aboutit à la formation d'ostéoclastes induisant la destruction osseuse (Smolen et al., 2018). L'implication de CSF-1 dans cette pathologie a été mise en évidence dans différentes études dans lesquelles le blocage de CSF-1 limite la sévérité de la polyarthrite rhumatoïde (Garcia et al., 2016). Ces études suggèrent que le CSF-1 joue un rôle dans le

recrutement de cellules dans le synovium ainsi que dans la formation d'ostéoclastes. C'est pourquoi, d'autres études se sont intéressées à l'implication de l'IL-34 dans cette pathologie afin d'identifier une nouvelle approche thérapeutique (**Figure 15**).

L'IL-34 semble impliquée dans la polyarthrite rhumatoïde puisque son expression est plus importante dans le sérum/plasma et dans le liquide synovial que chez les patients contrôle souffrant d'ostéoarthrite. De plus, l'IL-34 corrèle positivement avec plusieurs critères inflammatoires de la pathologie comme le score DAS28, l'infiltration de leucocytes, le facteur rhumatoïde, le taux d'anticorps ACPA, la CRP, le MMP-3, l'IL-6, l'IL-8, le TNF α , le RANKL, la destruction osseuse et la vitesse de sédimentation des érythrocytes. Cependant, le taux d'IL-34 ne corrèle pas avec l'ostéoporose (Chemel et al., 2012a; Hwang et al., 2012; Moon et al., 2013; Tian et al., 2013; Chang et al., 2015; Zhang et al., 2015a; Elkhider et al., 2019; Li et al., 2019). L'équipe de Chang *et al.* indiquent que l'IL-34 peut être utilisée comme facteur de prédiction de progression de la maladie, néanmoins le nombre de patients étant faible, ces résultats sont à confirmer (Chang et al., 2015). Par ailleurs, le traitement anti-TNF α induisant une diminution de l'expression de l'IL-34, cette cytokine est facteur de bonne réponse au traitement si sa concentration sérique est inférieure à 194,12 pg/mL (Ding et al., 2015). L'expression de l'IL-34 par les fibroblastes synoviaux et synoviocytes est induite par l'IL-1 β et le TNF α via les voies de signalisation JNK et NF- κ B. L'inhibition de TNF α a donc un effet direct sur l'IL-34. Le TGF β 1 et BMP-2 sont aussi retrouvés dans le liquide synovial des patients et ont un effet inhibiteur de l'expression d'IL-34 par les fibroblastes synoviaux (Chemel et al., 2017). Toutes ces études ont mis en évidence plusieurs mécanismes favorisant le développement et le maintien de la pathologie. Tout d'abord, l'IL-34 est impliqué dans l'ostéoclastogénèse, en effet d'une part l'IL-34 augmente l'expression de RANKL et diminue celle d'OPG (inhibe la formation d'ostéoclastes) par les fibroblastes (Cui et al., 2019), et d'autre part l'IL-34 permet la migration des précurseurs des ostéoclastes (**tableau V, p80**). Ainsi en association avec RANKL, l'IL-34 génère des ostéoclastes comme l'avait démontré deux précédentes études (Baud'huin et al., 2010; Chen et al., 2011b; Hwang et al., 2012). L'IL-34 semble aussi impliquée dans la résistance à l'apoptose des fibroblastes synoviaux. En effet, son expression augmente la phosphorylation de Stat3 induisant l'augmentation de miR-21. La conséquence est l'augmentation du ratio Bcl-2/Bax. Or Bcl-2 est pro-apoptotique et Bax anti-apoptotique, ainsi les fibroblastes synoviaux sont plus résistants à l'apoptose maintenant l'environnement inflammatoire et la destruction de

l'os (Yang et al., 2016). Une récente étude a mis en évidence que l'IL-34 joue un rôle dans la progression de la maladie via l'induction de l'angiogenèse, en effet l'IL-34 induit l'expression de VEGF et HIF-1 α par les PBMC des patients atteints de la polyarthrite rhumatoïde (Ding et al., 2019). Ce rôle dans l'angiogenèse a aussi été démontré dans une précédente étude par Ségallyn *et al.* dans l'ostéosarcome métastatique (Ségallyn et al., 2015b; Cui et al., 2019). De façon intéressante, l'IL-34 est capable d'induire l'expression d'IL-17 par les PMBC de patients souffrant de la polyarthrite rhumatoïde suggérant une nouvelle implication (Tian et al., 2013). Fonctionnellement, l'IL-34 active les fibroblastes synoviaux qui expriment CSF-1R, qui sécrètent de l'IL-6. La co-culture avec des lymphocytes T CD4⁺ naïfs augmente la génération de Th17 (Wang et al., 2017a). Ces résultats ont aussi été retrouvés avec la lignée monocytaires THP-1 dans laquelle l'IL-34 induit l'expression de ROS et d'IL-6 permettant le développement de Th17 (Wang et al., 2018a). Dans le modèle murin d'arthrite (collagen-induced arthritis : CIA), l'IL-34 est aussi augmentée durant le développement de la pathologie (Galligan and Fish, 2017). De plus, l'administration d'IL-34 dans ce modèle augmente la sévérité des symptômes ainsi que l'expression du TNF α , de l'IL-6 et de l'IL-17 (**tableau IV, p71**). De façon intéressante, le blocage de l'IL-17 permet de fortement inhiber la sévérité indiquant que le rôle pathogénique de l'IL-34 est médié par l'IL-17 (Zhang et al., 2018a). Dans ce modèle, une équipe a mis en évidence que l'IL-34 était capable d'induire la migration des fibrocytes. Ces cellules sont des cellules souches circulantes multipotentes qui pourraient servir de réservoir aux fibroblastes synoviaux participants au développement et maintien de la pathologie (Galligan et al., 2010; Galligan and Fish, 2012).

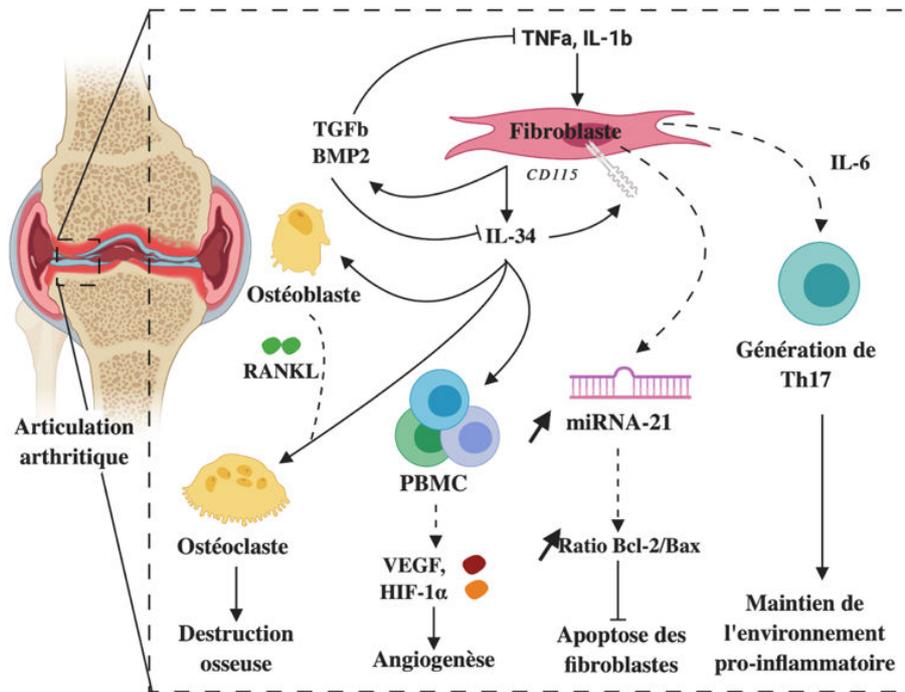


Figure 15: Représentation schématique des rôles de l'IL-34 dans la polyarthrite rhumatoïde. PBMC : *peripheral blood mononuclear cells* ; \longrightarrow : induction ; \longleftarrow : inhibition.

b. Le lupus érythémateux systémique, un rôle de l'IL-34 à confirmer

Le lupus érythémateux systémique est une maladie auto-immune inflammatoire chronique présentant des caractéristiques communes avec la polyarthrite rhumatoïde. L'étiologie reste encore inconnue mais cette maladie est médiée par une mauvaise réponse immune contre les acides nucléiques (Kaul et al., 2016). Une étude transcriptomique dans trois modèles de lupus néphrétique chez les souris NZB/W F1, NZB/BXSB et NZM2410 a révélé que 262 gènes communs étaient augmentés dont l'IL-34 (Bethunaickan et al., 2013). Cependant son rôle n'avait pas été décrit. Deux études ont mis en évidence que le taux d'IL-34 sérique est plus élevé chez les patients avec un lupus actif (sans distinction de la forme néphrétique) en comparaison aux patients en rémission et volontaires sains. De plus, le taux d'IL-34 n'est pas augmenté dans la forme du lupus érythémateux discoïde par rapport aux volontaires sains. Dans le lupus érythémateux systémique, l'IL-34 corrèle avec plusieurs critères comme le taux d'anticorps anti-double brin de l'ADN, le taux d'IgG, l'infiltration de lymphocytes T et macrophages, la CRP ainsi que le grade clinique. Et corrèle négativement avec la concentration en hémoglobine, un critère clinique retrouvé chez ces patients (Xie et

al., 2018). Par ailleurs, les patients sous traitement immunosuppresseurs ou corticoïdes présentent une diminution du taux d'IL-34 suggérant son implication dans la pathologie (Wang et al., 2017b). Mais ces traitements immunosuppresseurs inhibent la réponse immune de façon générale et non spécifique.

Afin d'étudier le rôle *in vivo* de l'IL-34 dans le lupus, différents modèles murins ont été développés mimant les caractéristiques de la pathologie. Le modèle murin MRL-Fas^{lpr} développe spontanément des lésions similaires au lupus érythémateux systémique et se caractérise par une production d'auto-anticorps, un déficit en molécules du complément ainsi qu'une glomérulonéphrite médiée par ces complexes d'anticorps. En effet, ces souris présentent aussi un déficit d'apoptose, une lymphadénopathie due à l'accumulation de lymphocytes CD3⁺CD4⁻CD8⁻ et B220⁺ (Fujii et al., 2009). Dans ce modèle, l'IL-34 et ses récepteurs CFS-1R et PTP ζ sont surexprimés par les cellules épithéliales tubulaires (TEC) dans les phases avancées de la maladie. Grâce au croisement de cette souche avec les souris *Il34^{LacZ/LacZ}*, une équipe a mis en évidence que l'IL-34 était impliqué dans le développement du lupus néphrétique. En effet, son absence inhibe le développement de la pathologie en diminuant les marqueurs biochimiques de souffrance rénale, le taux d'auto-anticorps, les lésions tissulaires rénales et de la peau ainsi que l'infiltration cellulaire dans le rein permettant ainsi d'améliorer la fonction glomérulaire rénale. Fonctionnellement, l'IL-34 semble impliquée dans l'expansion des précurseurs hématopoïétiques de la moelle osseuse, augmentant le nombre de monocytes circulants (**tableau V, p80**). Différentes chimiokines intra-rénales sont induites par l'IL-34 comme MCP-1, MIP-1 α , RANTES, IP-10 et BCA-1 induisant l'infiltration des monocytes et lymphocytes T et B dans le rein. Cependant l'IL-34 n'induit pas la différenciation des monocytes en macrophages mais permet leur accumulation dans le rein et ils induisent l'apoptose des TEC développant la glomérulonéphrite (Wada et al., 2019). Ces résultats font échos au rôle de l'IL-34 dans l'ischémie/reperfusion, en effet l'IL-34 permet aussi de recruter les monocytes/macrophages dans le rein aboutissant à la destruction des TEC (cf partie III 4.3.d) (Baek et al., 2015). Néanmoins ces résultats ne sont pas retrouvés dans un autre modèle murin NZB/W F1 de lupus. Ces souris sont issues d'un croisement entre une souche NZB et une souche NZW qui présentent toutes deux une auto-immunité. Le croisement F1 présente une lymphadénopathie, une splénomégalie, une augmentation des auto-anticorps dont des IgG anti-double brin de l'ADN et une glomérulonéphrite générée par les complexes immuns. Ces

symptômes aboutissent à une défaillance rénale à 10-12mois (Perry et al., 2011). Dans ce modèle le blocage de l'IL-34 en association ou non au blocage du CSF-1 par des anticorps ne permet d'améliorer ni la survie ni la protéinurie qui rend compte de l'état de la progression de la pathologie (Lin et al., 2019) (**tableau IV, p71**). Ces modèles murins miment le développement du lupus néphrétique mais le phénotype de ces deux souches est différent, en effet les patients atteints de lupus présentent des auto-anticorps anti-complexe ARN retrouvés seulement dans le modèle MRL-Fas^{lpr}. Néanmoins, le développement du lupus dans le modèle NZB/W F1 est en partie induit par le taux d'œstrogène de manière similaire à l'Homme et la prévalence est plus importante chez les femmes (Perry et al., 2011). Ces différences peuvent expliquer les conclusions contradictoires entre ces deux études.

c. La participation néfaste de l'IL-34 dans le syndrome de Sjögren

Le syndrome de Sjögren est une maladie inflammatoire des glandes exocrines notamment des glandes salivaires et lacrymales ainsi que le nez et l'appareil respiratoire. La conséquence est une sécheresse des muqueuses, des yeux et de la bouche en particulier. La cause est multifactorielle, et ces patients présentent des auto-anticorps anti-SjS-related antigen A (SSA) et anti-SSB et une infiltration de lymphocytes T spécifiques au phénotype Th1 et Th17 (Brito-Zerón et al., 2016). Les cellules épithéliales des glandes salivaires sont suggérées comme jouant un rôle important puisqu'elles peuvent sécréter des cytokines pro-inflammatoires (Manoussakis and Kapsogeorgou, 2010). Par ailleurs, des études ont aussi montré que les glandes salivaires des patients atteints du syndrome de Sjögren présentaient une infiltration de monocytes/macrophages (Manoussakis et al., 2007; Wildenberg et al., 2009; Greenwell-Wild et al., 2011). Ciccia *et al.* ont démontré que l'expression de l'IL-34 était plus importante dans les glandes salivaires chez ces patients en comparaison à des contrôles ne présentant pas les caractéristiques cliniques du syndrome. L'expression de l'IL-34 est restreinte aux cellules épithéliales entourées d'un infiltrat de cellules mononuclées, et son expression corrèle avec le TNF α , l'IL-1 β , l'IL-17 et l'IL-23p19 ainsi que le score de développement de la pathologie. De plus, l'IL-34 est capable d'induire la prolifération des monocytes CD14^{bright}CD16⁺ *in vitro*, et ces monocytes sont retrouvés dans les glandes salivaires inflammées des patients et corrélaient avec l'IL-34 (Ciccia et al., 2013a). Ces résultats

suggèrent que l'IL-34 est impliquée dans le recrutement des monocytes CD14^{bright}CD16⁺ décrits comme pro-inflammatoires via leur capacité à générer des Th17 (Rossol et al., 2012), favorisant l'inflammation et le développement de la pathologie (**tableau V, p80**).

d. Les autres implications : psoriasis et sclérodémie systémique

L'IL-34 semble impliquée dans d'autres maladies auto-immunes notamment dans la forme arthritique du psoriasis. Dans cette pathologie, l'IL-34 sérique est plus élevé chez les patients souffrant de la forme arthritique comparé aux patients psoriasiques et volontaires sains. Par ailleurs, l'IL-34 est seulement augmentée chez les patients présentant de l'érosion osseuse et corrèle avec les précurseurs des ostéoclastes circulants (Li et al., 2017). Ces résultats suggèrent que l'IL-34 est impliquée, de la même manière que dans la polyarthrite rhumatoïde, dans la formation d'ostéoclastes générant la destruction de l'os et participant ainsi à l'inflammation.

La sclérodémie systémique est une maladie du tissu conjonctif générant une fibrose excessive au niveau des poumons, de la peau et autres organes internes. L'expression sérique d'IL-34 est aussi plus importante chez ces patients comparés aux volontaires sains, notamment chez les personnes présentant une sclérodémie diffuse (Kuzumi et al., 2018). D'autres études ont montré que ces patients avaient aussi un taux plus élevé de CD163 soluble (marqueur de M2), de CCL17, de CCL18, de Th17 et d'IL23 (Prasse et al., 2007; Nakayama et al., 2012; Yang et al., 2014). Or les macrophages différenciés par l'IL-34 sont capables d'induire des Th17 à partir de lymphocytes T mémoires (Foucher et al., 2015), de plus dans le cas d'infection avec le virus de l'hépatite C, l'IL-34 induit des macrophages pro-fibrotiques (Preisser et al., 2014). Ainsi, l'IL-34 pourrait participer à la génération de Th17 et à la formation de fibrose caractéristiques de la sclérodémie systémique.

4.3. Les rôles de l'IL-34 dans les maladies inflammatoires

L'expression de l'IL-34 est induite par divers stimuli inflammatoires tels que des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β et TNF α), des PAMP et des agents d'altération de l'ADN, ainsi son implication dans ces conditions a été étudiée.

a. L'effet délétère de l'IL-34 dans la parodontite via les ostéoclastes

La parodontite est une inflammation des tissus de soutien des dents aboutissant à leur destruction et celle de l'os. Les ligaments parodontaux sont exposés à des facteurs inflammatoires dont des cytokines comme l'IL-1 β et le TNF α . Ces ligaments expriment le récepteur au RANKL, la destruction de l'os est donc associée à la formation d'ostéoclastes. Par ailleurs, la parodontite est une des complications du diabète de type II. En effet, chez ces patients l'IL-1 β et le TNF α sont surexprimés dans les zones du parodonte inflammé (Duarte et al., 2007). La capacité de l'IL-34 à induire l'ostéoclastogénèse en association au RANKL a été mise en évidence précédemment (Baud'huin et al., 2010), ainsi différentes études ont étudié l'implication de l'IL-34 et la destruction osseuse dans la parodontite.

Dans une cohorte de patients diabétiques ou non avec ou sans une parodontite, les taux sériques et dans le fluide gingival d'IL-34 sont plus élevés chez les patients diabétiques atteints de parodontite par rapport aux volontaires sains, aux patients diabétiques sans parodontite, et aux patients non diabétiques avec parodontite (Guruprasad and Pradeep, 2018). L'IL-34 est retrouvée dans les lésions péri-apicales (Ma et al., 2016a), et ce sont les fibroblastes gingivaux et les ligaments parodontaux stimulés par l'IL-1 β et le TNF α qui sécrètent l'IL-34 (Boström and Lundberg, 2013; Kawabe et al., 2015). L'IL-34 peut alors induire l'ostéoclastogénèse aboutissant à la destruction de l'os et participer au maintien de l'inflammation (**tableau V, p80**). Ces résultats vont à l'encontre des résultats de l'équipe de Martinez *et al.* En effet, dans une autre cohorte de patients, ils indiquent que les taux salivaires d'IL-34 et de CSF-1 permettent de déterminer le statut inflammatoire des patients. L'IL-34 étant diminuée chez les patients souffrant de parodontite à l'inverse du CSF-1, cette équipe suggère que l'IL-34 joue un rôle dans les conditions d'homéostasie. Le CSF-1 participe quant à lui à l'inflammation (Martinez et al., 2017) et peut aussi induire des ostéoclastes en association au RANKL. Néanmoins, plusieurs études suggèrent que l'IL-34 possède une action spécifique et locale à l'inverse du CSF-1, ainsi utiliser le taux salivaire comme marqueur de prédiction ne semble pas être approprié.

b. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, le rôle de l'IL-34 est à élucider

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) regroupent la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique. Les MICI se caractérisent par une inflammation chronique du tube digestif conduisant à une destruction de la muqueuse intestinale. Les macrophages situés dans l'épithélium de la lamina propria jouent un rôle central dans l'homéostasie intestinale. En effet, ces macrophages permettent la prolifération des précurseurs épithéliaux ainsi que la physiologie des neurones entériques et des cellules endothéliales via la sécrétion de prostaglandine E2 (PGE2), de *bone morphogenetic protein 2* (BMP2) et des ligands de la voie WNT (Hine and Loke, 2019). Les macrophages participent aussi à la diminution de la réponse inflammatoire dirigée contre la flore commensale ainsi qu'à la génération de Tregs CD4⁺CD25⁺ via la production d'IL-10 favorisant un environnement tolérogène (Mowat, 2018). Ainsi une dérégulation de ce réseau peut entraîner une perte de la tolérance favorisant une inflammation chronique.

De par son rôle dans la survie, la prolifération et la différenciation des monocytes/macrophages, l'IL-34 a été étudiée dans ces pathologies. Dans des conditions physiologiques, l'expression de l'IL34 est plus importante dans l'iléon que dans le colon alors que le messager du CSF1 est plus exprimé dans le colon. Le récepteur CSF1R commun à ces cytokines est exprimé de manière équivalente dans l'iléon et le colon (Franzè et al., 2015; Zwicker et al., 2015). De plus, Zwicker *et al.* ont mis en évidence que le récepteur de l'IL-34 PTP ζ était aussi exprimé dans l'intestin, et de manière plus importante dans le colon que dans l'iléon (Zwicker et al., 2016). Dans le colon des patients atteints MICI, l'expression de l'IL34, de CSF1 et de CSF1R sont augmentés alors que le niveau d'expression de PTP ζ est inchangé. L'expression de l'IL-34 par les cellules mononuclées de la lamina propria est induite par des signaux pro-inflammatoires comme l'IL-6, le TNF α , PGN, poly(I:C) et le CpG. De plus, la stimulation de cellules épithéliales du colon avec de l'IL-34 induit l'expression d'IL-6, de TNF α et CCL20 de manière dépendante de la voie de signalisation ERK1/2 (Franzè et al., 2015; Zwicker et al., 2015; Franzè et al., 2016). Ces résultats suggèrent que l'IL-34 entretient une boucle de régulation pro-inflammatoire (**tableau V, p80**). Une récente étude utilisant différents modèles animaux de colite combinés au blocage de l'IL-34 et/ou CSF-1 par des anticorps ont permis de déterminer leur contribution dans le développement des

MICI. Dans le modèle de colite induite par le DSS, la combinaison des anticorps bloquants anti-IL-34 et anti-CSF-1 permet d'atténuer le score histologique de la pathologie par rapport aux monothérapies. Néanmoins, cet effet semble CSF-1 dépendant puisque la monothérapie anti-CSF-1 permet de réduire le nombre de monocytes circulants, l'expression d'IL-6 et de TNF α dans le colon ainsi que l'infiltration de macrophages résidents CX3CR1^{hi/int} de manière plus importante que la monothérapie anti-IL34. Ces résultats sont confortés par le modèle d'iléite induit par une surexpression de TNF α chez la souris TNF Δ^{ARE} et de colite spontanée chez la souris *Il10*^{-/-}. Dans ces modèles, la combinaison des anticorps anti-IL-34 et anti-CSF-1 a un effet synergique dans l'atténuation de l'inflammation. Cependant, la majorité des symptômes semble médiée par CSF-1 puisque la monothérapie anti-CSF-1 diminue plus efficacement le score histologique que la monothérapie anti-IL-34 (Lin et al., 2019). Les résultats obtenus dans ces modèles suggèrent que le CSF-1 joue un rôle prépondérant dans ces pathologies (**tableau IV, p71**). Cette hypothèse est confortée par l'observation d'un défaut des entérocytes et d'une diminution de la prolifération des cellules épithéliales du colon chez les souris *Csf1* op/op et *Csf1r*^{-/-} (Huynh et al., 2013).

c. Une implication néfaste de l'IL-34 dans la maladie stéatosique non alcoolique du foie à travers la génération de fibrose

La maladie stéatosique non alcoolique du foie (NAFLD) est une cause fréquente de maladie chronique non infectieuse du foie. Elle résulte d'un désordre métabolique souvent lié à un excès de tissu adipeux, de diabète associés ou non à une dyslipidémie dont les causes peuvent être génétiques et/ou environnementales. Fonctionnellement, il semble que les macrophages du foie (cellules de Kupffer) qui activent les cellules stellaires jouent un rôle prépondérant dans cette pathologie. Le degré de fibrose hépatique permet de rendre le pronostic (Sanyal, 2019). Dans cette pathologie, l'IL-34 est exprimée par les fibroblastes et son expression augmente suite à une stimulation par le TNF α . De plus, le taux sérique d'IL-34 augmente avec la progression de la pathologie de la même façon que CSF-1. Par ailleurs, ce taux d'IL-34 est corrélé positivement avec de nombreux paramètres de la NAFLD comme le taux de sCD163, CSF-1, CCL20, l'acide hyaluronique, le collagène de type IV 7s et l'index FIB-4. Ainsi, l'établissement d'un score (*IL-34-Fibrose score*) incluant le taux d'IL-34, de

collagène de type IV 7s et l'âge est prédictif de la fibrose hépatique avec une spécificité supérieure à 80% (Shoji et al., 2016). Cette étude ne décrit pas le rôle de l'IL-34. Dans le cadre d'une infection par le virus de l'hépatite C, Preisser *et al.* ont mis en évidence que l'IL-34 et CSF-1 étaient augmentés dans le sérum et induisaient des macrophages profibrotiques *in vitro* (Preisser et al., 2014). Ces résultats suggèrent que l'IL-34 dans le cas de la NAFLD pourrait exercer la même fonction (**tableau V, p80**).

d. Le rôle délétère de l'IL-34 dans l'ischémie/reperfusion

L'ischémie/reperfusion est un processus pouvant intervenir dans différents contextes comme en transplantation d'organe. En effet, lors du prélèvement d'organe, l'apport en oxygène est totalement interrompu et les mécanismes de production d'énergie cessent, conduisant à l'accumulation de déchets du métabolisme anaérobie et provoquant des lésions : c'est l'ischémie. Puis lors de la transplantation, le retour de la circulation soudaine avec son apport massif d'oxygène entraîne une explosion oxydative avec accumulation de radicaux oxygénés, induisant la mort cellulaire et la production de DAMP générant un environnement pro-inflammatoire : c'est la reperfusion (Hausenloy and Yellon, 2016). Les macrophages jouent un rôle prépondérant et dichotomique dans la régulation de l'inflammation dans ce contexte. En effet, ils participent au développement des lésions rénales aiguës qu'ils sont capables de résorber. Les macrophages peuvent participer à la formation de fibrose rénale pouvant participer à l'insuffisance rénale chronique (Lee et al., 2011). Baek *et al.* ont étudié l'implication de l'IL-34 dans l'insuffisance rénale aiguë et chronique suite à une ischémie/reperfusion par clampage du pédicule rénal (ensemble des vaisseaux sanguins) pendant 45 min chez la souris (**tableau IV, p71**). Ils ont mis en évidence que l'ischémie/reperfusion induisait l'expression de l'IL-34 par les cellules épithéliales tubulaires. Les récepteurs CSF-1R et PTP ζ sont aussi exprimés après l'ischémie/reperfusion. L'IL-34 agit alors en augmentant la prolifération des progéniteurs de la moelle osseuse, augmentant ainsi les monocytes et neutrophiles circulants. La migration des monocytes, neutrophiles et lymphocytes T dans le rein inflammé est favorisée par l'expression intrarénale des chimiokines MCP-1, MIP-1 α , CXCL1, IP-10 et CXCL10 induites par l'IL-34. La forte accumulation de macrophages induit la destruction des TEC générant des lésions rénales et les marqueurs de lésions sont augmentés (KIM-1, albuminémie et fibrose) ce qui

engendre une perte des tubules rénaux caractéristiques de la forme chronique (**tableau V, p80**). Dans cette étude, ils ont mis en évidence que ce processus est indépendant du CSF-1 (Baek et al., 2015). Ce résultat peut suggérer que dans le rein l'IL-34 joue un rôle délétère médié par son récepteur PTP ζ indépendamment de son interaction avec CSF-1R (**Figure 16**).

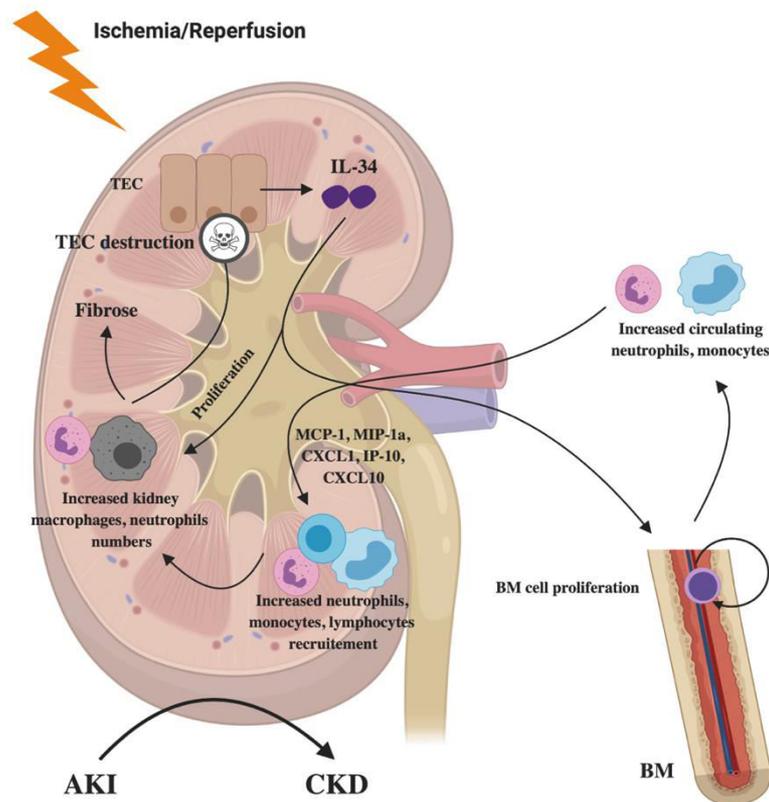


Figure 16: Schéma représentant le rôle de l'IL-34 dans l'ischémie/reperfusion rénale (adapté de (Sanchez-Niño et al., 2016)). TEC : tubular epithelial cells (cellules tubulaires épithéliales) ; BM : bone marrow (moelle osseuse) ; AKI : acute kidney injury (insuffisance rénale aiguë) ; CKD : chronic kidney injury (insuffisance rénale chronique).

4.4. Le rôle controversé de l'IL-34 en transplantation d'organe

En transplantation le rôle de l'IL-34 est controversé. En effet, l'équipe de Baek *et al.* indique que les résultats retrouvés dans leur modèle murin d'ischémie/reperfusion sont transposables à l'Homme après une transplantation rénale. En effet, les patients transplantés présentent une augmentation de l'IL-34 et de ses récepteurs CSF-1R et PTP ζ dans le rein donneur et dans le sérum en cas de rejet. De plus, de la même manière que chez la souris, les cellules épithéliales tubulaires expriment l'IL-34 qui induit l'accumulation de macrophages CD68⁺ et neutrophiles Ly6G⁺ dans l'interstitium rénal. Cette accumulation est

d'autant plus importante que l'expression de l'IL-34 est plus importante si le rein provient d'un donneur décédé si l'ischémie est prolongée. Ainsi, l'IL-34 participerait au développement de l'insuffisance rénale via l'accumulation de macrophages dans le rein favorisant le rejet du rein (Baek et al., 2015). Cependant, ces résultats vont à l'encontre de ceux de notre équipe. Nous avons établi dans un modèle d'allotransplantation cardiaque chez le rat dans lequel l'IL-34 est une cytokine régulatrice. En effet, dans ce modèle, le blocage de la voie de co-stimulation CD40-CD40L induit des Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} tolérogéniques via la reconnaissance d'un peptide dérivé du CMH-II du donneur présenté par le CMH-I du receveur. Le transfert de ces Tregs vers un rat naïf transplanté permet aussi d'induire la survie à long terme du cœur, démontrant la capacité de tolérance infectieuse de ces Tregs (Guillot et al., 2002; Guillonnet et al., 2007a; Picarda et al., 2014). Divers mécanismes de suppression ont été mis évidence. Les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} surexpriment des cytokines comme FGL-2 qui génèrent des Bregs inhibant la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ (Bézie et al., 2015b). De plus les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} expriment l'IFN γ qui permet l'induction de l'expression d'IDO par les cellules endothéliales du greffon et par les pDC générant un environnement lymphotoxique (Guillonnet et al., 2007a; Li et al., 2010). Enfin, l'IL-34 est exprimé par les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} induits ainsi que les Tregs CD8⁺FoxP3⁺ et Tregs CD4⁺FoxP3⁺ chez l'Homme (Bézie et al., 2018a). L'IL-34 est impliquée dans leur fonction suppressive de façon indépendante du CSF-1. En effet, la surexpression de l'IL-34 en association à une dose sous-optimale de rapamycine permet dans le même modèle d'allotransplantation cardiaque chez le rat d'induire une tolérance transférable par les Tregs CD4⁺ et CD8⁺. Fonctionnellement, l'IL-34 entraîne l'accumulation de macrophages intra-greffon au phénotype régulateur M2 (CD14⁺Arg1⁺) favorisant l'environnement tolérogène. Chez l'Homme, les macrophages différenciés par l'IL-34 (CD14⁺CD163⁺CD80^{lo}CD86⁺HLA-DR⁺CD1a⁻) permettent d'expandre les Tregs CD4⁺FoxP3⁺ et Tregs CD8⁺FoxP3⁺ aux fonctions suppressives améliorées (Bézie et al., 2015a) (**tableau IV, p71**). Ainsi, l'IL-34 est au cœur d'une boucle favorisant l'induction de la tolérance. Exprimée par les Tregs CD4⁺ et Tregs CD8⁺, l'IL-34 permet le recrutement et la différenciation de monocytes en macrophages M2 qui vont pouvoir à leur tour induire la prolifération des Tregs, augmentant alors leur nombre et le niveau d'expression d'IL-34 favorisant l'établissement de la tolérance (**Figure 17 et tableau V, p80**). Ces résultats sont confortés par une autre étude en transplantation hépatique chez le rat. Dans ce modèle, le rejet aigu est inhibé en cas de surexpression d'IL-

34 qui participe à la diminution des marqueurs biochimiques de lésions hépatiques (ALAT, ASAT et bilirubine totale). L'effet est médié par les cellules de Kupffer : IL-34 permet de moduler leur phénotype M1 vers un phénotype M2, ces cellules M2 expriment alors de l'IL-10 et du TGFβ1 et diminuent leur expression d'IL-12 (Zhao et al., 2018a). Chez l'Homme, une équipe a mis évidence que les patients transplantés hépatiques en rejet ont un taux sérique d'IL-34 plus élevé que les patients stables. Ils suggèrent que l'IL-34 est sécrétée dans un but de compensation de l'environnement inflammatoire, néanmoins aucun mécanisme n'est mis en évidence (San Segundo et al., 2016). De plus, les taux d'IL-34 sérique sont très faibles (une moyenne entre 20 pg/mL et 30 pg/mL) et les écarts-types importants.

Ainsi, le rôle de l'IL-34 peut être bénéfique ou délétère selon l'organe. Son interaction avec CSF-1R contribue à l'induction de la tolérance à l'allogreffe cardiaque. Néanmoins, son interaction avec PTPζ dans le rein pourrait moduler son activité vers un rôle néfaste. Il reste à étudier la contribution des autres récepteurs dans les différents contextes de transplantation pour élucider précisément les fonctions bénéfiques ou délétères de l'IL-34.

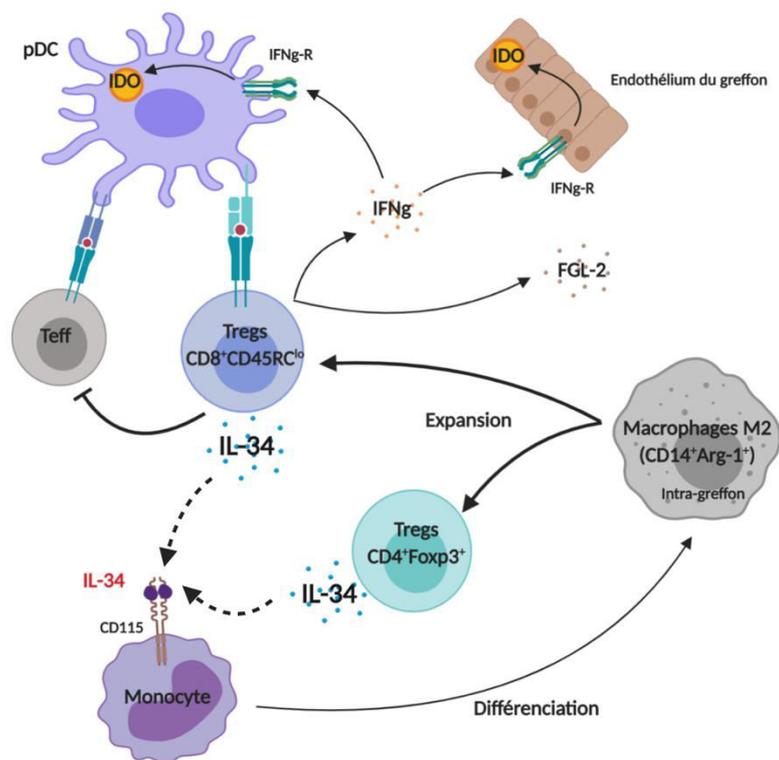


Figure 17: Schéma représentant le rôle de l'IL-34 dans le modèle d'allo-transplantation cardiaque chez le rat. pDC : cellule dendritique plasmacytoïde ; Macrophages M2 : macrophages pro-régulateurs ; \longrightarrow : induction ; \longleftarrow : inhibition.

4.5. Récapitulatif de l'impact d'une déficience/blocage et injection d'IL-34/CSF-1 dans différents modèles animaux

Le **tableau IV** ci-après regroupe l'impact d'une déficience en *Il34* ou *Csf1* ou blocage par l'utilisation d'anticorps bloquants anti-IL-34 et/ou anti-CSF-1 dans différents modèles expérimentaux de pathologies du SNC, de la peau, dans les cancers, de maladies auto-immunes, de pathologies inflammatoires et en transplantation chez l'animal décrit dans les parties II.2.3 et III.2 à III.4.4 de l'introduction (Abd et al., 1991; Campbell et al., 2000; Lin et al., 2001; Jose et al., 2003; Zhao et al., 2003; Lenda et al., 2004; Nishina et al., 2004; Hashimoto et al., 2011; Greter et al., 2012; Wang et al., 2012a; Baek et al., 2015; Bézie et al., 2015a; Menke et al., 2015; Baghdadi et al., 2016; Zhu et al., 2016; Braza et al., 2018; Zhao et al., 2018a; Zhang et al., 2018a; Lin et al., 2019; Wada et al., 2019; Wlodarczyk et al., 2019).

Impact de l'injection/surexpression d'IL-34, CSF-1 sur le développement de pathologies chez la souris et le rat					
Contexte	Modèle d'étude	Modèle expérimental	Effet clinique	Analyses	
SNC	Maladie auto-immune	EAE	Souris, injection d'IL-34	Diminution de la sévérité	Stimulation de la prolifération d'une sous-population de microglie CD11c ⁺ protectrice
Cancer	Lignée tumorale chimiorésistante	Souris, surexpression d'IL-34	Souris, injection d'IL-34	Augmentation de la progression tumorale	Augmentation de l'infiltrat de TAM, de la réponse T CD8 ⁺ cytotoxique et du ratio Treg/Th1
MAI	Polyarthrite rhumatoïde	Modèle CIA	Souris, injection d'IL-34	Augmentation de la sévérité	Augmentation de TNF α , IL-6 et IL-17
			Souris, injection CSF-1	Augmentation de la sévérité	Augmentation du score clinique, augmentation des IgG anti-CII
	Modèle induit par <i>Streptococcus agalactiae</i>	Rat, injection de CSF-1	Augmentation de la sévérité		
Lupus érythémateux systémique	Modèle MRL-Fas ^{lpr}	Souris, surexpression de CSF-1 chez les souris op/op	Augmentation de la sévérité	Augmentation de l'infiltrat intra-rénal de macrophage induisant l'apoptose des TEC	
Transplantation	Tx allogénique cardiaque	Rat, surexpression d'IL-34 + rapamycine	Tolérance	Diminution des anticorps anti-donneurs, augmentation de l'expression de CD14 et Arg1 intracardiaque	
	Tx allogénique du foie	Rat, surexpression d'IL-34	Inhibition du rejet aigue	Diminution des marqueurs biochimiques ALAT, ASAT, bilirubine totale et IFN γ et augmentation d'IL-10	
	Greffe de CSH allogénique	Souris, injection de CSF-1	Diminution de la sévérité de GVHD	Augmentation des macrophages, diminution de la prolifération des lymphocytes T et l'expression d'IFN γ	
	Greffe de peau allogénique	Souris, injection de CSF-1	Augmentation de la survie du greffon	Diminution de l'expression de TNF α	
	Greffe de CSH syngénique	Souris, injection de CSF-1	Diminution de la survie	Augmentation de l'activité des NK et de la stimulation des monocytes	

Impact d'une déficience/blocage en <i>Il34</i> , <i>Csf1</i> sur le développement de pathologies chez la souris					
Contexte	Modèle d'étude	Modèle expérimental	Effet clinique	Analyses	
SNC	Infection virale	Virus West Nile atténué	Souris <i>Il34^{LacZ/LacZ}</i>	Augmentation de la mortalité	Charge virale similaire, apoptose neuronale plus importante
		Prion	Souris <i>Il34^{LacZ/LacZ}</i>	Augmentation de la mortalité	Augmentation de la neurotoxicité, augmentation des agrégats de prions et de la progression de l'infection
Peau	CHS	DNFB	Souris <i>Il34^{LacZ/LacZ}</i>	Diminution de la sensibilité	Diminution de l'inflammation et de la production d'IFN γ
		<i>Candida albicans</i>	Souris <i>Il34^{LacZ/LacZ}</i>	Diminution de la réponse inflammatoire	Diminution de l'inflammation et de l'infiltrat
	Psoriasis	Modèle imiquimod	Souris <i>Il34^{LacZ/LacZ}</i>	Absence d'effet	
Cancer	Lignée MC38 (adénocarcinome du colon)	Souris, ac bloquant anti-IL-34		Absence d'effet	
		Souris, ac bloquants anti-IL-34 et anti-CSF-1		Diminution de la progression tumorale	Diminution de l'infiltrat de TAM (augmentation de NOS2, CD86, Arg1, CMH-II et PDL-1), de Tregs et augmentation de l'infiltrat de lymphocytes T CD4 ⁺
	Modèle de souris PyMT (tumeur mammaire)	Souris <i>Csf1</i> op/op		Absence d'effet sur la progression de la tumeur primaire, retard d'apparition des métastases pulmonaires	Diminution de l'infiltrat de TAM
Polyarthrite rhumatoïde	Modèles CIA et TNF Δ^{ARE}	Souris, ac bloquant anti-IL-34		Absence d'effet	
		Souris, ac bloquants anti-IL-34 et anti-CSF-1		Diminution de la sévérité	Diminution du score clinique, de la perte de cartilage et de l'infiltrat macrophagique
	Modèle CIA	Souris, ac bloquant anti-CSF-1		Diminution de la sévérité	Diminution du score clinique
		Souris <i>Csf1</i> op/op		Résistance au développement de la maladie	
MAI	Modèle MRL-Fas ^{lpr}	Souris <i>Il34^{LacZ/LacZ}</i>		Augmentation de la survie, diminution de la sévérité	Diminution des marqueurs biochimiques de souffrance rénale, des auto-anticorps, des lésions tissulaires améliorant la filtration glomérulaire
		<i>Csf1</i> op/op		Résistance au développement de la maladie	Très forte diminution de l'infiltrat cellulaire, du score histologique, des Ig, des dépôts de C3, de TNF α , de MCP-1, de RANTES et d'IFN γ
	Modèle NZB/W F1	Souris, ac bloquant anti-IL-34		Absence d'effet	
	Modèle NZB/W F1	Souris, ac bloquant anti-CSF-1		Absence d'effet	
Inflammation	MICI	Modèles DSS, <i>Il10^{-/-}</i> , TNF Δ^{ARE}	Souris, ac bloquant anti-IL-34		Absence d'effet majeur
		Souris, ac bloquants anti-IL-34 et anti-CSF-1		Diminution de la sévérité	Diminution du score histologique, de l'expression d'IL-6 et de TNF α (colon), perte de poids moins sévère
	Ischémie/reperfusion	Clampage rénal	Souris <i>Il34^{LacZ/LacZ}</i>		Diminution de la prolifération des progéniteurs, de la production intrarénale de chimiokines diminuant la destruction des TEC
Transplantation	Grefe de peau xénogénique (rat sur souris)	Souris <i>Csf1</i> op/op		Retard du rejet	Diminution des anticorps anti-donneur, diminution de la réponse xénogénique des lymphocytes T du receveur
		Tx rénale allogénique	Souris, ac bloquant anti-CSF-1		Diminution de la sévérité

Tableau IV: Tableau récapitulatif de l'impact de l'injection/surexpression et d'une déficience/blocage de l'IL-34 et de CSF-1 dans différent modèle d'étude chez la souris et le rat. SNC : système nerveux central ; CHS : contact hypersensitivity ; DNFB : dinitrofluorobenzène ; ac : anticorps ; TAM : tumor associated macrophage ; MAI : maladie auto-immune ; CIA : collagen induced arthritis ; MICI : maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ; TEC : tubular epithelial cell (cellule épithéliale tubulaire du rein) ; DSS : dextran sulfate sodium ; Tx : transplantation ; CSH : cellule souche hématopoïétique ; GVHD : graft versus host disease (maladie du greffon contre l'hôte).

4.6. L'implication dichotomique de l'IL-34 dans les infections

a. Les infections virales, un rôle de l'IL-34 à approfondir

L'infection des hépatocytes par le virus de l'hépatite C (HCV) entraîne la libération de médiateurs activant les cellules stellaires hépatiques (HSC) induisant leur prolifération et transition en myofibroblastes. Ces cellules produisent du collagène de type I jouant un rôle dans la formation de la fibrose hépatique. L'activation des HSC est notamment médiée par le TGF β et le PDGF lors de l'inflammation du foie (Tsuchida and Friedman, 2017) ainsi que par les monocytes circulants et différenciés en macrophages (Tacke, 2012). C'est dans ce contexte que Preisser *et al.* ont mis en évidence une augmentation des taux sériques d'IL-34 de CSF-1 dans les stades avancés de fibrose. Ces cytokines sont capables de différencier des monocytes en macrophages pro-fibrotiques *in vitro* et produisent les facteurs pro-fibrotiques TGF β , MMP-2 et MMP-9 et les chimiokines CCL2, CCL4, CCR1 et CCR5 permettant un recrutement des monocytes et des HSC (**tableau V, p80**). L'IL-34 et le CSF-1 inhibent de la réponse immune en diminuant l'expression d'IFN γ par les NK qui en condition physiologique permettent d'induire l'apoptose des HSC (Preisser et al., 2014; Tsuchida and Friedman, 2017).

Les mécanismes impliqués dans la progression d'une infection par le virus de l'hépatite B (HBV) sont encore peu connus. Les patients infectés par l'HBV expriment moins d'IL-34 que les volontaires sains. *In vitro* et *in vivo*, l'IL-34 est capable d'inhiber la réplication virale suggérant une boucle de rétroaction de l'HBV sur l'expression d'IL-34 (Cheng et al., 2017). Ces résultats vont à l'encontre d'une autre étude. En effet, Wang *et al.* ont mis en évidence que l'IL-34 sérique était augmentée chez les patients infectés par l'HBV présentant une fibrose sévère. De plus, ils indiquent que l'IL-34 peut être utilisée comme marqueur de prédiction de fibrose sévère et de cirrhose précoce (Wang et al., 2018b). Ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer par l'inclusion des patients fibrotiques par Wang *et al.* or l'IL-34 permet d'induire des macrophages pro-fibrotiques (Preisser et al., 2014) (**tableau V, p80**).

Les combinaisons de traitements antirétroviraux ont considérablement amélioré l'espérance et la qualité de vie des patients infectés avec le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Néanmoins, ce traitement ne cible pas les cellules infectées qui persistent longtemps, notamment les macrophages. Ces cellules constituent un réservoir de

particules virales principalement retrouvées dans le SNC. Des études préliminaires avaient démontré que le CSF-1 était augmenté chez ces patients dans le liquide cérébro-spinal (Gallo et al., 1990) et participait à la prolifération des macrophages et donc augmente la susceptibilité infectieuse (Gruber et al., 1995). Une récente étude a montré que chez le primate infecté par le virus SIV (*simian immunodeficiency virus*), CSF-1 est exprimé par les macrophages périvasculaires et nodulaires CD163⁺ (Gerngross et al., 2015). Ces macrophages diffèrent de la microglie, indiquant que ces macrophages peuvent dériver des monocytes circulants. L'IL-34 n'est néanmoins pas exprimée par ces macrophages. Les tests *in vitro* ont confirmé la capacité de l'IL-34 et du CSF-1 à induire des macrophages dans lesquels le nombre de particules virales est plus important suggérant l'implication de ces deux cytokines dans la conservation de ces réservoirs viraux (Gerngross and Fischer, 2015). Néanmoins, une autre étude a mis en évidence que les macrophages différenciés par l'IL-34 sont moins susceptibles à une infection par le VIH comparés aux macrophages différenciés par le CSF-1 (**tableau V, p80**). Cette différence est expliquée par l'expression des gènes de restriction APOBEC, IFITM et SAMDH ciblant la réplication induits par les macrophages différenciés par l'IL-34 (Paquin-Proulx et al., 2018).

L'équipe de Yu *et al.* a mis en évidence l'existence d'une boucle de régulation négative dans l'infection par le virus de l'influenza A. En effet, la sécrétion d'IL-22 par les Th17 est induite par l'infection virale et entraîne l'expression d'IL-34. En retour, l'IL-34 diminue l'expression d'IL-22 (Yu et al., 2015) mettant en évidence un phénomène de compensation médié par l'IL-34.

b. Les infections fongiques/bactériennes

L'infection par *Candida albicans* est une infection opportuniste des patients immunodéprimés. Même si elle colonise fréquemment les muqueuses, elle entraîne peu de symptômes chez les personnes compétentes. Sa reconnaissance par les macrophages et cellules de Langerhans via la fixation d'un résidu β -glucan sur le TLR2 et Detin-1 induit l'expression de TNF α par les M1. De plus, les macrophages sont aussi capables d'éliminer *Candida albicans* par phagocytose. L'IL-34, fortement exprimée par les kératinocytes, joue un rôle de régulation. En effet, sa présence oriente les macrophages M1 vers un phénotype

M2 qui expriment moins de TLR2, de Dectin-1 et de TNF α et à l'inverse plus de CD206 (Xu et al., 2015).

Une dérégulation de la réponse immune dirigée contre les pathogènes peut aboutir à un choc septique dans lequel la charge bactérienne est trop importante et induit des conséquences dramatiques et mortelles. Dans ce cadre, une équipe a mis en évidence que l'IL-34 était augmentée chez les patients dans un état de choc septique ainsi que dans le sérum, le lavage péritonéal et les poumons dans un modèle de souris mimant le choc septique (*CLP-induced polymicrobial sepsis*) suggérant une implication de l'IL-34. En effet, dans ce modèle murin l'injection d'IL-34 est associée à une diminution de la charge bactérienne, des enzymes biochimiques de souffrances et des lésions tissulaires contribuant à l'amélioration de la survie des souris. Cette amélioration est médiée par le recrutement de macrophages et neutrophiles via l'expression de CXCL1 et CCL2, ces cellules peuvent alors éliminer les bactéries plus efficacement (Lin et al., 2018a) (**tableau V, p80**).

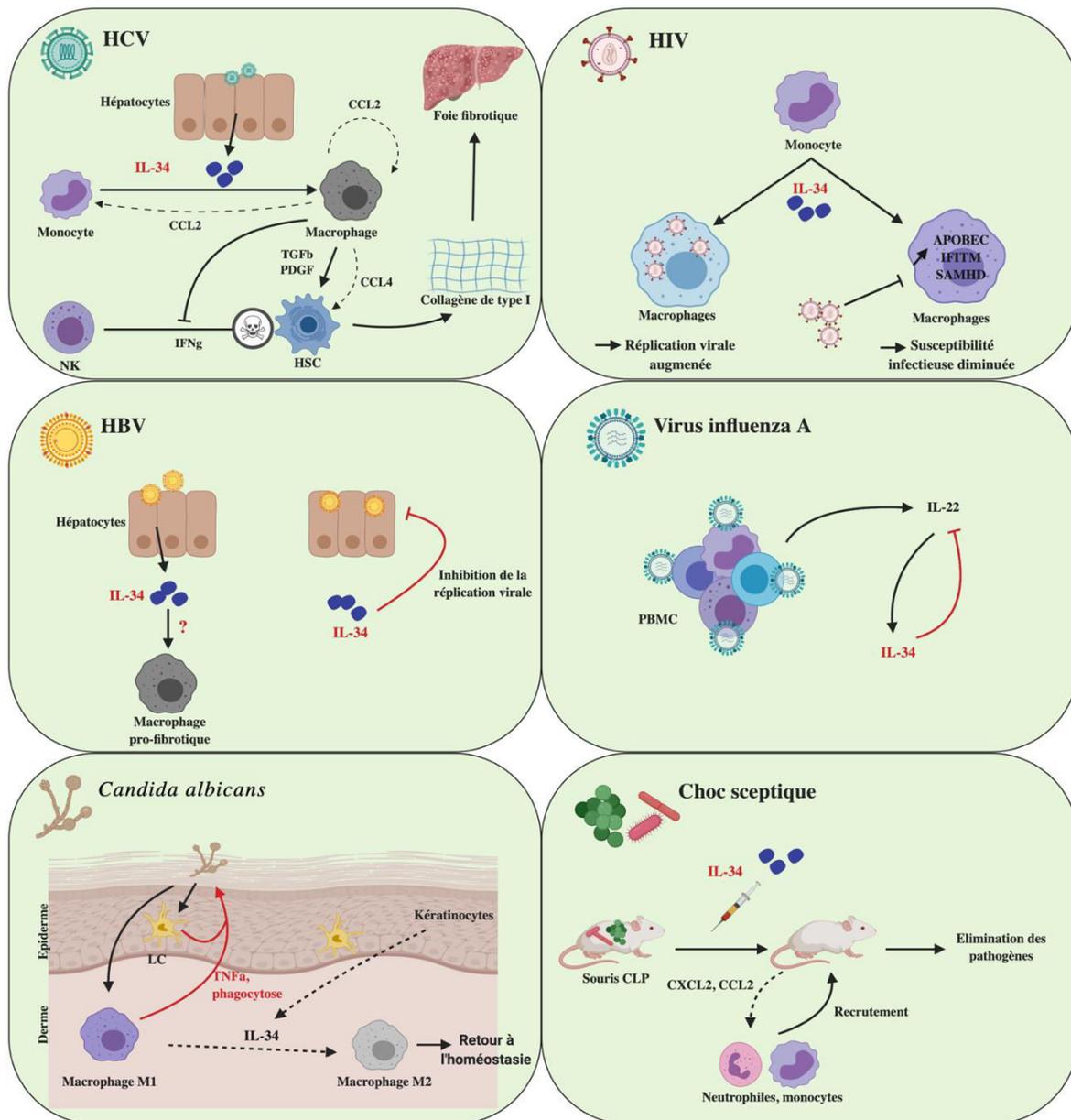


Figure 18: Schéma représentant les différents rôles de l'IL-34 dans les infections (adapté de Baghdadi et al., 2017). HCV : hepatitis C virus ; HIV : human immunodeficiency virus (virus de l'immunodéficience humaine : VIH); HBV : hepatitis B virus ; NK : natural killer ; HSC : hepatic stellate cell (cellule stellaire hépatique) ; PBMC : peripheral blood mononuclear cells ; LC : Langerhans cells (cellules de Langerhans) ; macrophage M1 : macrophage pro-inflammatoire ; macrophage M2 : macrophage pro-régulateur ; souris CLP : cecal ligation procedure (modèle de choc septique). → : induction ; —| : inhibition.

4.7. Le rôle régulateur de l'IL-34 à l'interface materno-fœtale

Pendant la grossesse, l'établissement d'une tolérance envers l'embryon est crucial. Ce processus se déroule dans le decidua par l'interaction entre les cellules trophoblastiques de l'embryon et les cellules immunitaires de la mère. Les macrophages sont fortement présents dans ce milieu et jouent un rôle prépondérant dans le remodelage vasculaire,

l'élimination des cellules apoptotiques ainsi que dans le contrôle de réponse immune (La Rocca et al., 2014). Lindeau *et al.* ont démontré que l'IL-34 était exprimée par le cyto- et le syncytiotrophoblaste placentaire ainsi que par les cellules stromales. De plus, *in vitro* l'IL-34 induit des macrophages de type 2 CD14⁺CD163⁺CD209⁺CD86^{lo} exprimant l'IL-10, similaires aux macrophages retrouvés dans le decidua suggérant un rôle régulateur de l'IL-34. A la différence du CSF-1, le taux d'IL-34 placentaire ne corrèle pas avec l'apparition de la pré-éclampsie (Lindau et al., 2018). De plus, dans le decidua, une équipe a mis en évidence que l'interaction des NK (dNK), qui sécrètent de l'IFN γ , avec les monocytes CD14⁺ permettait d'induire ces macrophages CD206⁺CD209⁺CD86^{lo}. En retour, ces cellules expriment de l'IDO et induisent l'expansion des Tregs nécessaires au maintien de la tolérance de l'embryon (Vacca et al., 2010) (**Figure 19 et tableau V, p80**). Par ailleurs, l'IL-34 est retrouvée en très forte concentration dans le lait maternel. Cette cytokine permettrait d'améliorer le développement de la tolérance orale et préviendrait le développement d'allergies (Dawod and Marshall, 2019).

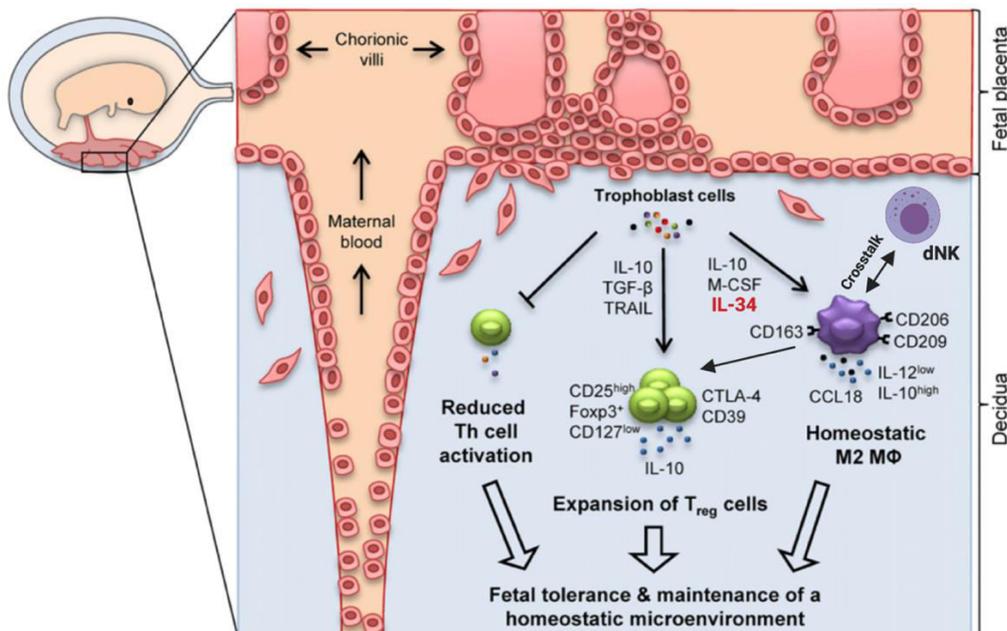


Figure 19: Représentation schématique des mécanismes d'induction d'un environnement tolérogène à l'interface materno-fœtale (Svensson-Arvelund et al., 2015).

5. Les rôles de l'IL-34 dans les maladies présentant des perturbations métaboliques

5.1. La corrélation de l'IL-34 avec l'obésité

L'obésité est caractérisée par un excès de tissu adipeux accompagné d'une inflammation chronique de faible grade. L'expression des cytokines pro-inflammatoires est augmentée ainsi que les protéines de phase aiguës (CRP) ou adipokines (Wellen and Hotamisligil, 2005). Le tissu adipeux est constitué de pré-adipocytes, d'adipocytes, de fibroblastes, de macrophages, de cellules endothéliales et d'autres cellules immunitaires. Cet état d'inflammation chronique est associé aux pathologies liées à la résistance à l'insuline comme le diabète de type II. Chez les patients obèses, l'inflammation chronique et le stress cellulaire influent sur les adipocytes qui sécrètent des facteurs de recrutement des macrophages dans le tissu adipeux. Ces macrophages participent au maintien de l'environnement pro-inflammatoire et leur nombre corrèle avec l'indice de masse corporelle (IMC) (González-Muniesa et al., 2017).

Dans une cohorte de femmes Coréennes obèses, l'IL-34 sérique est augmentée par rapport à des contrôles sains et corrèle positivement avec de nombreux paramètres comme l'IMC, la CRP, le volume de tissu adipeux vasculaire et sous-cutané ou l'index de résistance à l'insuline (HOMA-IR). De plus, les adipocytes et cellules stromales/vasculaires expriment le messageur de l'IL34 et de manière plus importante lors d'une stimulation par des macrophages, de l'IL-1 β ou du TNF α . Au niveau fonctionnel, les adipocytes traités avec des fortes concentrations d'IL-34 inhibent l'absorption de 2-deoxyglucose et favorisent l'accumulation des triglycérides. De manière intéressante, les patients ayant bénéficié d'un by-pass gastrique ont une production d'IL-34 sérique diminuée et corrélée à la perte de poids (Chang et al., 2014). L'IL-34 semble donc pouvoir être utilisée comme biomarqueur de l'obésité et il est possible que l'IL-34 soit sécrétée par les adipocytes comme moyen de régulation de l'environnement inflammatoire.

5.2. Le diabète de type II, un rôle de l'IL-34 à éclaircir

La résistance à l'insuline, favorisée par l'obésité peut se compliquer d'un diabète de type II. Le diabète implique une dérégulation de la sécrétion d'insuline par les cellules pancréatiques β induisant une glucotoxicité, une lipotoxicité, une stress cellulaire et

d'apoptose aboutissant à leur destruction. Le stress oxydatif ainsi que les facteurs environnementaux, génétiques et épigénétiques sont impliqués dans le développement du diabète de type II (Ndisang et al., 2017).

En 2011, une méta-analyse et une méthode d'association pangénomique ou *genome-wide association* (GWAS) ont permis d'identifier l'IL-34 parmi différents loci à risque dans le développement du diabète de type II dans une population Mexico-Américaine (Below et al., 2011). De plus, les *single nucleotides polymorphisms* (SNP) situés en position rs11647932, rs11645214 et rs6499323 sur le gène de l'*IL34* sont associés à un risque deux fois plus élevé de néphropathie diabétique dans une population chinoise (Liao et al., 2014). Par ailleurs, le taux sérique d'IL-34 est plus élevé chez les patients atteints de diabète de type II par rapport à des contrôles sains. L'analyse ROC a démontré que l'IL-34 est un meilleur facteur prédictif des complications diabétiques que la CRP. Néanmoins, les résultats de cette dernière étude sont à confirmer, le nombre de patients de la cohorte étant faible (n=49) (Zorena et al., 2016), le rôle fonctionnel de l'IL-34 dans le développement de la pathologie reste à être élucidé.

6. Le rôle de l'IL-34 dans les insuffisances cardiaques, une implication plus délétère dans les formes associées à une dysfonction rénale

L'insuffisance cardiaque est un état pathologique caractérisé par des anomalies cardiaques ne permettant plus de subvenir aux besoins en oxygène de l'organisme. L'insuffisance cardiaque systolique peut être due à une maladie coronarienne (coronaropathie) correspondant au rétrécissement des artères coronaires par des plaques d'athérome. De plus, les insuffisances cardiaques chronique et aigue peuvent être associées à des dysfonctions rénales (Metra and Teerlink, 2017). Des troubles hémodynamiques furent d'abord pensés comme seuls facteurs à l'origine du développement de l'insuffisance cardiaque, néanmoins différentes études ont mis en évidence une expression élevée de différentes cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α et l'IL-6 dans le sérum de ces patients suggérant leur implication. L'hypothèse des cytokines nait en 1996 et les définit comme participant au développement et à la progression de l'insuffisance cardiaque en association avec les neurohormones (Seta et al., 1996).

Différentes cytokines/marqueurs pro-inflammatoires (TNF α , IL-6, IL-18, HMGB1 et la CRP) sont des marqueurs de prédiction des maladies coronariennes. De plus, une étude dans une cohorte chinoise a révélé que l'IL-34 sérique était augmentée chez les patients souffrant de coronaropathie, que le taux corrélait avec la CRP et que l'IL-34 pouvait être définie comme facteur prédictif (Li et al., 2012). Ces résultats ont été confirmés par plusieurs études, dans l'insuffisance cardiaque chronique associée à une dysfonction rénale l'IL-34 est fortement associée aux paramètres rénaux incluant l'eGFR (DFGe : débit de filtration glomérulaire estimé) et la cystatine C. Plus généralement un taux élevé d'IL-34 est un facteur de mauvais pronostic dans l'insuffisance cardiaque chronique et aigue (Fan et al., 2016; Tao et al., 2017; Xi et al., 2018). La sévérité plus importante dans les formes associées aux dysfonctions rénales peut être due à la présence des récepteurs de l'IL-34 : CSF-1R et PTP ζ au niveau du rein. En effet, Baek *et al.* ont mis en évidence que la sécrétion d'IL-34 par les cellules épithéliales tubulaires du rein après une ischémie/reperfusion aboutissait à une dysfonction rénale aggravant le rejet de greffe (Baek et al., 2015). Dans une récente étude sur le développement de l'athérosclérose, l'IL-34 induit *in vitro* des macrophages exprimant CD36 favorisant l'accumulation de lipides intracellulaires générant des cellules chargées en lipides « mousseuses » (Liu et al., 2018), un processus initial clé dans la formation de l'athérosclérose.

7. Récapitulatif des rôles principaux de l'IL-34 en conditions physiologiques et pathologiques

Le **tableau V** ci-après regroupe les rôles clés de l'IL-34 dans le développement et l'homéostasie cellulaire ainsi que ses effets protecteurs ou délétères dans différentes conditions pathologiques.

Rôle physiologique	Rôle dans les pathologies			
	Effet protecteur de l'IL-34		Effet délétère de l'IL-34	
	Pathologie étudiée	Rôle	Pathologie étudiée	Rôle
Génération/homéostasie de la microglie	Maladie d'Alzheimer, sclérose en plaque	Neuro-protection	Maladie d'Huntington	Perte neuronale
	Rupture de la BHE	Rétablissement de l'intégrité de la BHE		
	VIH	Génération de macrophages chargés en particules virales	VIH	Génération de macrophages plus résistants à l'infection
Génération/homéostasie des LC	Dermatite atopique	?	CHS	Etablissement de la réponse inflammatoire
Survie, prolifération et différenciation des monocytes en macrophages	Cancer ovarien	Recrutement de TAM générant des Th17	Cancers	Recrutement de TAM
	Tx, interface materno-fœtale	Génération de M2	Lupus érythémateux systémique, ischémie/reperfusion	Prolifération des précurseurs hématopoïétiques, infiltration cellulaire rénale détruisant les TEC
	Choc septique	Recrutement de macrophages et neutrophiles éliminant les bactéries	Syndrome de Sjögren	Prolifération des monocytes CD14 ^{high} CD16 ⁺ pro-inflammatoires
			MICI	?
			Sclérodémie systémique, HBV, HCV, NAFLD	Génération de macrophages pro-fibrotiques
			Infection par <i>Candida albicans</i>	Orientation des M1 en M2
Formation d'ostéoclastes en association à RANKL		Cancers osseux, RA, parodontite	Destruction osseuse	

Tableau V: Tableau récapitulatif des rôles principaux de l'IL-34 en conditions physiologiques et pathologiques. BHE : barrière hémato-encéphalique ; VIH : virus de l'immunodéficience humaine ; LC : Langerhans cells (cellules de Langerhans) ; CHS : contact hypersensitivity ; TAM : tumor associated macrophage ; Tx : transplantation ; M2 : macrophage de type 2 (pro-régulateur) ; TEC : tubular epithelial cell (cellule épithéliale tubulaire rénale) ; MICI : maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ; HBV : hepatitis B virus ; HCV : hepatitis C virus ; NAFLD : non alcoholic fatty liver disease (maladie stéatosique non alcoolique du foie) ; M1 : macrophage de type 1 (pro-inflammatoire) ; RA : rhumatoid arthritis (polyarthrite rhumatoïde).

Projet de recherche

L'origine de mon projet de thèse repose sur des résultats décrits par notre équipe en 2007. En transplantation, le blocage de la voie de co-stimulation CD40-CD40L est une stratégie utilisée dans des modèles chez la souris et le primate. Dans ces modèles, le rejet du greffon est retardé mais très peu d'animaux développent une survie au long terme de leur greffon et les mécanismes n'ont pas été décrits (Zhang et al., 2015b).

Afin d'élucider les processus aboutissant à la prolongation de la survie du greffon, Guillot *et al.* ont développé un modèle d'allotransplantation cardiaque chez le rat dans lequel le blocage de la voie de co-stimulation CD40-CD40L par injection d'un adénovirus codant pour CD40lg (AdCD40lg) permet d'inhiber le rejet allogénique. Dans ce modèle, la transplantation est réalisée entre deux souches de rats Lewis présentant une incompatibilité totale du CMH. En effet, le rat donneur Lewis 1W est d'haplotype RT1^u et le receveur Lewis 1W est d'haplotype RT1^w. Dans cette configuration, le rejet cardiaque survient entre 8 et 10 jours post-transplantation. Après l'injection de l'adénovirus contrôle Add1324, le rejet survient en moyenne 10,8 jours post-transplantation alors que l'injection de l'AdCD40lg permet d'induire une survie au long terme (>200 jours) dans 83% des cas, néanmoins ces greffons présentent des signes de rejet chronique. Chez les rats présentant une survie au long terme de leur greffon, la réponse humorale anti-donneur est inhibée sur le court et long terme, mais ils conservent une réponse humorale normale contre d'autres antigènes. De plus, une seconde transplantation, soit avec un cœur du même haplotype que le précédent donneur (RT1^u) ou tierce partie (RT1ⁿ) chez les rats présentant une survie au long terme de leur greffon, induit un rejet rapide du greffon provenant d'une tierce partie alors que le greffon RT1^u est accepté avec une survie indéfinie (>200 jours). Ainsi, l'AdCD40lg permet de générer une réponse spécifique du donneur sans compromettre l'immunité contre d'autres antigènes (Guillot et al., 2002).

Guillonnet *et al.* ont poursuivi en identifiant la population cellulaire à l'origine de l'induction de la survie à long terme des greffons. En effet, le transfert des cellules T CD8⁺CD45RC^{low/-} induites provenant de rats présentant une survie au long terme de leur greffon vers un rat naïf et transplanté permet d'induire une survie indéfinie du greffon, à l'inverse des Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} naturelles (Guillonnet et al., 2007a). Afin d'étudier les mécanismes par lesquels ces Tregs inhibent le rejet, une analyse transcriptomique via des

puces pangénomiques a été réalisée en comparant les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} naturelles et les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} induits par CD40lg. Cette étude révèle 349 gènes différentiellement exprimés codant pour des protéines impliquées dans l'immunité ou non (résultats non publiés). Grâce à ces résultats, Guillonnet *et al.* ont démontré que les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} induits sécrétaient de l'IFN γ impliqué dans leurs fonctions suppressives. En effet, cette cytokine permettait l'induction de l'expression d'IDO par les cellules endothéliales du greffon et par les pDC (Guillonnet *et al.*, 2007a; Li *et al.*, 2010). L'IDO est une enzyme permettant la dégradation du tryptophane induisant un effet inhibiteur sur la prolifération des lymphocytes T effecteurs. Les travaux poursuivis par Bézie *et al.* ont permis d'identifier le FGL-2 comme une molécule sécrétée par les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} induites et impliquée dans leurs fonctions suppressives. En effet, la sécrétion de FGL-2 permet la génération de lymphocytes B régulateurs (Bregs) capables d'inhiber la prolifération de lymphocytes T CD4⁺CD25⁻ *in vitro* et d'induire la tolérance par transfert *in vivo* (Bézie *et al.*, 2015b).

Enfin, notre équipe a identifié que l'IL-34 était exprimée par les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} induits après le blocage de la voie de co-stimulation CD40-CD40L. De plus, cette sécrétion est impliquée dans leurs fonctions suppressives puisque son blocage ou celui de son récepteur CSF-1R *in vitro* lève la suppression. Néanmoins, de manière intéressante le blocage de CSF-1 ne permet pas d'abroger l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T CD4⁺CD25⁻. Chez l'Homme, les Tregs CD4⁺CD45RC^{low/-} et Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} naturels expriment l'IL-34 et ce, de manière plus importante parmi les cellules FoxP3⁺, à l'inverse les populations exprimant fortement CD45RC (CD45RC^{high}) qui n'expriment pas l'IL-34. De manière similaire au rat, le blocage de l'IL-34 *in vitro* abroge la suppression et l'ajout d'IL-34 protéique permet d'inhiber la prolifération des lymphocytes T CD4⁺CD25⁻ démontrant son rôle régulateur. Les résultats *in vitro* ont été confirmés *in vivo* : l'injection d'un virus adéno-associé codant pour l'IL-34 (AAV-IL-34) en association à une dose sous-optimale de rapamycine permet l'induction d'une survie au long terme dans 64% des cas dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat. Chez ces rats, les anticorps anti-donneur sont significativement diminués et aucun signe de lésions chroniques n'ont été identifiés dans les cœurs transplantés. De manière intéressante, le transfert des cellules myéloïdes ne permet pas d'induire la tolérance chez un nouveau receveur naïf transplanté. Seuls les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} et Tregs CD4⁺CD25^{high} sont capables du transfert de tolérance. L'analyse des

mécanismes d'induction de la survie prolongée a révélé que l'IL-34 permet le recrutement des macrophages pro-régulateurs CD14⁺Arg-1⁺ dans le greffon. En effet, la déplétion des macrophages par des clodronates liposomes rompt la tolérance dans le modèle d'allotransplantation cardiaque. Chez l'Homme, l'IL-34 permet de générer des macrophages au phénotype M2 exprimant CD163. De plus de manière intéressante, ces macrophages induisent la prolifération de façon très efficace des Tregs CD4⁺FoxP3⁺ et Tregs CD8⁺FoxP3⁺ augmentant leur fonction suppressive en comparaison à des Tregs naturels ou pré-stimulés (Bézie et al., 2015a). Ces résultats suggèrent une boucle de rétro-activation dans le cadre de l'allotransplantation, les Tregs induits expriment l'IL-34 qui différencie les monocytes en macrophages M2 intra-greffon qui, en retour vont stimuler les Tregs, augmentant ainsi la source d'IL-34 et l'environnement immunosuppresseur favorisant l'induction de la tolérance. Ces résultats ont pour la première fois démontré que l'IL-34 était exprimée par les Tregs et jouait un rôle dans leurs fonctions suppressives, mettant en évidence un nouveau rôle de l'IL-34 et ce, de façon indépendante du CSF-1.

Mon projet de thèse sur l'IL-34 s'inscrit dans la suite de ces résultats, tout d'abord sur un aspect plus fondamental. Pour cela, un modèle de rats déficients pour l'IL-34 (*Il34*^{-/-}) a été généré par la technologie CRISPR/Cas9. Brièvement, cette technologie permet via le complexe Cas9/sgRNA d'induire une coupure double brin ciblée de l'ADN. Ensuite, le mécanisme naturel de réparation de l'ADN, le *non-homologous end joining* (NHEJ) peut générer des erreurs aboutissant à des insertions ou des délétions d'acides nucléiques pouvant induire un « knock-out », c'est à dire une absence d'expression protéique du gène ciblé. L'ajout d'un ADN donneur permet de favoriser le mécanisme *homology directed repair* (HDR) et cet ADN peut être inséré au niveau des coupures générant ainsi une mutation ciblée. L'utilisation de ce modèle déficient chez le rat ainsi que chez la souris (*Il34*^{LacZ/LacZ} fourni par M.Colonna) ont permis d'étudier l'impact de la déficience en *Il34* sur l'homéostasie générale des animaux par l'analyse des différentes populations cellulaires. D'approfondir l'étude sur l'absence d'expression de l'IL-34 sur les fonctions des lymphocytes T effecteurs et des Tregs *in vitro* et *in vivo*. Grâce aux souris déficientes en *Il34* (*Il34*^{LacZ/LacZ}), j'ai aussi pu étudier l'implication de l'IL-34 dans un modèle d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale. De plus, nous avons étudié le potentiel thérapeutique de l'IL-34 dans un modèle de GVHD xénogénique et de rejet de peau allogénique chez la souris humanisée.

Parallèlement, j'ai étudié le potentiel de l'IL-34 comme biomarqueur de prédiction en cherchant une corrélation entre l'IL-34 sérique et le devenir du greffon dans une cohorte de patients transplantés rénaux. De plus, dans une seconde cohorte de patients greffés avec du sang placentaire, nous avons analysé l'expression de l'IL-34 par les Tregs CD4⁺ et Tregs CD8⁺ en fonction de l'incidence de la GVHD.

Partie I - Critical role of the regulatory cytokine IL-34 in Treg function.

Antoine Freuchet^{1,3}, Apolline Salama^{1,3}, Séverine Bézie^{1,3}, Laurent Tesson^{1,3}, Séverine Rémy^{1,3}, Hadrien Règue¹, Léa Flippe^{1,3}, Pärt Peterson⁵, Nadège Vimond^{1,3}, Claire Usal^{1,3}, Séverine Ménoret^{2,3}, Jean-Marie Heslan^{1,3}, Franck Duteille⁷, Frédéric Blanchard⁴, Marco Colonna⁶, Ignacio Anegon^{1,3*} and Carole Guillonnet^{1,3*}

¹ Nantes Université, Inserm, Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie, UMR 1064, ITUN, F-44000 Nantes, France.

² Nantes Université, CHU Nantes, Inserm, CNRS, SFR Santé, Inserm UMS 016, CNRS UMS 3556, F-44000 Nantes, France.

³ LabEx IGO “Immunotherapy, Graft, Oncology”, Nantes, France.

⁴ INSERM UMR1238, Bone Sarcoma and remodeling of calcified tissues, Nantes University, 44093 Nantes, France.

⁵ Institute of Biomedicine and Translational Medicine, University of Tartu, Tartu, Estonia.

⁶ Department of Pathology and Immunology, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO 63110, USA.

⁷ Chirurgie Plastique Reconstructrice et Esthétique, CHU Nantes, Nantes, France

*Co-authors

Corresponding authors: Dr. Carole Guillonnet and Dr. Ignacio Anegon, INSERM UMR1064 – Center for Research in Transplantation and Immunology-ITUN, 30 Bd Jean Monnet, 44093, Nantes Cedex 01, France. Phone: (+33) 2 40087410, Fax: (+33) 2 40087411. E-mail address: carole.guillonnet@univ-nantes.fr and ignacio.anegon@univ-nantes.fr

Conflict of interest: The authors have patents registered on IL-34.

Keywords. IL-34, Treg, tolerance, Foxp3, autoimmunity, immunotherapy, CRISPR/Cas9, rat, knockout.

Abstract.

Immune homeostasis requires competent Tregs that must maintain a stable phenotype to control autoimmunity. IL-34 is a cytokine first described as mainly involved in myeloid cell survival and differentiation. However, we recently described the expression of IL-34 by induced FOXP3⁺ CD4⁺ and CD8⁺ Tregs in healthy individuals in human and in a rat model of transplantation tolerance. Here we report that the absence of expression of IL-34 in *Il34*^{-/-} animals lead to an unstable phenotype exacerbated under inflammatory conditions. *In vivo*, we revealed the inability of *Il34*^{-/-} CD4⁺ Tregs to protect *IL2rg*^{-/-} rats from wasting disease in contrast to *Il34*^{+/+} CD4⁺ Tregs. We also showed the regulatory potential of recombinant human IL-34 (rhIL-34) to delay xenogeneic GVHD development and human skin allograft rejection in immune humanized immunodeficient NSG mice models. Altogether, our data unravel the crucial role of IL-34 in CD4⁺ Treg suppressive function and its therapeutic potential in transplantation.

Introduction

IL-34 is a cytokine that we have recently identified as significantly overexpressed in induced CD8⁺ Tregs from long-term tolerant grafted animals (treated with CD40Ig, a chimeric molecule blocking the CD40-CD40L pathway) versus naive CD8⁺ Tregs from naive animals (1–3). Further analysis showed that IL-34 expression in T cells is indeed restricted to activated Foxp3⁺ CD4⁺ and CD8⁺ Tregs versus Foxp3⁻ CD4⁺ and CD8⁺ T cells and involved in their function in both rat and human (1). We also showed that treatment with IL-34 efficiently inhibited allograft rejection *in vivo* in rat and suppressed both rat and human effector CD4⁺CD25⁻ T cell proliferation *in vitro* and induced both Foxp3⁺ CD4⁺ and CD8⁺ Tregs *in vitro* and *in vivo* (1, 4). IL-34 is a homodimeric cytokine binding the three distinct receptors, namely CSF-1R (also called c-fms or CD115), CD138 (also called syndecan-1) and PTP ζ (a protein-tyrosine phosphatase) (5, 6). CSF-1 also binds to CD115 but with a lower affinity than IL-34, and they both induce the survival and differentiation of monocytes toward type 2 regulatory macrophages (7, 8). Of note, IL-34 and CSF-1 spatio-temporal expression is mainly distinct and CSF-1 does not bind to CD138 and PTP ζ . *Il34^{LacZ/LacZ}* mice did not show spontaneous autoimmunity or inflammatory diseases (9), but that could be due to compensation of IL-34 deficiency by CSF-1. Increased IL-34 sera levels have been associated to inflammatory diseases (5, 6), however a suppressive role for IL-34 has also been demonstrated in a model of liver transplantation in rat (10). Thus, IL-34 could have tolerogenic anti-inflammatory or pro-inflammatory roles or both and IL-34 role in induced Tregs is unknown.

Results and Discussion

To gain further knowledge on the immunoregulatory role of IL-34, we generated an *Il34* deficient rat model using CRISPR/Cas9 targeting exon 3 of the rat *Il34* gene (Figure 1A and Supplemental Figure 1A) and confirmed the significant decrease of *Il34* mRNA expression (residual mRNA detected being due to mRNA produced with an immature STOP codon before a rapid degradation) (Figure 1B). While the animals look healthy with normal appearance (Supplemental Figure 1B), normal growth (Supplemental Figure 1C) and normal bone mass (Supplemental Figure 1D, E), we observed significantly decreased microglia (CD11b/c⁺ cells) in the hippocampus, but not the cerebellum, of the *Il34*^{-/-} animals (Figure 1C, D and Supplemental Figure 1F). In addition, sera analysis showed a significant increase of ALT enzyme levels and ALT/LDH ratio and a trend to an increase of alkaline phosphatase that altogether could reflect liver injury (Figure 1E), increased auto-antibodies production against IFN α 4 and IFN α 11 in *Il34*^{-/-} rats (Figure 1F) and increased inflammatory chemokine MIP-2 and decreased eosinophil chemotactic proteins (Eotaxin) and regulatory TGF- β 3 cytokine (Figure 1G), altogether suggesting an auto-inflammatory status. Nevertheless, histological analysis of several organs did not show evidence of tissue lesions or inflammatory infiltrates (Supplemental Figure 1G). Serum levels of different immunoglobulin isotypes were normal as well as antibodies directed against dsDNA (data not shown). We then investigated whether, as compensatory mechanisms that would diminish the auto-immune signs and symptoms, CSF-1 would be upregulated and indeed found significantly higher levels of CSF-1 in the sera of the *Il34*^{-/-} animals (Figure 1H), suggesting a negative regulation of CSF-1 by IL-34 complementary to the positive regulation of CSF-1 on IL-34 previously described (11).

We then further analyzed the impact of the deficiency on immune cells. Absolute numbers of cells were slightly decreased in thymus, spleen and blood from *Il34*^{-/-} animals (Figure 2A). As

thymus subsets composition (DN, DP and SP cells), the B cell compartment and the myeloid cell compartment were not significantly affected (Supplemental Figure 2A-C), CD8⁺ T cells from spleen and blood were significantly decreased in *Il34*^{-/-} animals (Figure 2B). We did not observe significant changes in the phenotype of Foxp3⁺ or Foxp3⁻ CD4⁺ or CD8⁺ T cells (Supplemental Figure 2D-E), however we observed a significant increase in the proliferation capacity of CD8⁺ T cells in presence of a polyclonal stimulation (Figure 2C) and similar proliferation capacity for both CD4⁺ and CD8⁺ Tregs (Figure 2D). To determine whether IL-34-deficiency would lead to increased susceptibility to autoimmune diseases, we used the rat model of TNBS induced-colitis (Figure 2E) and the mouse model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) triggered by MOG_{p35-55} and mycobacterium using IL-34 deficient mice (*Il34*^{LacZ/LacZ} mice) (Figure 2F) (9), two common inflammatory disease models. The *Il34*^{-/-} rats showed a decreased colon length 6 days after TNBS injection (Figure 2E) and the *Il34*^{LacZ/LacZ} mice developed EAE faster and more severely as shown by the score and the weight loss (Figure 2E), than the *Il34*^{+/+} animals. Thus, IL-34 deficiency seems to lead to an unstable immunological phenotype exacerbated under inflammatory conditions.

Considering the critical role of Tregs in the maintenance of homeostasis and to determine the role of IL-34 in Treg-mediated suppression, we tested CD4⁺ and CD8⁺ Tregs from *Il34*^{-/-} rats for their capacity to control *in vivo* wasting disease in a model of *Il2rg*^{-/-} rats injected with pathogenic CD4⁺ Teff cells (Figure 3A) (12). Strikingly, *Il34*^{-/-} CD4⁺ Tregs were unable to control the development of wasting disease in *Il2rg*^{-/-} animals and death occurred in a similar manner than the condition without CD4⁺ Tregs, in contrast to CD4⁺ Tregs from *Il34*^{+/+} rats that efficiently control wasting disease development (Figure 3B), demonstrating the critical role of IL-34 in CD4⁺ Treg suppressive activity. Histological analysis of the liver and colon from all groups confirmed the cell infiltration and tissue lesions in *Il2rg*^{-/-} animals injected with CD4⁺ Teff cells with or without CD4⁺ Tregs from *Il34*^{-/-} animals, in contrast to animals

injected with CD4⁺ Tregs from *Il34*^{+/+} animals (Figure 3C). Although we did not observe a protective role of CD8⁺ Tregs in this model for both *Il34*^{+/+} and *Il34*^{-/-} CD8⁺ Tregs (Figure 3D), we observed decreased infiltration in liver and colon in animals injected with CD8⁺ Tregs from *Il34*^{+/+} animals compared to animals injected with CD4⁺ Teff cells with or without CD8⁺ Tregs from *Il34*^{-/-} animals (Figure 3E), suggesting that *Il34*^{-/-} CD8⁺ Tregs had partially lost their protective function. To understand how IL-34 deficiency had modified the transcriptomic signature of both CD4⁺ and CD8⁺ Tregs in *Il34*^{-/-} animals versus *Il34*^{+/+} animals, we performed 3'-DGE-RNAseq. The data obtained presented a phenotype for CD4⁺ and CD8⁺ Tregs in *Il34*^{-/-} animals that is not distinct from CD4⁺ and CD8⁺ Tregs in *Il34*^{+/+} animals, except for one gene, *Dnaj1*, a co-chaperone of heat shock protein, identically dysregulated between CD4⁺ and CD8⁺ Tregs and increased in Tregs from *Il34*^{-/-} animals (Figure 3F). Thus, the defect in suppressive capacity observed for Tregs from *Il34*^{-/-} animals is only due to the defect in IL-34 that acts on APCs inducing a tolerogenic function (1, 8) and not of a modification of their own transcriptome.

These data present a critical role for IL-34 in Treg-mediated suppression, however the question of IL-34 capacity to sufficiently induce transplant tolerance in human remains. Thus, we used a model of human xenogeneic GVHD (Figure 4A) or human skin transplantation allo-rejection (Figure 4D) in immune humanized immunodeficient NSG mice in which we administered recombinant human IL-34 (rhIL-34) protein (either i.p. or using mini-osmotic pump delivering a constant rate of protein) and assessed GVHD or skin rejection. Administration for 30 days of rhIL-34 protein in association with a sub-optimal dose of rapamycin for 10 days resulted in significant delay in weight loss and subsequent mice survival in the GVHD model (Figure 4B). Analysis of the proportion of hCD45⁺ cells showed a decrease in animals treated with rapamycin alone vs. untreated animals and equal inhibition in animals co-treated with rapamycin and rhIL-34 and no significant differences in the

distribution of hCD45⁺ cells in any of the groups (Figure 4C), suggesting that the effect of IL-34 is not due to inhibition of human lymphocyte proliferation. Administration of rhIL-34 combined to rapamycin in the skin transplantation model resulted in significant delay in skin graft rejection with induction of long-term skin survival in 25% of the recipients (Figure 4E). These data demonstrate that rhIL-34 in combination with a suboptimal dose of rapamycin is sufficient to suppress effector T cell function.

We have identified here IL-34 as a new actor of Treg-mediated suppression, playing a critical role in homeostasis and control of effector T cell responses. IL-34 in the T cell lineage seems to be restricted to Foxp3⁺ CD4⁺ and CD8⁺ Tregs (1) acting as a major suppressor component of their activity but it is also expressed by other cell subsets such as neurons playing also a major and protective role for the microglia (13, 14). IL-34 deficiency led to a mild phenotype *in vivo* at resting state, probably due to the CSF-1 over-expression that may partially compensate IL-34 deficiency in their common overlapping function, particularly in monocyte differentiation. We still observed some features of a disturbed immune system and clear differences on the CD8⁺ T cell lineage distribution pattern, however upon antigen challenge; we revealed the increased susceptibility of IL-34 deficient mice to EAE. That effect could be due to decrease neuronal protection by lower numbers of microglia, due to the absence of IL-34 but this is only observable in some areas of the CNS and thus it is more likely that is due to a lower Treg activity on APCs both in the CNS and the periphery. Although CSF-1 is upregulated and has also been shown as playing a role in neuronal protection (15, 16), its role on Treg-mediated suppression has not been established and in an organ transplant model CSF-1 did not play a role (1). In patients, IL-34 upregulation has been observed and mainly associated to pathophysiological situations and participating in the auto-immune symptoms, however, the exact contribution of IL-34 in these diseases has not been elucidated and IL-34 upregulation could be a compensatory mechanism as a consequence of autoimmunity, rather

than the cause (5, 6), although it might depend also on the expression of CSF-1 that act as a positive regulator of IL-34 (11). IL-34 targeting has mainly shown potential in viral infection situations where monocytes are involved (17, 18). Here we show that administration of rhIL-34 represents a new therapeutic strategy for manipulation of immune responses and treatment of transplantation and autoimmune diseases.

Methods

Please see Supplemental Methods for a detailed description of all experimental procedures.

Study Approval.

All animal care procedures were approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the Pays de la Loire region, France, in accordance with the guidelines from the French National Research Council for the Care and Use of Laboratory Animals (permits numbers CEEA-PdL-n°6, APAFIS #7634, #12377, #20640 and #2162)

Author contributions

A.F. contributed to data collection, experimentation, analysis and writing of the manuscript.

A.S., S.B., L.T., N.V., H.R., L.F., P.P., S.R. and F.B. contributed to data collection, experimentation and analysis.

C. U., J.-M.H., S.R., S.M., F.D. and M.C. contributed critical reagents.

I.A. and C.G. led and conceived the project, obtained funding, analyzed the data and wrote of the manuscript.

Acknowledgments. We thank Séverine Battaglia (Inserm UMR1238, Nantes, France) for performing the Micro-CT analysis. We thank Ms Maire Pihlap for the help with LIPS analysis. This work was partially funded by Labex IGO project (n°ANR-11-LABX-0016-01). This work was realized in the context of the IHU-Cesti project (ANR-10-IBHU-005). Labex IGO and IHU-Cesti projects are part of the « Investissements d’Avenir » French Government program managed by the ANR. The IHU-Cesti project is also supported by Nantes Métropole and Région Pays de la Loire. This work was funded by the Agence Nationale de la Recherche ANR-17-CE18-0008, the Fondation du rein “Don de Soi – Don de Vie 2017 FdR-Trans-Forme/FRM” and the Agence de la Biomedecine. This work was also realized in the context of the support provided by the Fondation Progreffe.

References

1. Bézie S et al. IL-34 is a Treg-specific cytokine and mediates transplant tolerance. *J. Clin. Invest.* 2015;125(10):3952–3964.
2. Guillonneau C et al. CD40Ig treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN-gamma, and indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Clin. Invest.* 2007;117(4):1096–1106.
3. Flippe L, Bézie S, Anegon I, Guillonneau C. Future prospects for CD8⁺ regulatory T cells in immune tolerance [Internet]. *Immunological Reviews* [published online ahead of print: October 8, 2019]; doi:10.1111/imr.12812
4. Bézie S et al. Ex Vivo Expanded Human Non-Cytotoxic CD8⁺CD45RC^{low} Tregs Efficiently Delay Skin Graft Rejection and GVHD in Humanized Mice. *Frontiers in Immunology* 2018;8:2014.
5. Guillonneau C, Bézie S, Anegon I. Immunoregulatory properties of the cytokine IL-34. *Cell. Mol. Life Sci.* 2017;74(14):2569–2586.
6. Baghdadi M et al. Interleukin-34, a comprehensive review. *J. Leukoc. Biol.* 2018;104(5):931–951.
7. Lin H et al. Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome. *Science* 2008;320(5877):807–811.
8. Foucher ED et al. IL-34 induces the differentiation of human monocytes into immunosuppressive macrophages. antagonistic effects of GM-CSF and IFN γ . *PLoS ONE* 2013;8(2):e56045.
9. Wang Y et al. IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. *Nat. Immunol.* 2012;13(8):753–760.
10. Zhao Z et al. IL-34 Inhibits Acute Rejection of Rat Liver Transplantation by Inducing Kupffer Cell M2 Polarization. *Transplantation* 2018;102(6):e265–e274.
11. Wei S et al. Functional overlap but differential expression of CSF-1 and IL-34 in their CSF-1 receptor-mediated regulation of myeloid cells. *J. Leukoc. Biol.* 2010;88(3):495–505.
12. Powrie F. OX-22^{high} CD4⁺ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by the OX-22^{low} subset [published erratum appears in *J Exp Med* 1991 Apr 1;173(4):1037]. *Journal of Experimental Medicine* 1990;172(6):1701–1708.
13. Ma D et al. TGF- β induced by interleukin-34-stimulated microglia regulates microglial proliferation and attenuates oligomeric amyloid β neurotoxicity. *Neurosci. Lett.* 2012;529(1):86–91.
14. Mizuno T et al. Interleukin-34 Selectively Enhances the Neuroprotective Effects of Microglia to Attenuate Oligomeric Amyloid- β Neurotoxicity. *The American Journal of Pathology* 2011;179(4):2016–2027.
15. Luo J et al. Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) signaling in injured neurons facilitates protection and survival. *J. Exp. Med.* 2013;210(1):157–172.
16. Kana V et al. CSF-1 controls cerebellar microglia and is required for motor function and social interaction. *J. Exp. Med.* 2019;216(10):2265–2281.
17. Ciccia F et al. IL-34 is overexpressed in the inflamed salivary glands of patients with Sjogren's syndrome and is associated with the local expansion of pro-inflammatory CD14(bright)CD16⁺ monocytes. *Rheumatology (Oxford)* 2013;52(6):1009–1017.
18. Lin X et al. Interleukin-34 Ameliorates Survival and Bacterial Clearance in Polymicrobial Sepsis*. *Critical Care Medicine* 2018;46(6):e584–e590.
19. Ménoret S et al. Generation of Immunodeficient Rats With Rag1 and Il2rg Gene Deletions and Human Tissue Grafting Models. *Transplantation* 2018;102(8):1271–1278.

20. Ménoret S et al. Homology-directed repair in rodent zygotes using Cas9 and TALEN engineered proteins [Internet]. *Scientific Reports* 2015;5(1). doi:10.1038/srep14410
21. Tesson L et al. Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. *Nat. Biotechnol.* 2011;29(8):695–696.
22. Chenouard V et al. A Rapid and Cost-Effective Method for Genotyping Genome-Edited Animals: A Heteroduplex Mobility Assay Using Microfluidic Capillary Electrophoresis. *Journal of Genetics and Genomics* 2016;43(5):341–348.
23. Burbelo PD, Ching KH, Klimavicz CM, Iadarola MJ. Antibody Profiling by Luciferase Immunoprecipitation Systems (LIPS). *JoVE* 2009;(32):1549.
24. Kärner J et al. Anti-cytokine autoantibodies suggest pathogenetic links with autoimmune regulator deficiency in humans and mice: Anti-cytokine autoantibodies in mice and humans. *Clin Exp Immunol* 2013;171(3):263–272.
25. Morris GP et al. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1989;96(3):795–803.
26. Picarda E et al. Transient antibody targeting of CD45RC induces transplant tolerance and potent antigen-specific regulatory T cells. *JCI Insight* 2017;2(3):e90088.
27. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15(12):550.

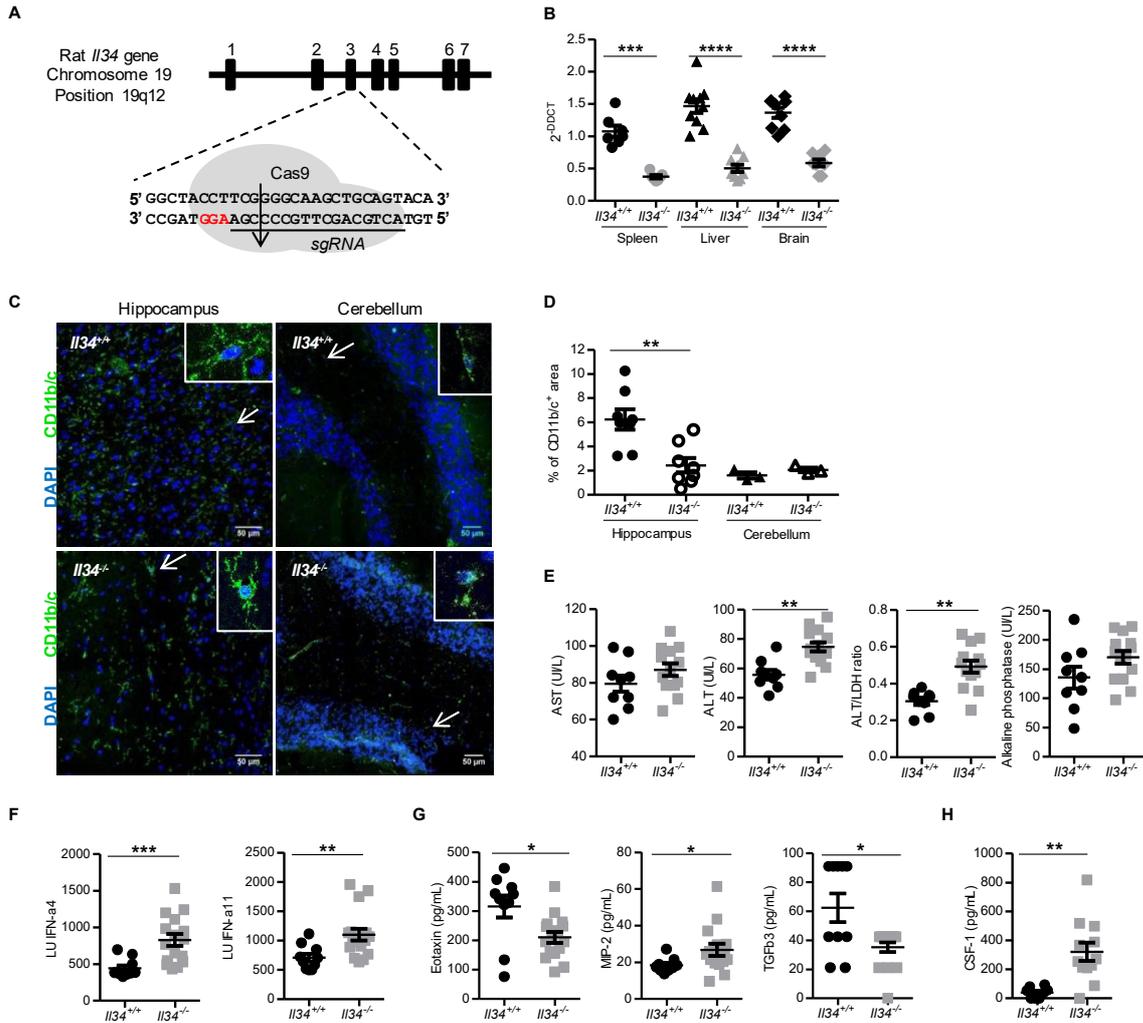


Figure 1. Generation and characterization of *Il34*^{-/-} rats by CRISPR/Cas9. (A) Schematic representing the Cas9/sgRNA targeting the exon 3 of the *Il34* gene inducing a genomic DNA cut (arrow). PAM sequence is in red. (B) *Il34* mRNA expression was assessed by quantitative real-time PCR on extracted RNA from spleen, liver and brain of *Il34*^{+/+} (n=7-10) and *Il34*^{-/-} rats (n=7-9). Results are normalized to *HPRT* and expressed as $2^{-\Delta\Delta CT} \pm SEM$. (C) Confocal microscopy was performed on *Il34*^{+/+} and *Il34*^{-/-} rats frozen brains stained with an antibody directed against CD11b/c (OX42; green) and DAPI (blue). Arrows indicate a representative stained cell. Original magnification, x800. Scale bar 50 μm . (D) Quantification of positive CD11b/c staining areas in *Il34*^{+/+} and *Il34*^{-/-} rats' hippocampus (*Il34*^{+/+}, n=8; *Il34*^{-/-}, n=8) and cerebellum (*Il34*^{+/+}, n=3; *Il34*^{-/-}, n=3) slices. Each dot represents an individual animal and results are expressed as mean \pm SEM. (E) Blood from 4 months old *Il34*^{+/+} (n=9) and *Il34*^{-/-} (n=14) rats was taken on heparin to quantify AST, ALT, ALT/LDH ratio and alkaline phosphatase in the plasma. (F) Auto-antibodies against murine interferon (IFN)- α 4 and IFN- α 11 were assessed in sera by LIPS assay (*Il34*^{+/+}, n=10 and *Il34*^{-/-}, n=16). (G) Eotaxin, TGF- β 3 and MIP-2 proteins levels were quantified by Luminex assay in the sera of *Il34*^{+/+} (n=10) and *Il34*^{-/-} (n=16) rats. (H) CSF-1 protein was quantified by ELISA in the sera of *Il34*^{+/+} (n=8) versus *Il34*^{-/-} rats (n=12). Results are expressed as mean \pm SEM. Mann Withney *U* test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

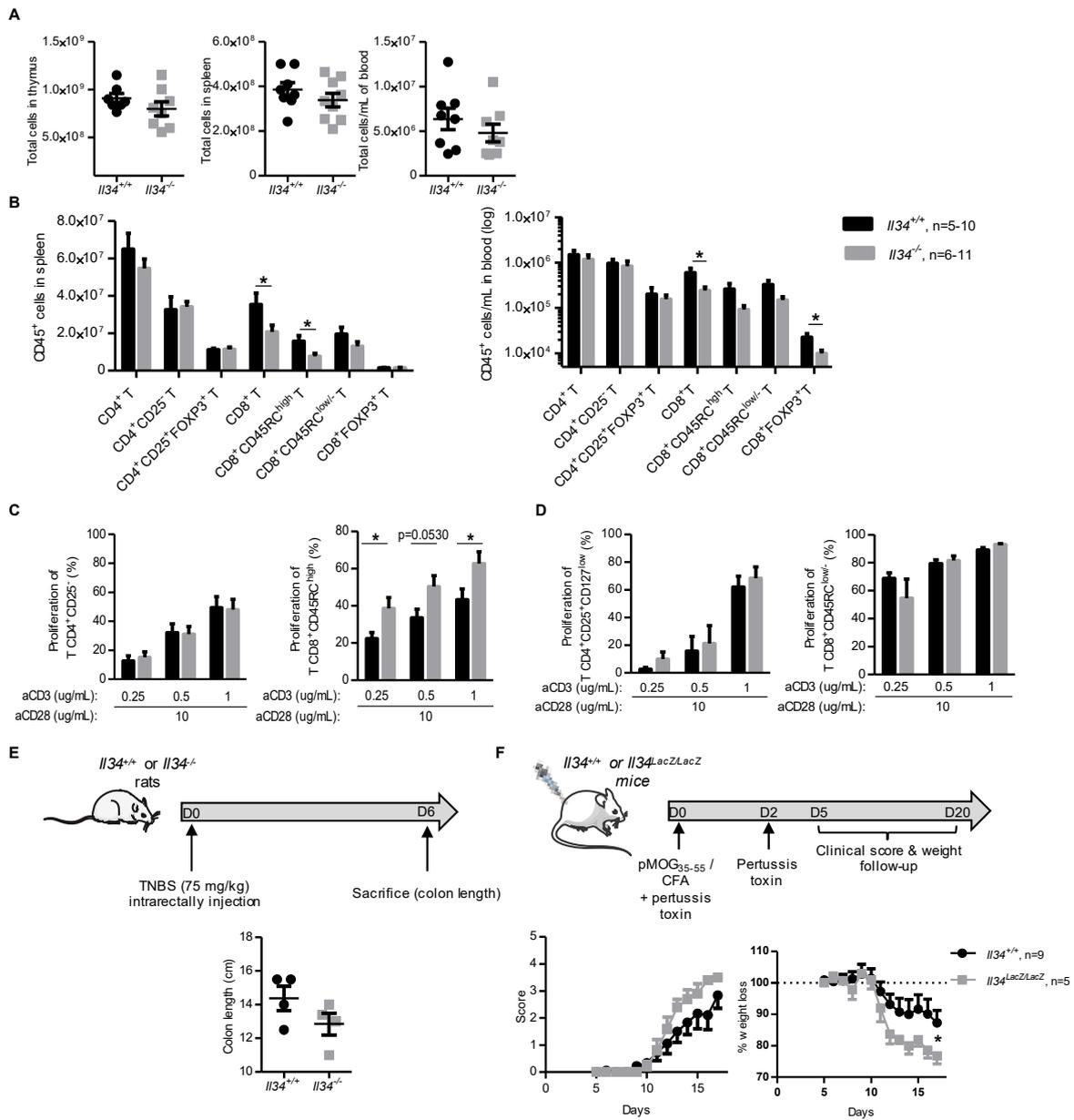


Figure 2. IL-34 deficiency affects CD8⁺ T cells homeostasis and immune response and susceptibility to autoimmune diseases. (A) Absolute numbers of cells were analyzed in thymus, spleen and blood of >10 months olds $Il34^{+/+}$ (n=5-10) and $Il34^{-/-}$ (n=6-11) rats. (B) Absolute numbers of T cell subsets were analyzed in spleen (left) and blood (right) of >10 months olds $Il34^{+/+}$ (n=5-10) and $Il34^{-/-}$ (n=6-11) rats using markers described in *Supplemental Methods*. (C) Effector TCR $\alpha\beta^+$ CD4⁺CD25⁻ (CD4⁺ T eff) and TCR $\alpha\beta^+$ CD4⁻CD45RC^{high} (CD8⁺ T eff) and (D) regulatory TCR $\alpha\beta^+$ CD4⁺CD25⁺CD127^{low} (CD4⁺ Tregs) and TCR $\alpha\beta^+$ CD4⁻CD45RC^{low/-} (CD8⁺ Tregs) Tregs from $Il34^{+/+}$ (n=5-9) or $Il34^{-/-}$ (n=4-7) rats were sorted and tested for proliferation activity at day 2 (D2) or D3, respectively, with increasing concentration of anti-CD3 (0.25-0.5-1 ug/mL) with anti-CD28 (10 ug/mL) mAbs. Results are represented as mean \pm SEM. (E) TNBS-induced colitis was performed on $Il34^{+/+}$ (n=4) and $Il34^{-/-}$ (n=4) rats via the intrarectal injection of TNBS at 75 mg/kg. Colon length was measured at day 6 post-injection. Each dot represents an animal. Results are represented as mean \pm SEM. (F) Adult $Il34^{+/+}$ (n=9) and $Il34^{LacZ/LacZ}$ (n=5) C57BL/6J mice of 8 weeks-old were immunized with the peptide MOG₃₅₋₅₅ and mycobacterium for EAE induction. The development of the disease was followed by a daily clinical score and weight assessment. Results are represented as mean \pm SEM. Mann Whitney U test, * $p < 0.05$.

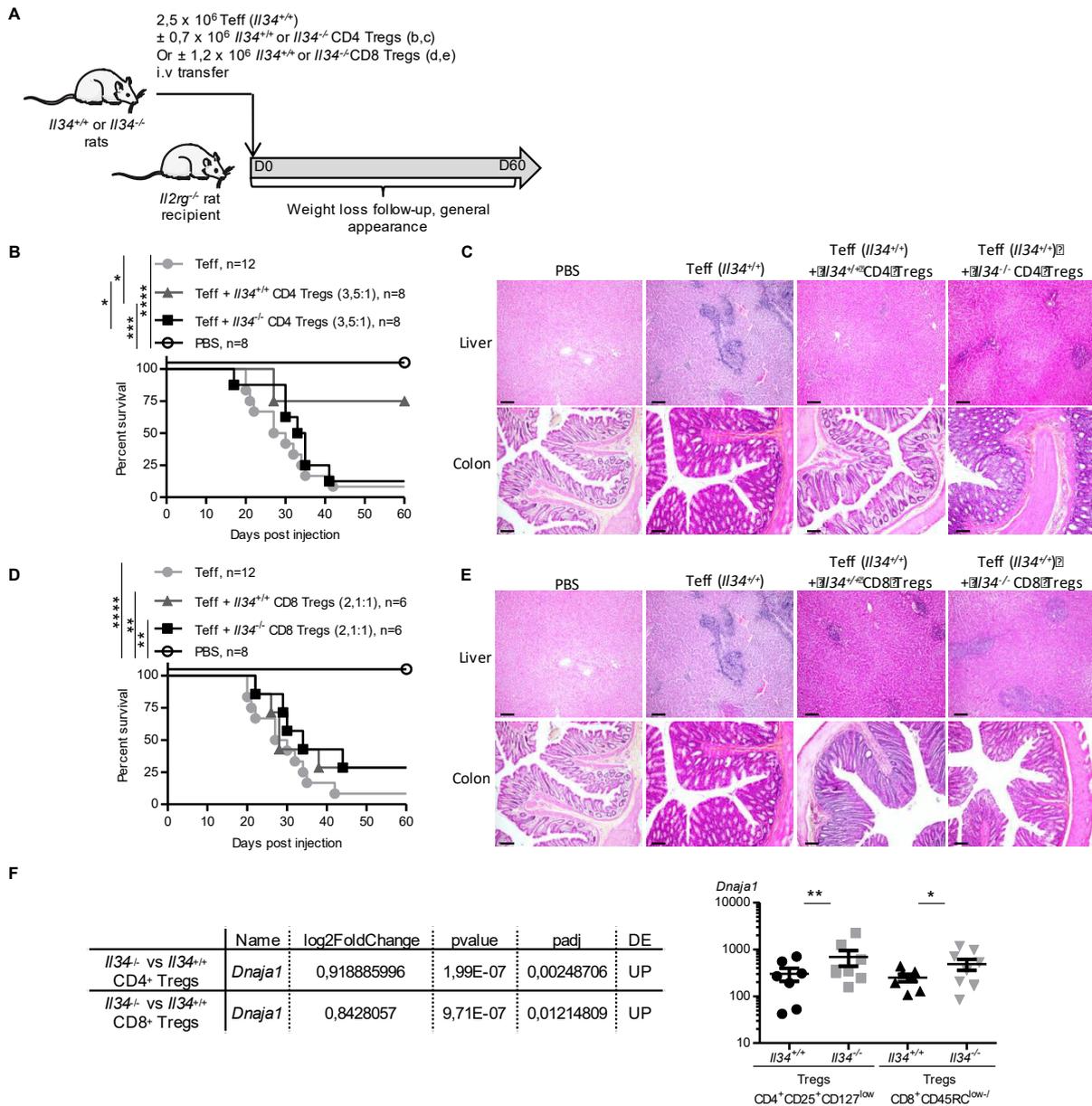


Figure 3. *Il34*^{-/-} Tregs fail to control the wasting disease. (A) schematic showing the depicting the wasting disease model. (B) 6 weeks old *Il2rg*^{-/-} rats were injected i.v with 2.5.10⁶ TCRαβ⁺CD4⁺CD45RC^{high} Teffs from *Il34*^{+/+} rats (Teff; n=12) in association or not with TCRαβ⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{low} Tregs (CD4⁺ Tregs; 3.5:1 Teff:Tregs ratio) from *Il34*^{+/+} (n=8) or *Il34*^{-/-} (n=8) rats in 7 different experiments. (C) Liver and colon sections of injected *Il2rg*^{-/-} rats were stained with HES (original magnification x10, scale bar 20 μm). Data are representative of 6 animals. (D) 6 weeks old *Il2rg*^{-/-} rats were injected i.v with TCRαβ⁺CD4⁺CD45RC^{high} Teffs from *Il34*^{+/+} rats (Teff) in association or not with TCRαβ⁺CD4⁺CD45RC^{low/-} Tregs (CD8⁺ Tregs; 2.1:1 Teff:Tregs ratio) from *Il34*^{+/+} (n=6) or *Il34*^{-/-} (n=6) rats in 5 different experiments. (E) Liver and colon sections of injected *Il2rg*^{-/-} rats were stained with HES (Original magnification x10). Data are representative of 6 animals. (F) 3' DGE-RNA sequencing analysis was performed on sorted TCRαβ⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{low} Tregs (CD4⁺ Tregs) and TCRαβ⁺CD4⁺CD45RC^{low/-} Tregs (CD8⁺ Tregs) from *Il34*^{+/+} (n=7) and *Il34*^{-/-} rats (n=8-9). The table is recapitulating the only gene differentially expressed between *Il34*^{-/-} vs *Il34*^{+/+} CD4⁺ Tregs and *Il34*^{-/-} vs *Il34*^{+/+} CD8⁺ Tregs. Log-rank test, * *p*<0.05, *** *p*<0.001.

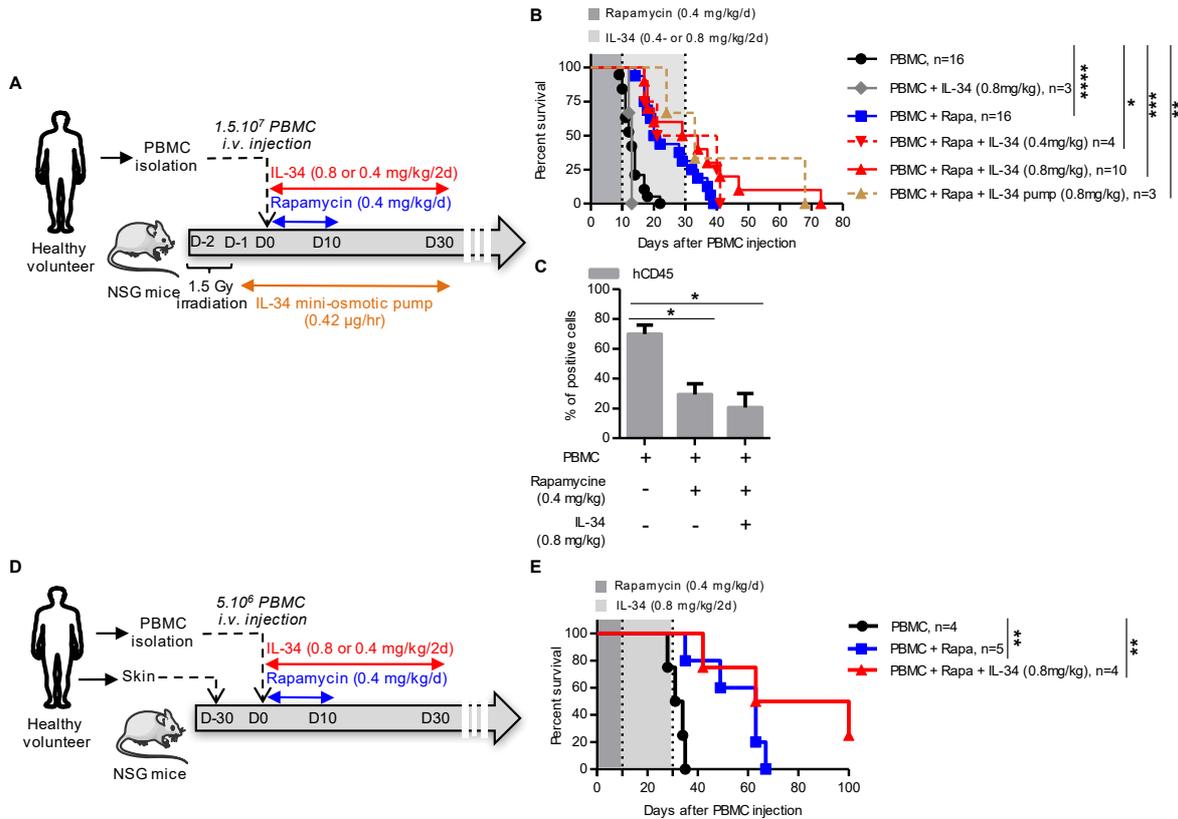
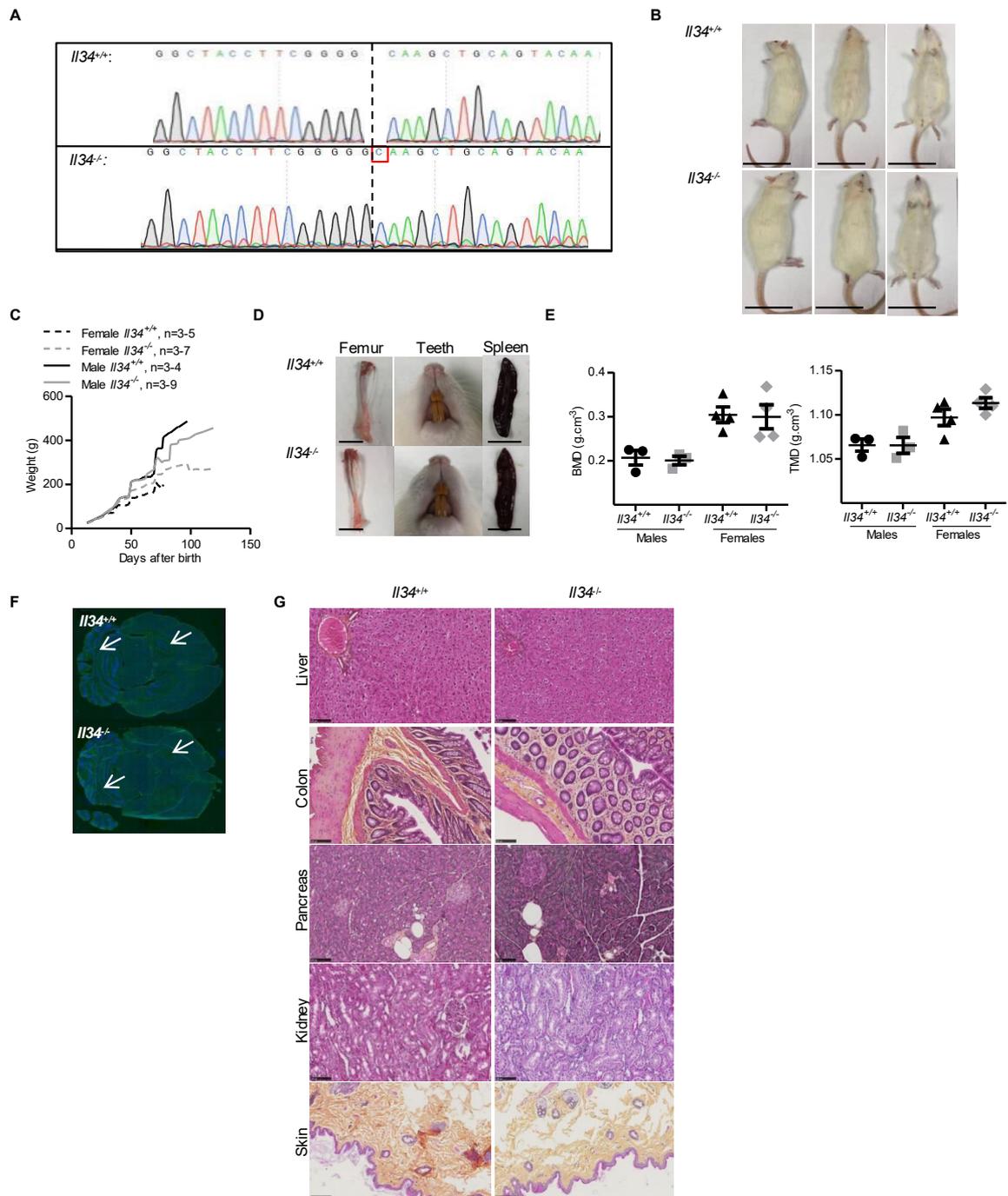
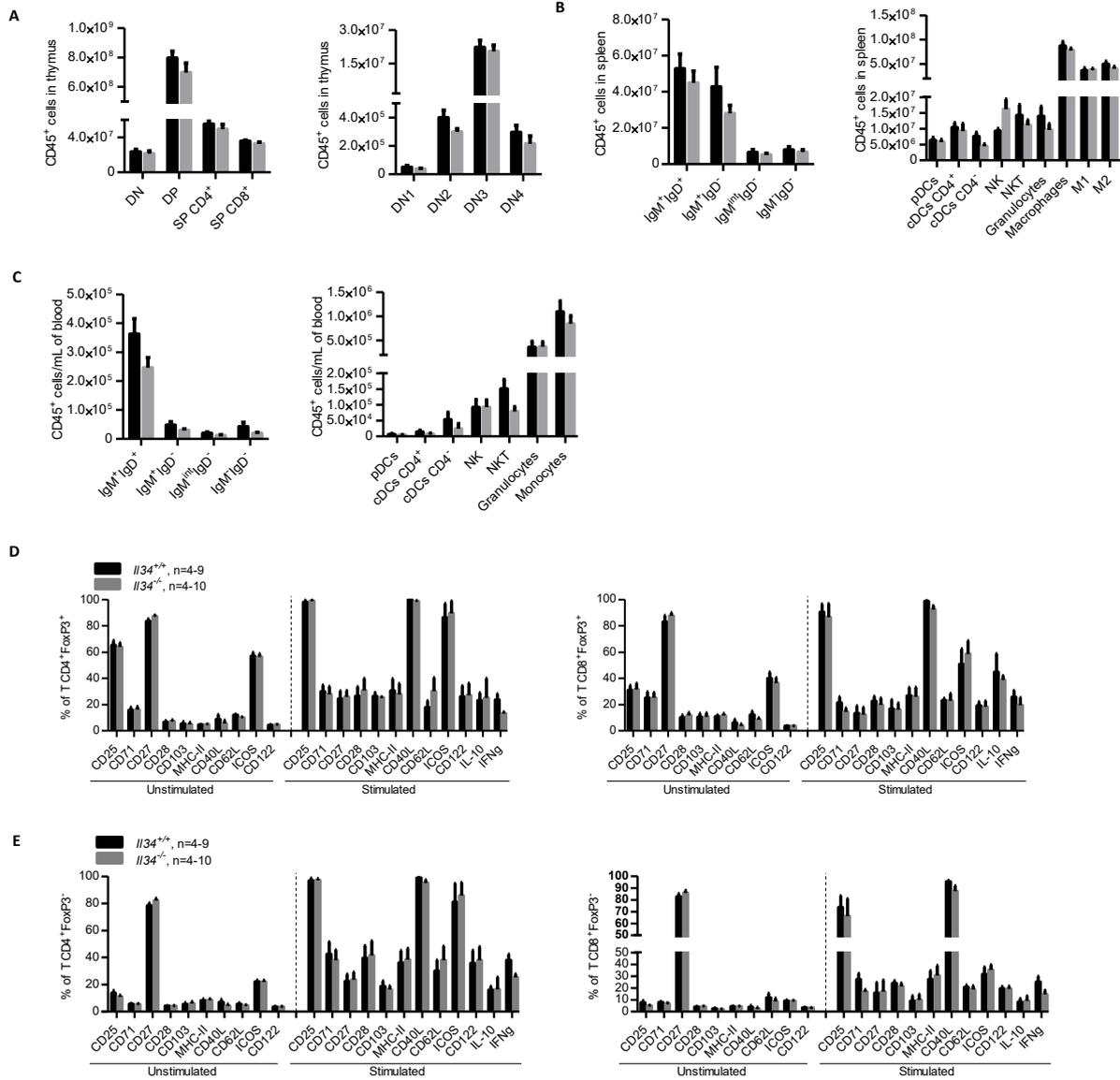


Figure 4. Human IL-34 recombinant protein administration efficiently delays GVHD development and allograft rejection in humanized NSG mice. The therapeutic potential of IL-34 was tested in (A-B) GVHD and (C-D) human skin allograft rejection models in humanized immunodeficient NSG mice. (A, C) IL-34 (0.4 mg/kg/2d or 0.8 mg/kg/2d for 30 days) and rapamycin (0.4 mg/kg/d for 10 days) were injected i.p or with a mini-osmotic pump delivering a constant rate for 28 days (based on a dose of 0.8mg/kg/2d). (A) For GVHD, $1.5 \cdot 10^7$ fresh PBMC were i.v injected in 1.5 Gy irradiated 8–12-week-old NOD/SCID/*IL2rg*^{-/-} (NSG) mice. (B) Survival of mice was measured by weight loss. (C) At day 15 post-PBMC injection, FACS analysis was performed looking at the human cells (hCD45) in the blood reflecting the engraftment (n=4-13). (D) For skin allograft rejection model, $5 \cdot 10^6$ fresh PBMC were i.v injected in mice grafted with human skin 4 weeks before. (E) Graft survival was scored on macroscopic signs of rejection from 0 to 5 and considered rejected at a score of 5. Log-rank test (B, E) and Mann Whitney *U* test (C), * $p > 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$.



Supplemental Figure 1. Generation and characterization of *Il34*^{-/-} rats. (A) Amplicons of *Il34*^{+/+} and *Il34*^{-/-} rats were sequenced showing the G insertion in deficient animals, leading to a shift in the ORF and an absence of protein expression. (B) Photographs represent the general appearance of the rats at 6 months old (scale bar, 10cm). (C) Littermates *Il34*^{+/+} rats (males, n=3-4 and females, n=3-5) and *Il34*^{-/-} rats (males, n=3-9 and females, n=3-7) have been weighed for 100 days. Results are expressed as mean ± SEM. (D) Representatives photographs show the bone aspect, teeth formation and spleen length (Scale bar, 1cm). (E) Femurs of 8 weeks old males (n=3) and females (n=4) *Il34*^{+/+} or *Il34*^{-/-} were fixed in 4% formol and then analyzed by μ CT for bone mineral density (BMD) and tissue mineral density (TMD). (F) Representatives photographs show the morphological aspect of *Il34*^{+/+} (top) and *Il34*^{-/-} (bottom) brains. White arrows indicate the zoom in of the hippocampus and cerebellum showed in Figure 1D. (G) Liver, colon, pancreas, kidney and skin sections of *Il34*^{+/+} and *Il34*^{-/-} rats at 6 months old were stained with HES. Original magnification $\times 20$, scale bar 100 μ m.

Freuchet et al. Suppl. Figure 2



Supplemental Figure 2. Immune cell population are not affected by IL-34-deficiency. (A) Absolute numbers of thymus cell subsets were analyzed in 8 weeks old *Il34*^{+/+} (n=7) and *Il34*^{-/-} (n=8) rats using markers described in *Supplemental Methods*. Absolute numbers of B, DCs, NK, NKT, granulocytes and monocytes/macrophages cell subsets were analyzed in spleen (B) and blood (C) of >10 months olds *Il34*^{+/+} (n=4-9) and *Il34*^{-/-} (n=4-10) rats. (D) TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁺FoxP3⁺ (CD4⁺ Tregs) and TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁻FoxP3⁺ (CD8⁺ Tregs) T cells and (E) TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁺FoxP3⁻ (CD4⁺ Teff) and TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁻FoxP3⁻ (CD8⁺ Teff) from total splenic cells from *Il34*^{+/+} (n=4-9) and *Il34*^{-/-} (n=4-10) rats were analyzed for expression of several markers upon a 3 days stimulation with anti-CD3 (1 ug/mL) and anti-CD28 (10 ug/mL) mAbs.

Supplemental Methods

Animals. Sprague-Dawley (SPD) rats were purchased from Charles River (L'Arbresle, France). The 8–12-week-old NOD/SCID/*Il2rg*^{-/-} (NSG) mice were bred in our own animal facilities in SPF conditions. *Il34*^{LacZ/LacZ} mice were kindly provided by Marco Colonna (Washington University, St. Louis, MO) (9). The animals were housed in a controlled environment (temperature 21 ± 1 °C, 12-hour light/dark cycle). *Il2rg*^{-/-} rats have been previously described (19).

Generation and genotyping of Il34^{-/-} *SPD* rats. rIL34-sgRNA4 (TGTACTGCAGCTTGCCCCGA) was designed and generated as previously described (20). Prepubescent females (4–5 weeks old) were injected with 25 IU pregnant mare serum gonadotropin (Intervet) and followed 48 hours later with 30 IU human chorionic gonadotropin (Intervet) before breeding (20). Fertilized one-cell stage embryos were collected for subsequent microinjection using a previously published procedure (20, 21). sgRNA (10ng/μl) and Cas9 mRNA (50ng/μl) (20) were co-microinjected into the cytoplasm and nucleus of one-cell-stage fertilized embryos. Surviving embryos were implanted in the oviduct of pseudo-pregnant females (0.5dpc) and allowed to develop until birth. For genotyping of animals' ear biopsy specimens from 8- to 10-d-old rat pups were digested in 250 μl of tissue digestion buffer (Tris-HCl 0.1 mol/l [pH 8.3], EDTA 5 mmol/l, SDS 0.2%, NaCl 0.2 mol/l, PK 100 μg/ml) at 56°C overnight. PCR amplification was performed on diluted lysis product (1:20 dilution) and 25 μl of PCR reaction mix according to the manufacturer instruction (Herculase II Fusion DNA Polymerase, Agilent Technologies, Les Ulis, France) using the following PCR primers: forward 5'-AGGTGGAGTACAGACACAGT-3' and reverse 5'-AGATAAGAGGTGGGAGTGAGC-3'. The following amplification program was used: 1 cycle at 95°C for 5 min, 1 cycle at 62°C for 2min, 35 cycles at 72°C for 30 s, 95°C for 10 s,

and 60°C for 10 s, followed by 1 cycle at 72°C for 3 min using a Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA). The PCR products were analyzed by heteroduplex mobility assay using microfluidic capillary electrophoresis system caliper LabChip GX (PerkinElmer, Villebon-sur-Yvette, France). The homozygous *Il34^{-/-}* specimen were identified from *Il34^{+/+}* littermate as previously described (22).

Bone density. Femurs of *Il34^{+/+}* and *Il34^{-/-}* rats were fixed 24h in PFA 4%, then trabecular bone mineral density (BMD) and cortical tissue mineral density (TMD) were analyzed using the high-resolution SkyScan-1076 X-ray microCT system (SkyScan, Kartuizersweg, Belgium).

ELISA. CSF-1 rat serum levels were quantified using a rat M-CSF ELISA kit (MyBioSource, San Diego, CA) according to manufacturer's instructions.

Luminex. Rat serum concentrations of TGFβ1, TGFβ2, TGFβ3, Eotaxin, MIP-2, MIP-1α, IL-13, IL-1β, IL-1α, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IP-10, IL-12p70, IL-17A, G-CSF, GM-CSF, TNFα, IFNγ, GROα, MCP-1, MCP-3 and RANTES were quantified using a multiplex kit (MILLIPLEX MAP; Merck, Burlington, MA and ProtocartaPlex; ThermoFischer, Waltham, MA) according to manufacturer's instructions.

Luciferase Immunoprecipitation Systems (LIPS). LIPS was used for the detection of autoantibodies against cytokines as previously described (23, 24).

qPCR. Total RNA was isolated from cells using TRIzol reagent (Invitrogen) or an RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). Total RNA was isolated from organs (spleen, liver

and brain) by crushing with Ultra-Turrax (IKA, Staufen, Germany) using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) and RNA was reverse transcribed with random primers and M-MLV reverse transcriptase (Life Technologies, Carlsbad, CA) according to manufacturer's instructions. For rat *Il34* qPCR, TaqMan (ThermoFischer, Waltham, MA) probes were used. The reaction was performed on the Applied Biosystems StepOne system (Life Technologies, Carlsbad, CA). Thermal conditions were as follows: 3 seconds at 95°C, 30 seconds at 60°C, and 15 seconds at -5°C of the melting temperature with a final melting curve stage. Calculations were made by the DDCT method. Primer sequences are listed in Supplemental Table A.

Histology and Immunofluorescence. Rats brains were fixed for 24h using PFA 4% and conserved by increasing sucrose concentrations and frozen. Sections were performed from paraffin-embedded tissues and frozen brain tissue. For histology analysis, slides were stained with Hematoxylin Eosin Saffron (HES) and analyzed by an automated tissue slide scanner (Hamamatsu NanoZoomer Digital Pathology system, Japan) and by confocal microscopy (Nikon A1 RSi, Tokyo, Japan). For brain immunofluorescence, slides were incubated with a purified anti-CD11b/c (a list of the clones and suppliers of all mAbs used in the study in Supplemental Table B) and the staining was revealed using a goat anti-mouse IgG (H+L)-AF488 (Invitrogen, Carlsbad, CA). After staining, slides were mounted with Prolong Gold Antifade Reagent with DAPI (Invitrogen, Carlsbad, CA) before analysis with confocal microscopy. The percentage of positive staining was analyzed using ImageJ software.

Cell isolation. Rats spleens was digested by collagenase D (Roche) for 30 min at 37°C; the reaction was stopped by adding 0.01 mM EDTA. Rats cells from thymus and lymph nodes were isolated by crushing with PBS. RBCs were lysed using a lysis solution (8.29 g NH₄Cl, 1

g KHCO_3 , 37.2 mg EDTA/1 l deionized water [pH 7.2–7.4]). $\text{TCR}\alpha\beta^-\text{SIRP}\alpha^+$, $\text{TCR}\alpha\beta^+\text{CD4}^+\text{CD25}^-$, $\text{TCR}\alpha\beta^+\text{CD4}^+\text{CD45RC}^{\text{high}}$, $\text{TCR}\alpha\beta^+\text{CD4}^-\text{CD45RC}^{\text{high}}$, $\text{TCR}\alpha\beta^+\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{CD127}^{\text{low}}$ and $\text{TCR}\alpha\beta^+\text{CD4}^-\text{CD45RC}^{\text{low/-}}$ cells were sorted using a FACS ARIA II (BD Biosciences, Mountain View, CA). Monoclonal antibodies are listed in Supplemental Table B.

Phenotypic analysis. Cellular phenotype was analyzed on spleen, thymus and blood using the antibodies listed in the Supplemental Table B. Cells were first gated on their morphology, exclusion of singlets and dead cells by staining with fixable viability dye, eF450 or eF506 (ThermoFischer, Waltham, MA), then cells were gated on the expression of CD45. Subsets were identified as follow: DN ($\text{CD4}^-\text{CD8}^-$), DN1 ($\text{CD4}^-\text{CD8}^-\text{CD25}^-\text{CD44}^+$), DN2 ($\text{CD4}^-\text{CD8}^-\text{CD25}^+\text{CD44}^+$), DN3 ($\text{CD4}^-\text{CD8}^-\text{CD25}^+\text{CD44}^-$), DN4 ($\text{CD4}^-\text{CD8}^-\text{CD25}^-\text{CD44}^-$), SP CD4^+ ($\text{CD4}^+\text{CD8}^-$), SP CD8^+ ($\text{CD4}^-\text{CD8}^+$), IgM and IgD expression were analyzed among $\text{CD45R}^+\text{CD45RA}^+$ cells, pDC ($\text{TCR}\alpha\beta^-\text{CD4}^+\text{CD45R}^+$), cDC ($\text{TCR}\alpha\beta^-\text{CD4}^{+/-}\text{CD103}^+$), NK ($\text{SIRPa}^-\text{TCR}\alpha\beta^-\text{CD161}^{++}$), NKT ($\text{SIRPa}^-\text{TCR}\alpha\beta^+\text{CD161}^+$), granulocytes ($\text{TCR}\alpha\beta^-\text{HIS48}^+\text{RP-1}^+$), macrophages/monocytes (CD68^+), M1 ($\text{CD68}^+\text{CD163}^-$) and M2 ($\text{CD68}^+\text{CD163}^+$). For stimulation, splenocytes were incubated with PMA (50 ng/ml) and ionomycin (1 $\mu\text{g/ml}$) for 4 h in the presence of Brefeldin A (10 $\mu\text{g/ml}$). Cells were permeabilized with Fix/Perm kit (ThermoFischer, Waltham, MA). Abs were used to stain cells, and fluorescence was measured with a BD FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences, Mountain View, CA), and FlowJo software was used to analyze data.

Mixed lymphocyte reaction. Sorted rat Teff $\text{TCR}\alpha\beta^+\text{CD4}^+\text{CD25}^-$, $\text{TCR}\alpha\beta^+\text{CD4}^-\text{CD45RC}^{\text{high}}$ and Tregs $\text{TCR}\alpha\beta^+\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{CD127}^{\text{low}}$ and $\text{TCR}\alpha\beta^+\text{CD4}^-\text{CD45RC}^{\text{low/-}}$ cells from $\text{Il34}^{+/-}$ and $\text{Il34}^{-/-}$ rats were plated in duplicate or triplicate with stimulating coated aCD3 (G4.18 at 1,

0.5 and 0.25 µg/mL) and soluble aCD28 (JJ319 at 10 µg/mL) in 100 µL or 200 µL complete RPMI-1640 medium in round- or V-bottomed 96-well plates, at 37°C and 5% CO₂. Proliferation of CFSE-labeled TCRαβ⁺CD4⁺CD25⁻, TCRαβ⁺CD4⁻CD45RC^{high}, TCRαβ⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{low}, TCRαβ⁺CD4⁻CD45RC^{low/-} T cells was analyzed by flow cytometry 2 or 3 days later by gating on TCRαβ⁺CD4⁺ cells among living cells (DAPI).

TNBS-induced colitis in rat. The rat model of colitis was induced by rectal administration of TNBS (75 mg/kg; Merck, Burlington, MA) as previously described (25). Rats were weighed daily for 6 days and sacrificed to measure the colon length.

Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). Eight-week-old *Il34*^{+/+} or *Il34*^{LacZ/LacZ} C57BL/6J female mice (9) were immunized by subcutaneous injection of 100 µL of an emulsion containing 200 µg of MOG_{p35-55} (GeneCust, Boynes, France) in complete Freund's adjuvant (Merck, Burlington, MA) supplemented with 400 µg heat-killed *M. tuberculosis* (Thermofischer, Waltham, MA). 200ng of *B. pertussis* toxin (Merck, Burlington, MA) in 100 µL of PBS was injected intraperitoneally on the same day and 2 days after immunization. Animals were monitored daily from day 5 and scored on a 5-point scale as follows: 0, no symptoms; 0.5, tip of tail is limp; 1, loss of total tail tonus; 1.5, loss of total tail tonus and hind leg inhibition; 2, loss of total tail tonus and weakness of hind legs; 2.5, loss of total tail tonus and dragging of hind legs; 3, loss of total tail tonus complete and paralysis of hind legs; 3.5, loss of total tail tonus and paralyzed hind legs are together on one side of the body; 4, loss of total tail tonus, hind leg and partial front leg paralysis; 4.5, loss of total tail tonus, hind leg and front leg paralysis, 5: mouse is found dead due to paralysis. Due to ethical considerations mice were sacrificed when they reached grade 4 for 24 h.

Wasting disease. *Il2rg*^{-/-} SPD rats aged of 6 weeks were injected via the tail vein with 2.5.10⁶ sorted Teff TCRαβ⁺CD4⁺CD45RC^{high} cells from *Il34*^{+/+} rats in association or not with sorted Tregs TCRαβ⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{low} or Tregs TCRαβ⁺CD4⁻CD45RC^{low/-} from *Il34*^{+/+} or *Il34*^{-/-} rats at a Teff:Tregs ratio of 3.5:1 and 2.1:1 respectively. A control with a PBS injection was also performed.

3' Differential Gene Expression (DGE) RNA-sequencing. Total mRNA from sorted Teff TCRαβ⁺CD4⁺CD25⁻, TCRαβ⁺CD4⁻CD45RC^{high} and Tregs TCRαβ⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{low}, TCRαβ⁺CD4⁻CD45RC^{low/-} T cells from *Il34*^{+/+} and *Il34*^{-/-} rats were extracted using RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) and protocol of 3' DGE RNA sequencing was performed as previously described (26). The differential expression p values were processed with DESeq2 (27).

Immune humanized mouse models. For xenogeneic graft-versus-host-disease (GVHD) model, 1.5x10⁷ fresh human PBMC were intravenously injected in 1.5 Gy irradiated NSG mice as previously described (4). Human PBMC engraftment was monitored in blood and GVHD development was evaluated by weight loss. Osmotic pumps (Alzet, model 1004, Cupertino, CA) were placed i.p on the day before the injection of the PBMC. Osmotic pumps were filled with rhIL-34 to continuously deliver a dose of 0.8 mg/kg/2d. For the skin rejection model, human skins were obtained from healthy donors from abdominoplasty surgery and transplantation was performed as previously described (4). 5.0x10⁶ PBMC allogeneic to the graft were i.v injected. A graft rejection score was established from 0 to 5 based on macroscopic observations: 1: the skin starts to peel off; 2: thick skin; 3: scab; 4: edges start to take off; 5: the skin is entirely gone. Human IL-34 recombinant protein (0.4- or 0.8 mg/kg/2d

for 30 days; Thermofischer, Waltham, MA or Preprotech, Neuilly-Sur-Seine, France) and/or rapamycin (0.4 mg/kg/d for 10 days, Rapamune, Pfizer) were injected intraperitoneally.

Statistics. Mann-Whitney U test was used for qPCR, FACS, positive area in immunohistofluorescence and ELISA analysis. Mantel Cox Log Rank test was used to analyze survival curves. Adapted controls were performed together with the test conditions. Animal numbers were determined with ethical committee agreement.

Supplemental Table A. Primer sequence

Gene	Primer	Sequence
<i>Il34</i>	Probe	Rn01432380_m1

Supplemental Table B. Antibodies used in this study

Marker	Clone	Provider
hCD45	HI30	BD Biosciences
TCR $\alpha\beta$	R7/3	BD Biosciences
CD4	OX35	BD Biosciences
CD45RC	OX22	Intern production
CD25	OX39	Intern production
CD127	715519	Biotechne
CD45RA	OX33	BD Biosciences
CD45R	His24	BD Biosciences
rCD45	OX1 + OX30	BD Biosciences
SIRP α	OX41	Intern production
CD161	3.2.3	Intern production
CD11b/c	OX42	Intern production
CD103	OX62	Intern production
Granulocytes	RP-1	BD Biosciences
Granulocytes	HIS48	BD Biosciences
IgM	MARM-4	Intern production
IgD	MARD-3	Intern production
CD8	OX8	Intern production
CD44	OX49	BD Biosciences
CD163	ED2	Bio-Rad
MHC-II	OX6	Intern production
FoxP3	FJK16S	eBiosciences

CD68	ED1	Bio-Rad
CD71	OX26	Intern production
CD27	LG.3A10	Intern production
CD28	JJ319	Intern production
CD40L	AH.F5	Biogen
CD62L	OX85	Intern production
ICOS	JTT.1	Intern production
CD122	L316	Intern production
IL-10	A5-4	BD Biosciences
IFN γ	DB-1	BD Biosciences
CD3	G4.18	BD Biosciences

Résultats complémentaires – Partie I

Les résultats complémentaires présentés ci-après comprennent des analyses sur la caractérisation de la lignée de rats *Il34^{-/-}* ainsi que l'analyse des fonctions *in vivo* des Teff CD4⁺ et Teff CD8⁺ de ces animaux.

MATERIEL ET METHODES

qPCR

L'ARNm total a été isolé à partir de la rate, du foie et du cerveau par broyage avec l'Ultra-Turrax (IKA) en utilisant du TRIzol (Invitrogen). L'ARN a été rétro-transcrit avec des amorces aléatoires et la transcriptase inverse M-MLV (Life technologies) selon les instructions du fournisseur. Les qPCR ont été réalisées en utilisant la technologie Fast SYBR Green dans 20 µL de volume final contenant 10 µL de Master Mix 2X (Life technologies), 0,6 µL d'amorces (10 µM), 1 µL d'ADNc et 8,4 µL d'eau. La réaction a été effectuée sur le système Applied Biosystems StepOne (Life technologies). Les conditions de température ont été les suivantes : 3 sec à 95°C, 30 sec à 60°C et 15 sec à 5°C de moins de la température de fusion. Les calculs ont été réalisés selon la méthode du DDCT. Les amorces utilisées sont listées dans le **tableau VI**.

Tableau VI: Liste des amorces utilisées.

Gène	Amorce	Séquence
<i>Arg1</i>	Forward	CCAACCTCTTGGGAAGACACCA
	Reverse	GTGATGCCCCAGATGACTTT
<i>Nos</i>	Forward	GACCAAACCTGTGTGCCTGGA
	Reverse	TACTCTGAGGGCTGACACAAGG
<i>Hmox1</i>	Forward	CCACAGCTCGACAGCATGTC
	Reverse	GTTTCGCTCTATCTCCTCTTCCA
<i>Ifng</i>	Forward	AGTGTGCATCGAATCGCACCTG
	Reverse	TTCTGGTGACAGCTGGTGAAT
<i>Il6</i>	Forward	GCAAGAGACTTCCAGCCAGTT
	Reverse	CATCATCGCTGTTCATACAATCA
<i>Tnfa</i>	Forward	CTTATCTACTCCCAGGTTCTTTCAA
	Reverse	GAGACTCCTCCCAGGTACATGG
<i>Tgfb</i>	Forward	CTCAACACCTGCACAGCTCC
	Reverse	ACGATCATGTTGGACAACTGCT
<i>Ido</i>	Forward	GCTGCCTCCCATTCTGTCTT
	Reverse	TGCGATTTCCACCATTAGAGAG
<i>Il10</i>	Forward	TGCTATGTTGCCTGCTTACTG
	Reverse	TCAAATGCTCCTTGATTTCTGG

Isolement des cellules du colon et de l'iléon (Collaboration Dr. A. Abidi et Pr. R. Josien, Nantes).

L'iléon (sans les plaques de Peyer) et le colon ont été lavés avec du PBS froid en boîte de Pétri après élimination du tissu adipeux. Les tissus ont été ouverts longitudinalement et coupés en morceaux de 0.5 cm, puis incubés une fois dans 10 mL d'une solution contenant 1.5 mM de DTT, 30 mM d'EDTA dans du PBS et deux fois dans la même solution sans DTT pendant 10 min à 37°C sous une agitation de 100 rpm afin d'éliminer les cellules épithéliales. Les tissus restants ont été digérés deux fois dans une solution de collagénase D (2 mg/mL) et de la DNaseI (100 µg/mL) pendant 30 min à 37°C sous une agitation de 100 rpm avant d'être filtrés à l'aide de tamis cellulaire de 100 µm puis de 40 µm.

Isolement des cellules de la rate

Les rates ont été digérées avec de la collagénase D (Roche) pendant 30 min à 37°C, puis la réaction a été stoppée en ajoutant de l'EDTA 0,01mM. Les globules rouges ont été lysés en utilisant une solution hypotonique (8.29 g NH₄Cl, 1 g KHCO₃, 37.2 mg EDTA [pH 7.2–7.4]).

Les cellules TCRαβ⁺CD4⁺CD25⁻, TCRαβ⁺CD4⁺CD45R^{high}, TCRαβ⁺CD4⁻CD45R^{high} ont été triées en utilisant le FACS ARIA II (BD, Biosciences, Mountain View, CA, USA). Les anticorps utilisés sont listés dans le **tableau VI**.

Analyse phénotypique des cellules du colon et de l'iléon

Les anticorps utilisés sont listés dans le **tableau VII**. Les cellules ont d'abord été analysées selon leur morphologie, les doublets ont été exclus ainsi que cellules mortes grâce au marqueur de viabilité eF506 (eBiosciences). Les différentes sous-populations ont été analysées parmi les cellules CD45⁺ : les cellules mononucléées phagocytaires (MNP) (CD45R⁻MHC-II⁺CD103⁻) et les cellules dendritiques (CD45R⁻MHC-II⁺CD103⁺) (**Figure 20**). La fluorescence a été mesurée grâce au cytomètre BD FACSCanto II (BD Biosciences, Mountain View, CA, USA) et le logiciel FlowJo a été utilisé pour analyser les résultats.

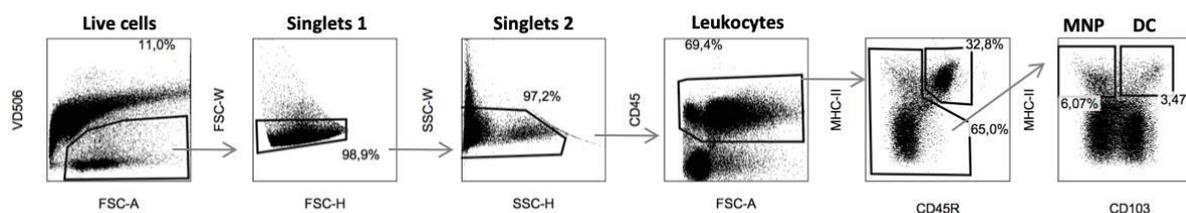


Figure 20: Stratégie d'analyse des MNP et des cellules dendritiques du colon et l'iléon. MNP: cellules phagocytaires mononucléées; DC: cellules dendritiques.

Tableau VII: Liste des anticorps utilisés.

Marqueur	Clone	Fournisseur
TCR $\alpha\beta$	R7/3	BD Biosciences
CD4	OX35	BD Biosciences
CD45RC	OX22	Production interne
CD25	OX39	Production interne
CD45R	His24	BD Biosciences
CD45	OX1 + OX30	BD Biosciences
CD103	OX62	Production interne
MHC-II	OX6	Production interne

Wasting disease

Les rats Sprague Dawley *Il2r γ ^{-/-}* âgés de 6 semaines ont reçu les injections dans la veine caudale de $2,5 \cdot 10^6$ de cellules triées TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁺CD45RC^{high} (Teff CD4⁺) ou TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁻CD45RC^{high} (Teff CD8⁺) provenant de rats *Il34^{+/+}* ou *Il34^{-/-}*. Du PBS a été injecté dans les rats contrôles. Le poids a été suivi quotidiennement reflétant le développement de la pathologie. Les rats ont été sacrifiés lorsqu'ils ont atteint les points limites (soit 20% de perte de poids) listés dans le dossier APAFIS #12377 validé par le ministère de la recherche.

3' DGE RNA-sequencing

L'ARNm total des cellules triées TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁺CD25⁻ et TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁻CD45RC^{high} des rats *Il34^{+/+}* et *Il34^{-/-}* a été extrait en utilisant le kit RNeasy Mini kit (Quiagen) et le protocole de séquençage 3' digital gene expression (DGE) RNA sequencing a été réalisé comme précédemment décrit (Picarda et al., 2017). Les p values d'expression différentielle ont été traitées avec DESeq2 (Love et al., 2014).

Statistiques

Le test du log-rank (Mantel Cox) a été utilisé pour analyser la survie et les contrôles ont été réalisés en même temps que les conditions tests. De plus, le nombre d'animaux a été déterminé en accord avec le comité d'éthique.

RESULTATS

Analyse des gènes pro- et anti-inflammatoires dans la rate, le foie et le cerveau ainsi que dans les cellules myéloïdes de l'iléon et du colon.

Afin d'approfondir les connaissances sur l'impact de la déficience en IL-34 sur l'état pro- ou anti-inflammatoire des animaux, nous avons étudié l'expression de gènes associés à des fonctions anti- (*Arg1*, *Hmox1*, *Tgfb*, *Il10*, *Ido*, *Ifng*) ou pro-inflammatoires (*Nos*, *Tnfa*, *Ifng*, *Il6*) par qPCR sur l'ARNm total de la rate, du foie et du cerveau (**Figure 21A**). De manière générale, l'expression des gènes est similaire entre les rats *Il34^{+/+}* et *Il34^{-/-}* dans la rate, le foie et le cerveau pour *Arg1*, *Hmox1*, *Il10*, *Tnfa*, *Ifng* et *Il6*. Cependant, dans la rate le *Tgfb* est surexprimé chez les rats déficients et l'*Ido* semble diminué ($p=0,0813$). De plus, dans le foie, *Nos*, un marqueur associé aux macrophages pro-inflammatoires est augmenté chez les rats *Il34^{-/-}*. Enfin, dans le cerveau l'*Il6* semble diminuée chez les rats déficients ($p=0,0625$). Ces résultats montrent qu'à l'homéostasie, la déficience en *Il34* impacte légèrement l'environnement.

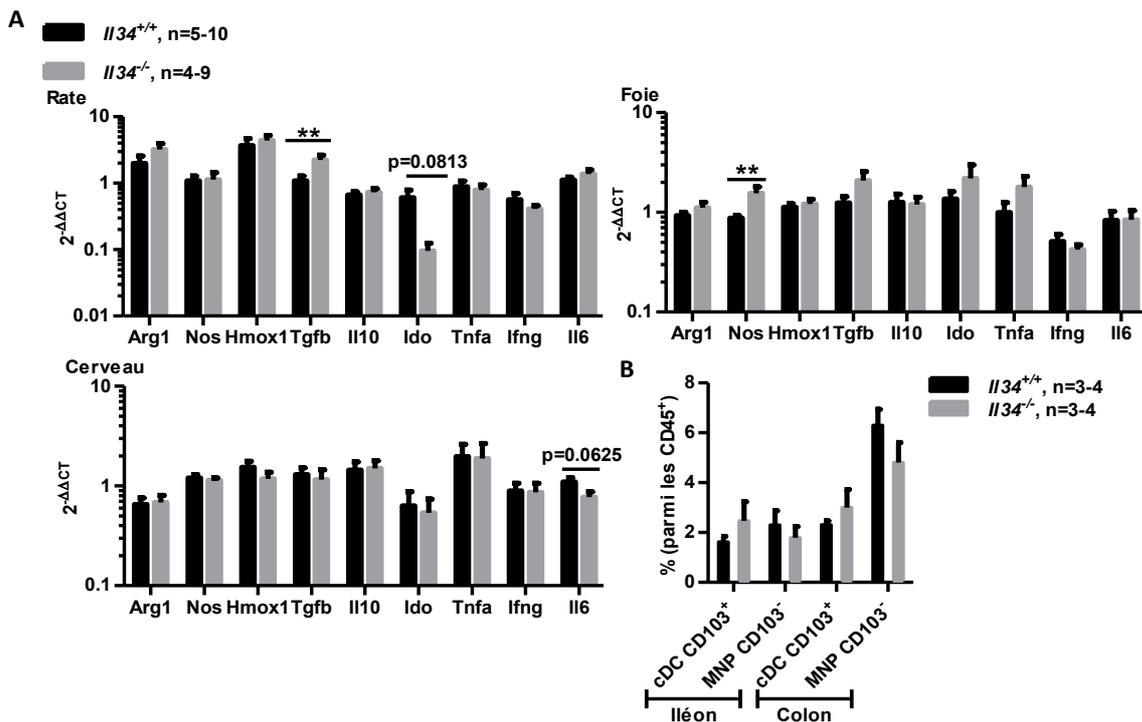


Figure 21 : La déficience en *Il34* impacte légèrement l'environnement de la rate et du foie ainsi que les MNP de l'iléon et du colon. (A) L'expression des gènes a été analysée par qPCR sur l'ARNm issu de la rate, du foie et du cerveau des rats *Il34^{+/+}* (n=5-10) et *Il34^{-/-}* (n=4-9). Les résultats ont été normalisés par rapport à l'*HPRT* et exprimés selon le $2^{-\Delta\Delta CT} \pm SEM$. Test non paramétrique Mann Whitney *U* test, ** $P < 0,01$. **(B)** Les proportions de cellules dendritiques conventionnelles et des phagocytes mononucléés (MNP) ont été analysées dans l'iléon et le colon de rats *Il34^{+/+}* et *Il34^{-/-}* âgés de plus de 6 mois en utilisant les marqueurs décrits dans la partie matériel et méthodes. Les résultats sont représentés selon la moyenne $\pm SEM$.

La majorité des macrophages résidents sont générés lors du développement embryonnaire et peuvent être remplacés après la naissance par les monocytes circulants (Hume et al., 2019). L'IL-34 est impliquée dans le développement de la microglie et des cellules de Langerhans lors du développement embryonnaire ainsi que dans leur homéostasie (Greter et al., 2012; Wang et al., 2012a). Ainsi, nous avons étudié le rôle de l'IL-34 dans le développement des cellules mononuclées phagocytaires (MNP) et des cellules dendritiques de la lamina propria de l'iléon et du colon (**Figure 21B**). De manière intéressante, dans le colon et l'iléon la proportion de MNP semblent diminuée chez les rats *Il34^{-/-}* suggérant une implication de l'IL-34 dans leur génération et/ou homéostasie. La proportion de cellules dendritiques est plus faiblement impactée avec une légère augmentation chez les animaux déficients. Ces résultats sont à confirmer en augmentant le nombre d'animaux.

Analyse de la fonction des Teff CD4⁺ et Teff CD8⁺ des rats *Il34^{+/+}* vs *Il34^{-/-}* dans un modèle de wasting disease.

Nous avons précédemment mis en évidence qu'*in vitro* la prolifération des Teff CD8⁺CD45RC^{high} des animaux *Il34^{-/-}* est plus rapide. Dans l'objectif d'analyser les fonctions *in vivo* des Teff CD4⁺ et Teff CD8⁺, nous avons utilisé le modèle de wasting disease afin d'étudier leur potentiel d'induction de la maladie (**Figure 22**). De manière intéressante, nous observons une différence statistique entre l'injection des Teff CD4⁺ des rats *Il34^{-/-}* qui induisent la pathologie dans seulement 1 animal sur les 6 soit 16,7% des cas, et l'injection des Teff CD4⁺ des animaux *Il34^{+/+}* qui induisent la pathologie dans 91,7% des animaux (11/12 rats). Les Teff CD8⁺ issus d'animaux *Il34^{+/+}* et *Il34^{-/-}* induisent la pathologie de façon similaire. Bien que les Teff CD4⁺ n'expriment pas l'IL-34, ces résultats suggèrent que l'IL-34 joue un rôle important dans leur éducation lors du développement.

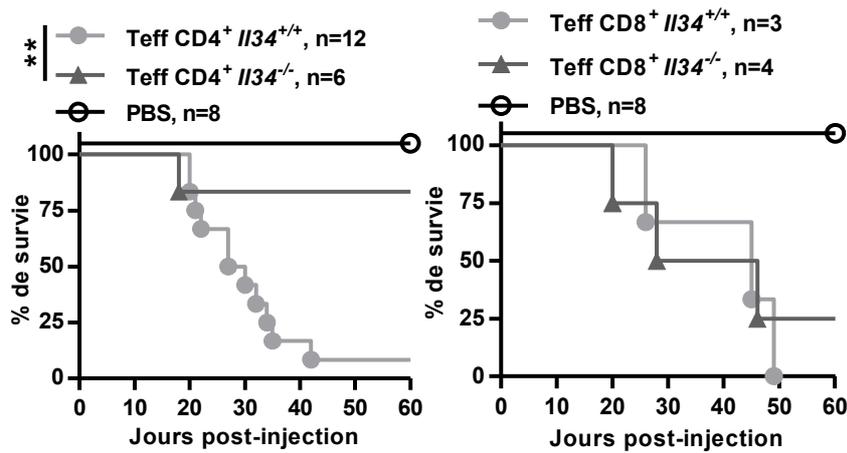


Figure 22: Les Teff CD4⁺ des rats *I134*^{-/-} ne permettent pas d'induire la wasting disease. Les rats *I12r*^{-/-} âgés de 6 semaines ont reçu une injection en i.v de Teff TCRαβ⁺CD4⁺CD45RC^{high} (Teff CD4⁺) ou de Teff TCRαβ⁺CD4⁺CD45RC^{high} (Teff CD8⁺) des animaux *I134*^{+/+} ou *I134*^{-/-}. Test du log-rank, ** *P*<0,01.

Afin d'analyser l'impact de la déficience en *I134* sur les Teff, nous avons réalisé une analyse du transcriptome par DGE RNA-sequencing des Teff CD4⁺CD25⁻ et Teff CD8⁺CD45RC^{high} des rats *I134*^{+/+} vs *I134*^{-/-} (**Figure 23**). De manière intéressante, 3 gènes sont statistiquement différentiellement exprimés et diminués par les Teff CD4⁺ des rats *I134*^{-/-}: *Junb*, *Srsf5* et *Zfp36*. Les Teff CD8⁺ des animaux déficients en *I134* ne présentent aucune différence statistique d'expression des gènes.

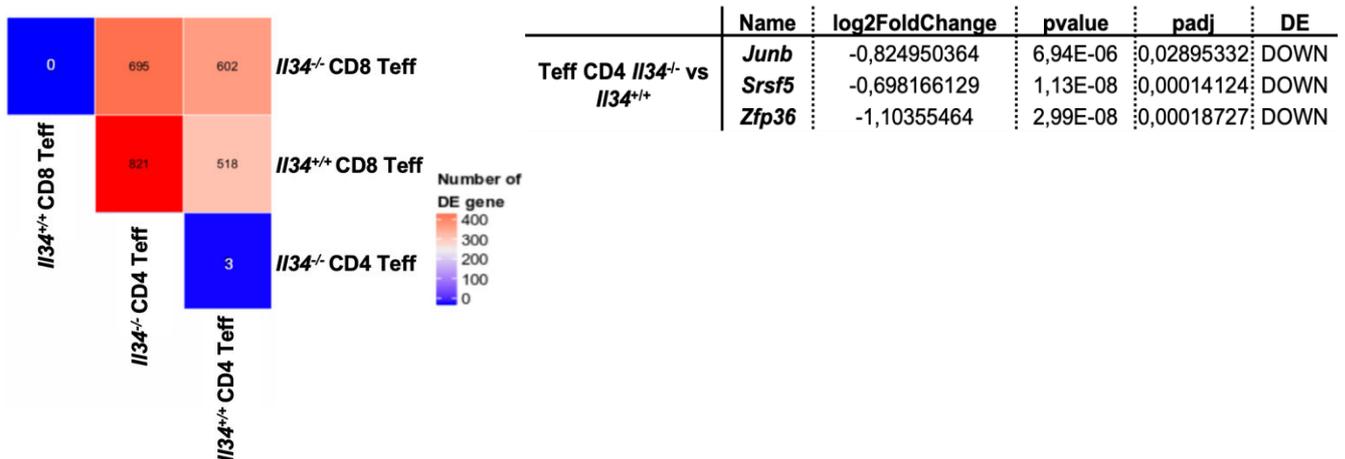


Figure 23 : Les Teff CD4⁺ des animaux *I134*^{-/-} présentent une diminution de l'expression des gènes *Junb*, *Srsf5* et *Zfp36*. Une analyse 3' DGE-RNA sequencing a été réalisée sur les Teff TCRαβ⁺CD4⁺CD25⁻ (Teff CD4⁺) et les Teff TCRαβ⁺CD4⁺CD45RC^{high} (Teff CD8⁺) triées de rats *I134*^{+/+} (n=6) et *I134*^{-/-} rats (n=4-6). Le tableau récapitule les 3 gènes différentiellement exprimés entre les Teff CD4⁺ *I134*^{+/+} et *I134*^{-/-}.

DISCUSSION ET CONCLUSION

La déficience en *Il34* chez les rats et souris n'induit pas de phénotype sévère. Dans ces modèles les populations myéloïdes ne sont pas fortement impactées (Wang et al., 2012a). Ces résultats peuvent s'expliquer par la compensation de CSF-1 dans les fonctions que ces deux cytokines partagent. Nous avons montré que l'expression de gènes pro- et anti-inflammatoire dans la rate, le foie et le cerveau est très similaire entre les animaux *Il34^{+/+}* et *Il34^{-/-}* démontrant le faible impact de la déficience sur le statut immun des animaux. Il serait intéressant d'analyser l'expression de *Csf1* dans ces organes afin d'établir la contribution majoritaire de l'une de ces deux cytokines. En effet, le *Tgfb* est surexprimé chez les animaux déficients, et cette cytokine permet d'induire l'expression de CSF-1 (Rosenfeld, 1994) générant une boucle de rétroaction positive. La surexpression de *Nos* dans le foie, un marqueur des macrophages de type 1 (pro-inflammatoires) suggère un léger déséquilibre vers un environnement pro-inflammatoire. Il serait ainsi intéressant d'étudier le phénotype des cellules de Kupffer. Dans cet objectif, nous avons étudié les MNP de la lamina propria de l'iléon et du colon et démontré une légère diminution de ces cellules chez les rats *Il34^{-/-}* suggérant l'implication de l'IL-34 dans leur génération, comme il est décrit pour la microglie et les cellules de Langerhans (Greter et al., 2012; Wang et al., 2012a). Ces résultats sont à confirmer en augmentant le nombre d'animaux afin de réaliser des analyses statistiques fiables.

L'IL-34 est impliquée dans le développement des lymphocytes T effecteurs bien que ces cellules n'expriment ni cette cytokine ni ses récepteurs. Ainsi en utilisant le modèle de « wasting disease » nous avons montré que les Teff CD4⁺CD45RC^{high} des rats *Il34^{-/-}* n'induisent pas la pathologie à l'inverse des cellules issues d'animaux *Il34^{+/+}*. Ces résultats suggèrent un impact de la déficience lors de leur développement et/ou une modification intrinsèque de ces cellules. Afin d'élucider cet effet, il serait intéressant d'analyser leur répertoire TCR et de les comparer aux cellules *Il34^{+/+}* dans le but de déterminer si ce changement survient lors de la sélection thymique. En effet, ces cellules pourraient avoir un répertoire TCR différent les empêchant d'être activées chez les rats receveurs *Il2r γ ^{-/-}* et donc d'induire la « wasting disease ». L'incapacité de ces cellules à induire la pathologie peut aussi être due à un défaut de migration ou bien que ces cellules ne survivent pas au transfert, pour cela analyser leur transcriptome à l'état d'activation pourrait nous permettre d'améliorer la compréhension et de déterminer des pistes de recherche.

L'analyse transcriptomique des Teff CD4⁺CD25⁻ et Teff CD8⁺CD45RC^{high} à l'état basal entre les rats *Il34*^{-/-} et *Il34*^{+/+} a révélé seulement des différences pour les Teff CD4⁺ avec 3 gènes (*Junb*, *Srsf5* et *Zfp36*) diminués chez les rats déficients. *Junb* est fortement induit après une stimulation du TCR et est impliqué dans la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ en Th2 et Th17 alors que sa délétion promeut la génération de Th1 et d'iTregs (Carr et al., 2017). *Zfp36* est aussi induit après la stimulation du TCR et joue un rôle négatif sur l'activation et les fonctions effectrices des lymphocytes T en inhibant l'expression de TNF α , d'IFN γ , d'IL-2, d'IL-17 et de Bcl2 (Moore et al., 2018). *Srsf5* est un régulateur de l'épissage alternatif participant à la progression tumorale via l'augmentation de l'expression de VEGF (Liu and Cheng, 2013) mais aucune étude ne mentionne son implication dans la biologie des lymphocytes T. Le croisement des données transcriptomiques obtenues à partir des monocytes/macrophages des rats *Il34*^{-/-} avec l'analyse des lymphocytes T pourrait permettre de mieux comprendre le rôle de l'IL-34 dans la génération et la différenciation des lymphocytes T. Ces résultats suggèrent que l'IL-34 ne joue pas un rôle crucial à l'homéostasie et n'impacte pas la santé de l'animal. Par ailleurs, chez l'Homme aucune déficience génétique de l'*IL34* n'a été décrite jusqu'à maintenant.

Partie II - Etude du potentiel de l'IL-34 comme marqueur prédictif en transplantation.

En transplantation, le développement des traitements immunosuppresseurs a permis de considérablement améliorer la survie à long terme du greffon ainsi que la qualité de vie des patients. Cependant ils ne permettent pas d'inhiber le rejet chronique et comportent de nombreux effets secondaires augmentant la susceptibilité de développer des cancers et des infections (Nankivell et al., 2003). La recherche de marqueur(s) de prédiction post-transplantation de rejet ou de survie du greffon permettant de suivre l'évolution du statut immun des patients et ainsi adapter les traitements immunosuppresseurs représente un des enjeux en transplantation (Salvadori and Tsalouchos, 2017).

Différentes études ont mis en évidence que l'expression de l'IL-34 était augmentée et corrélait avec le développement de maladies inflammatoires mais aussi dans les cancers (Guillonnet et al., 2017a; Baghdadi et al., 2018b). En transplantation rénale Baek *et al.* ont indiqué que le taux sérique d'IL-34 était plus élevé chez les patients présentant un rejet par rapport aux patients stables et volontaires sains. De plus, dans cette étude, l'IL-34 participe au développement des lésions rénales via la destruction des cellules épithéliales tubulaires (Baek et al., 2015). Cependant notre équipe a récemment montré que l'IL-34 était exprimée par les Tregs CD4⁺FoxP3⁺ et Tregs CD8⁺FoxP3⁺ humaines et de rat (Bézie et al., 2015a; Guillonnet et al., 2007a), et permettait d'induire la tolérance dans un modèle d'allogreffe cardiaque en association à une dose sous-optimale de rapamycine et d'inhiber le rejet aigu de foie chez le rat via la génération de macrophages de type 2 et de Tregs (Bézie et al., 2015a). Une autre équipe a aussi décrit cet effet tolérogène dans un modèle de transplantation hépatique (Zhao et al., 2018a). Chez l'Homme, l'expression de l'IL-34 par les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} est impliquée et corrèle avec leurs fonctions suppressives (Bézie et al., 2018a). Chez la souris humanisée, nous avons mis en évidence que l'administration d'IL-34 en association à une dose sous-optimale de rapamycine permet de retarder le développement de la GVHD et du rejet d'allogreffe de peau, démontrant un rôle régulateur de l'IL-34.

Afin d'éclaircir l'implication pro- ou anti-inflammatoire de l'IL-34 en transplantation nous avons étudié son potentiel comme marqueur prédictif de rejet du greffon. Pour cela, nous avons étudié la corrélation entre le taux sérique d'IL-34 et le rejet du greffon dans une

cohorte de patients transplantés rénaux. Puis dans une cohorte de patients greffés avec du sang placentaire développant ou non une GVHD, nous avons analysé l'expression d'IL-34 par les Tregs CD4⁺ et Tregs CD8⁺ à 3 mois post-greffe.

MATERIEL ET METHODES

Cohorte DIVAT des patients transplantés rénaux. Les 306 échantillons de sérum des patients transplantés rénaux ou rein-pancréas proviennent de la biocollection DIVAT (www.divat.fr) et sont stockés au centre de ressources biologiques du centre hospitalier universitaire de Nantes. Les donneurs ont été informés de l'utilisation de leur sérum et ont signé un consentement. Les prélèvements ont été réalisés entre 2004 et 2012, les caractéristiques cliniques sont indiquées dans le **tableau VIII** pour la quantification de l'IL-34 dans le **tableau IX** pour la quantification du CSF-1.

Cohorte de patients greffés avec des cellules CD34⁺ de sang placentaire. Les 32 ampoules de PBMC proviennent du protocole AP-HP MINICORD fourni par le Dr. Sébastien MAURY (Hôpitaux Universitaires Henri-Mondor, Paris) dont les caractéristiques cliniques ont été décrites précédemment (Rio et al., 2015). Les patients ayant une leucémie aiguë myéloïde ont été prélevés 3 mois après leur greffe de sang placentaire.

Volontaires sains. Le sang de 30 volontaires sains a été obtenu auprès de l'établissement français du sang (Nantes, France). Des consentements écrits ont été fournis conformément aux directives de l'établissement. Le sérum a été isolé par centrifugation à 1200 g pendant 15 min puis directement congelé à -80°C.

IL-34	HV	Patients ayant rejeté		Patients stables	
		Pré-Tx	Post-Tx	Pré-Tx	Post-Tx
n	30	71	42	102	91
Age (a)	43,1±15,8	46,3±13,7	52±14,3	48,6±13,2	51,5±13,4
% de femmes	30%	46,7%	26,8%	35,2%	19,8%
CNI		100 % (42/42)		100% (91/91)	
Tacrolimus		97,6% (41/42)		97,8% (89/91)	

Tableau VIII: Résumé des caractéristiques démographiques et cliniques des patients transplantés rénaux pour la quantification de l'IL-34. HV : healthy volunteer (volontaire sains) ; CNI : calcineurin inhibitors.

CSF-1	HV	Patients ayant rejeté		Patients stables	
		Pré-Tx	Post-Tx	Pré-Tx	Post-Tx
n	17	15	14	14	15
Age (a)	40,7±16,9	46,3±12,9	47,8±11,9	42±11,5	42,6±13,1
% de femmes	29,4%	60,0%	42,9%	28,6%	33,3%

Tableau IX: Résumé des caractéristiques démographiques et cliniques des patients transplantés rénaux pour la quantification de CSF-1. HV : healthy volunteer (volontaire sains) ; CNI : calcineurin inhibitors.

ELISA

Les taux sériques d'IL-34 et de CSF-1 ont été quantifiés grâce aux kits « Human IL-34 DuoSet ELISA » et « Human M-CSF Quantikine ELISA Kit » (R&D Systems), conformément aux instructions du fournisseur. Le sérum a été dilué au 1/2 et chacune des mesures réalisées en duplicata.

Tests statistiques

Un test Mann Whitney U a été utilisé pour comparer l'expression d'IL-34 et de CSF-1 sérique entre les différents groupes de patients.

Les patients greffés avec du sang placentaire ont été divisés en 2 groupes selon la médiane d'expression de l'IL-34 parmi les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-}. Un test log-rank (Mantel Cox) a été utilisé pour analyser la survie des patients greffés avec du sang placentaire en fonction de la proportion de cellules IL-34⁺.

RESULTATS

La faible détection de l'IL-34 sérique ne permet pas de discriminer les patients ayant présenté un rejet et les patients stables rénaux, à l'inverse du CSF-1 sérique.

Afin de déterminer l'implication de l'IL-34 en transplantation rénale, nous avons quantifié les taux sériques d'IL-34 chez des volontaires sains ainsi que dans une cohorte de patients transplantés rénaux avant (pré-Tx) et après transplantation (Post-Tx) pour lesquels le devenir du patient est connu (patients stables dans les 12 mois post-Tx et patients ayant présenté un rejet dans les 12 mois post-Tx). Le prélèvement a été réalisé à 3 mois, 6 mois ou 12 mois. Les caractéristiques démographiques et cliniques des patients sont indiquées dans le **tableau VIII**. Tout d'abord, la détection de l'IL-34 dans le sérum est très faible puisque seulement 4 des 30 volontaires sains sont positifs (13,3%) avec une concentration moyenne de 85,8 pg/mL. De manière similaire dans la cohorte de patients, seulement 19,7% (14/71) et

23,8% (10/42) des échantillons avant et après transplantation respectivement sont positifs chez les patients ayant rejeté dans les 12 mois. 10,8% (11/102) et 9,8% (9/91) des échantillons avant et après transplantation respectivement, présentent un taux d'IL-34 détectable chez les patients stables. Avant transplantation, les taux d'IL-34 (76 pg/mL et 391,4 pg/mL pour les patients ayant rejeté et stables respectivement) ne sont pas différents des volontaires sains. Dans les 12 mois suivant la transplantation, le taux sérique d'IL-34 est significativement diminué chez les patients stables (14,3 pg/mL) par rapport aux patients ayant fait un rejet (70,8 pg/mL). Cependant, ces taux ne sont pas significativement différents de ceux des volontaires sains (**Figure 24A**).

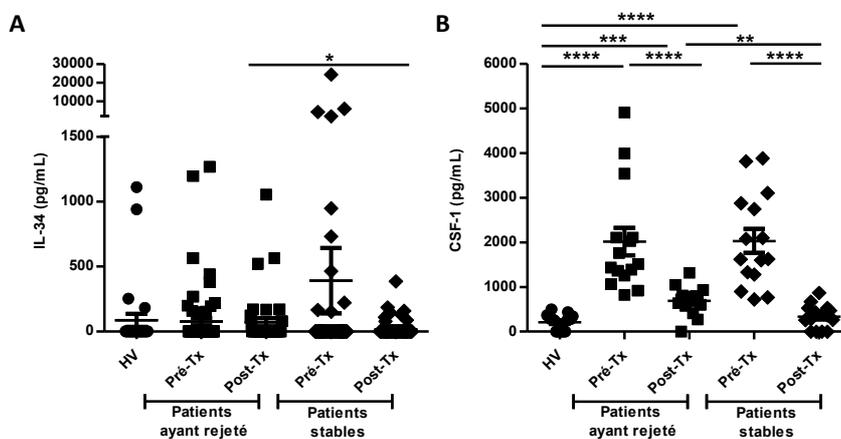


Figure 24: Le taux sérique de CSF-1, à l'inverse de l'IL-34 permet de discriminer les patients ayant présenté un rejet des patients stables. (A) L'IL-34 et (B) le CSF-1 sérique ont été quantifiés par ELISA dans le sérum de volontaires sains (HV ; IL-34, n=30 ; CSF-1, n=17) et dans le sérum des patients transplantés rénaux : avant transplantation chez les patients qui vont rejeter dans les 12 mois (Pré-Tx ; IL-34, n=71 ; CSF-1, n=15) et chez les patients stables dans les 12 mois (Pré-Tx ; IL-34, n=102 ; CSF-1, n=15) ainsi que dans les 12 mois après transplantation chez les patients ayant rejeté (Post-Tx ; IL-34, n=42 ; CSF-1, n=15) et chez les patients stables dans les 12 mois (Post-Tx ; IL-34, n=91 ; CSF-1, n=15). Les mesures ont été réalisées en duplicata et chaque point représente un individu. Test Mann Whitney U, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

L'IL-34 et le CSF-1 se lient au même récepteur CSF-1R et ces cytokines partagent des fonctions communes dans la survie, la prolifération et la différenciation des monocytes/macrophages (Lin et al., 2008). Nous avons donc quantifié le taux sérique de CSF-1 dans la même cohorte (**Tableau IX**). A l'inverse de l'IL-34, le CSF-1 est détectable dans la majorité des échantillons. En effet 64% (11/17) des volontaires sains présentent un taux détectable de CSF-1, et entre 73% et 100% des échantillons de la cohorte sont positifs. Avant transplantation, quel que soit le devenir du transplant, le taux sérique de CSF-1 est

nettement plus important que celui des HV (2015,5 pg/mL et 2033,85 pg/mL pour les patients ayant rejeté dans les 12 mois et stables respectivement, vs 212,8 pg/mL pour les HV). De plus, après transplantation le taux de CSF-1 chute, cependant les patients ayant rejeté ont toujours un taux moyen significativement plus important que les HV (689,4 pg/mL vs 212,8 pg/mL) alors que les patients stables présentent un taux similaire aux HV (339,8 pg/mL vs 212,8 pg/mL) (**Figure 24B**).

L'absence de détection de l'IL-34 dans la majorité des échantillons ne permet pas de corréler les taux d'IL-34 et de CSF-1 et le rejet. Ces résultats démontrent que l'IL-34 sérique ne peut pas être utilisé comme marqueur de prédiction pour discriminer les patients ayant présenté un rejet et les patients stables pendant les 12 mois post-transplantation.

Dans une cohorte de patients greffés avec du cellules CD34⁺ de sang placentaire, les patients présentant une forte expression d'IL-34 parmi les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} ont moins de risque d'incidence de GVHD.

Dans une cohorte de patients greffés avec des cellules CD34⁺ du sang placentaire, nous avons étudié la corrélation entre l'expression de l'IL-34 à 3 mois parmi les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-}, les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-}FoxP3⁺, les Tregs CD4⁺CD45RC^{low/-} et les Tregs CD4⁺CD45RC^{low/-}FoxP3⁺ et le développement de la GVHD aigüe et/ou chronique. Les résultats préliminaires montrent que la proportion des Tregs CD4⁺ ou Tregs CD8⁺ est similaire entre les 2 groupes. De plus, en comparant les patients ne développant pas de GVHD à ceux en développant une, l'expression de l'IL-34 par les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} est légèrement réduite chez les patients développant une GVHD. Cette tendance est retrouvée dans la sous-population de Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} exprimant FoxP3 suggérant l'expression de l'IL-34 comme marqueur de bon pronostic. L'expression de l'IL-34 dans les Tregs CD4⁺ est similaire dans les deux groupes (**Figure 25A**).

De plus, en collaboration avec le Dr. Sébastien Maury, nous avons analysé l'incidence de la GVHD (aigüe et/ou chronique) en fonction de la proportion de Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} exprimant l'IL-34. Cette analyse révèle que les patients ayant une expression d'IL-34 de plus de 5,6% ont une incidence significativement diminuée de GVHD. Les analyses d'incidence de GVHD en fonction d'une faible ou forte expression d'IL-34 dans les autres populations de Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-}FoxP3⁺, de Tregs CD4⁺CD45RC^{low/-} et de Tregs CD4⁺CD45RC^{low/-}FoxP3⁺ sont similaires. Par ailleurs, les patients présentant une expression inférieure à 5,6% d'IL-34

parmi les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} développent tous une GVHD, alors que 56,25% des patients ayant une expression supérieure à 5,6% d'IL-34 n'en développe pas (**Figure 25B**).

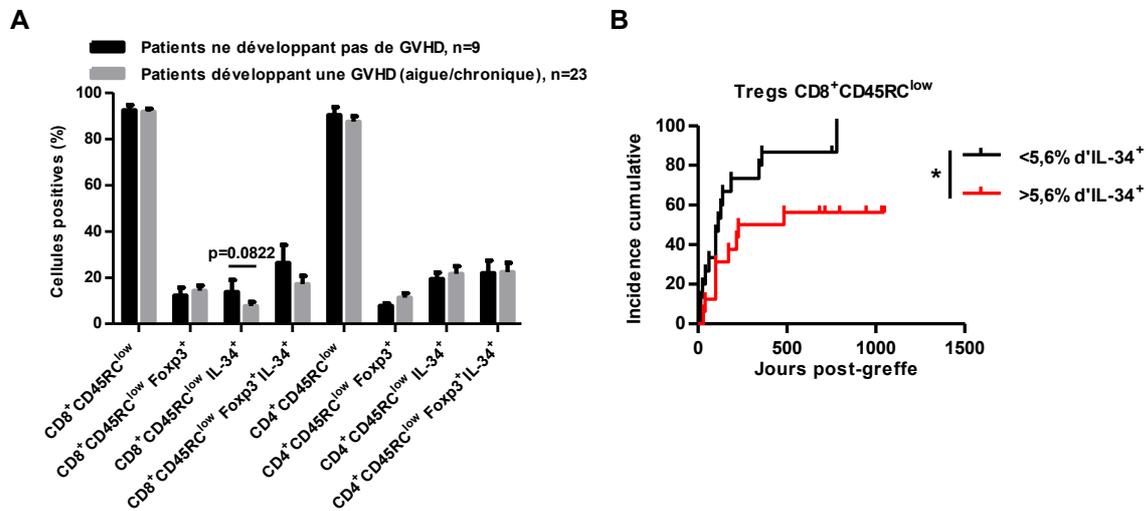


Figure 25: A 3 mois, une plus forte expression d'IL-34 parmi les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} semble être un facteur de bon pronostic dans une cohorte de patients greffés avec du sang placentaire. (A) Les proportions d'expression de Foxp3 et d'IL-34 parmi les Tregs CD4⁺CD45RC^{low/-} et Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} ont été analysées après une stimulation de 7h avec de la PMA, ionomycine et brefeldine A à partir d'un prélèvement à 3 mois de patients greffés avec du sang placentaire. Les résultats sont représentés selon la moyenne \pm SEM. **(B)** L'incidence cumulative de GVHD est représentée en fonction de la proportion d'expression de l'IL-34 parmi les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-}. Les patients ont été divisés selon la médiane d'expression d'IL-34 (<5,6% et >5,6%). Test du Log-rank (Mantel Cox), * $P < 0,05$.

Ces résultats montrent que l'expression de l'IL-34 par les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} semble pouvoir être utilisée comme marqueur de bon pronostic dans la survie sans incidence de GVHD. Cependant, ces résultats sont à confirmer en augmentant le nombre de patients ainsi qu'en approfondissant les analyses statistiques.

DISCUSSION ET CONCLUSION

L'IL-34 a été étudiée dans différentes pathologies inflammatoires dans lesquelles son expression est corrélée à différents critères cliniques comme, entre autres, le score de la maladie, l'infiltrat et la CRP (Chemel et al., 2012b; Chang et al., 2015; Chemel et al., 2017; Wang et al., 2017b; Wada et al., 2019), les auteurs suggérant un rôle pro-inflammatoire. De plus, Baek *et al.* ont mis en évidence que les patients transplantés rénaux présentent un taux sérique d'IL-34 nettement plus élevé lors d'un rejet par rapport à des patients stables et des volontaires sains (Baek et al., 2015). Cependant, les résultats de notre équipe démontrent un

rôle régulateur de l'IL-34 via son expression par les Tregs CD4⁺FoxP3⁺ et Tregs CD8⁺FoxP3⁺. En effet, l'IL-34 permet la génération de macrophages pro-régulateurs capables d'induire la prolifération et d'améliorer les fonctions suppressives des Tregs. Ainsi, l'utilisation de l'IL-34 dans des modèles d'allogreffe cardiaque et hépatique chez le rat permettent d'induire la tolérance et l'inhibition du rejet aigu respectivement (Bézie et al., 2015a; Zhao et al., 2018a). Les résultats de l'étude de la corrélation entre le taux sérique d'IL-34 et la survenue du rejet dans une cohorte de patients transplantés démontrent l'IL-34 ne peut être utilisée comme marqueur de prédiction du rejet dans notre cohorte de patients transplantés rénaux. En effet, la détection, y compris chez les volontaires sains, est très majoritairement inférieure au seuil de sensibilité de l'ELISA puisqu'en moyenne seulement 15% des échantillons sont positifs. Par ailleurs, dans notre cohorte comprenant 306 échantillons, les écarts-types entre les échantillons positifs sont généralement très importants pouvant suggérer une forte variabilité interindividuelle. Ceci peut expliquer nos résultats contradictoires avec l'équipe de Baek *et al.*, en effet leur cohorte n'est composée que de 17 patients en rejet et 17 patients stables contre 42 patients ayant présenté un rejet et 92 patients stables pour notre cohorte. Nous avons aussi comparé le taux d'IL-34 sérique selon les différents temps de prélèvement post-transplantation (3 mois, 6 mois et 12 mois) entre les patients ayant présenté un rejet ou non, ainsi que les prélèvements au moment du rejet et les patients stables. Dans tous les cas, l'IL-34 sérique est majoritairement indétectable et de façon similaire dans les prélèvements d'urine de la même cohorte. La faible détection de l'IL-34 par la technique ELISA a été confirmée par l'utilisation de plusieurs kits provenant de fournisseurs différents.

L'IL-34 et le CSF-1 partagent certaines fonctions à travers la signalisation via le récepteur CSF-1R (Lin et al., 2008). La quantification du CSF-1 sérique dans certains échantillons de la même cohorte a révélé qu'à l'inverse de l'IL-34, le CSF-1 était détectable dans la majorité des échantillons et est plus élevé après transplantation chez les patients présentant un rejet dans les 12 mois. En effet, avant transplantation, les patients ont un taux de CSF-1 plus élevé que les volontaires sains et ce taux diminue dans les 12 mois après transplantation. Cette diminution s'explique par la prise des traitements immunosuppresseurs post-transplantation inhibant le système immunitaire et diminuant ainsi l'expression de cytokines. Il serait intéressant de quantifier le CSF-1 dans une cohorte de patients transplantés dits tolérants, c'est-à-dire des patients ne présentant aucun signe

de rejet en l'absence de prise de traitements immunosuppresseurs. Cette analyse permettrait d'étudier la cinétique d'expression du CSF-1 post-transplantation, ainsi que sa corrélation avec la survenue du rejet des patients pour comparer ces résultats avec les patients sous traitements. De plus, les patients ayant fait un rejet conservent un taux plus important de CSF-1 par rapport aux patients stables et aux volontaires sains suggérant une implication du CSF-1. Ces résultats sont en accord avec l'équipe de Le Meur *et al.* qui a identifié le CSF-1 sérique comme un marqueur de rejet dans la transplantation rénale (Le Meur et al., 2004). Les différences de niveaux d'expression entre l'IL-34 et le CSF-1 sérique peuvent s'expliquer par la sécrétion plus systémique de CSF-1. En effet, à l'état basal, cette cytokine est exprimée de manière quasi constitutive par les fibroblastes, les cellules endothéliales, les cellules stromales, les macrophages, les cellules du muscle lisse et les ostéoblastes suggérant une fonction plus systémique dans l'homéostasie (Hamilton, 2008). A l'inverse, l'IL-34 est exprimée de manière plus restreinte et locale à l'état basal, principalement par les kératinocytes et les neurones et permet de maintenir leur homéostasie indépendamment du CSF-1 (Wang et al., 2012a). La détection de l'IL-34 dans le sérum ne semble pas être une bonne stratégie.

Ainsi, nous avons analysé l'expression de l'IL-34 dans les Tregs CD4⁺ et Tregs CD8⁺ par FACS dans une cohorte de patients souffrant de leucémie aiguë myéloïde greffés avec du sang placentaire développant une GVHD ou non. A 3 mois, nous avons mis en évidence que les patients développant une GVHD ont une proportion de cellules IL-34⁺ parmi les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} légèrement diminuée. De manière intéressante, les patients présentant une plus forte proportion de cellules IL-34⁺ ont moins de risque de développer une GVHD suggérant le potentiel de l'IL-34 comme marqueur de bon pronostic. Cependant, ces résultats sont à confirmer en approfondissant l'analyse statistique en collaboration avec le Dr. Sébastien Maury, en prenant en compte le grade, le forme aiguë ou chronique de la GVHD. Il serait aussi intéressant d'étudier la co-expression de l'IL-34 avec l'IL-10 et l'IFN γ et l'incidence de GVHD. En effet, notre équipe a récemment mis en évidence que la co-expression de ces cytokines par les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} permet d'identifier une sous-population au plus fort potentiel suppresseur (Bézie et al., 2018a). Bien que l'analyse de l'IL-34 sérique soit variable et faiblement détectable, nous pourrions envisager d'étudier la corrélation de l'expression de l'IL-34 par les Tregs et le taux sérique dans une cohorte de patients greffés avec des cellules CD34⁺ de sang placentaire.

Ces résultats pourraient permettre d'utiliser l'expression de l'IL-34 par les Tregs comme marqueur de bon pronostic chez les patients greffés avec du sang placentaire en clinique ainsi que dans d'autres types de transplantation.

Discussion et perspectives

La découverte de l'IL-34 comme ligand alternatif du récepteur CSF-1R a permis d'élucider le phénotype plus sévère des animaux déficients en *Csf1r* comparé aux modèle *Csf1^{-/-}*. En effet, bien que partageant des fonctions communes dans la survie, la prolifération et la différenciation des monocytes en macrophages (Lin et al., 2008), des études ont démontré la non redondance de l'IL-34 et du CSF-1. Tout d'abord, la comparaison des animaux déficients en *Csf1r*, *Csf1* ou *Il34* ont mis en évidence que l'absence d'IL-34 génère un phénotype moins sévère. Grâce à la génération d'un modèle de rat déficient en *Il34* par la technologie CRISPR/Cas9, j'ai mis en évidence que l'espérance de vie, la croissance, la fertilité et la densité osseuse sont normales confortant les résultats retrouvés chez les souris déficientes *Il34^{LacZ/LacZ}*. L'absence de phénotype ostéopétrotique chez les animaux déficients en *Il34* s'explique par l'expression chevauchante avec le *Csf1* capable d'induire la formation d'ostéoclastes (Tanaka et al., 1993; Wang et al., 2012a). Cependant, l'expression d'un transgène codant pour l'*Il34* chez la souris *Csf1*-déficiente *op/op* permet de restaurer les défauts du squelette, de macrophages et de fertilité de ces souris démontrant que l'IL-34 est aussi impliquée dans la formation des ostéoclastes (Wei et al., 2010a). Cette capacité a été confirmée par Baud'huin *et al.*, en effet l'IL-34 en association à RANKL permet de générer des ostéoclastes de façon indépendante de CSF-1 (Baud'huin et al., 2010). De plus, les animaux déficients en *Csf1r* présentent un phénotype ostéopétrotique plus sévère que les animaux *Csf1^{-/-}*, suggérant l'implication de l'IL-34. Ainsi, une double déficience *Il34/Csf1* pourrait permettre de générer le phénotype des animaux *Csf1r^{-/-}*.

Lors de l'embryogénèse, l'IL-34 est exprimée en amont de CSF-1 et l'expression spatiale est différente. Ainsi, les équipes de Wang *et al.* et de Greter *et al.* ont confirmé que l'IL-34 était nécessaire au développement et à la maintenance de la microglie et des cellules de Langerhans (Greter et al., 2012; Wang et al., 2012a, 2015b). Ces résultats ont permis de comprendre la déficience plus sévère de ces populations chez les animaux déficients en *Csf1r* (Dai et al., 2002; Li et al., 2006; Pridans et al., 2018). De manière similaire, j'ai démontré que la microglie était fortement diminuée dans l'hippocampe des rats *Il34^{-/-}* à la différence du cervelet où cette population est similaire aux rats *Il34^{+/+}*. En effet, Kana *et al.* ont mis en évidence que le messager de l'*Il34* était plus fortement exprimé dans le prosencéphale et absent du cervelet, alors que le *Csf1* est fortement exprimé dans le

cervelet (Kana et al., 2019a). La microglie joue un rôle dans les réponses immunes du SNC et contribue aussi à l'homéostasie neuronale (Li and Barres, 2018). Nous avons montré qu'une déficience en microglie dans le prosencéphale ne semble pas induire de déficits moteur et d'anxiété majeures (Collaboration C.Huchet et D.Caudal), ces résultats sont à confirmer. A l'inverse, une déficience en microglie dans le cervelet induit une forte diminution de l'apprentissage moteur et des interactions sociales. En effet, le cervelet est une zone spécialisée dans les fonctions et coordinations motrices (Manto et al., 2012). Or, le messenger de l'*IL34* n'est pas exprimé dans le cervelet contrairement au *Csf1* qui est nécessaire au développement de la microglie dans cette zone (Kana et al., 2019a). Ces informations suggèrent qu'une déficience en microglie dans le prosencéphale n'impacte pas les fonctions motrices, mais de par une déficience dans l'hippocampe, les fonctions de mémoire pourraient être diminuées.

L'utilisation des souris et rats déficients en *IL34* permettent d'approfondir les connaissances quant à la contribution de la microglie dans les pathologies du SNC telles que la maladie d'Alzheimer, la sclérose en plaque (grâce au modèle d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE)) ou encore dans l'uvéite et permettent aussi d'étudier le rôle de l'IL-34. L'équipe de Wang *et al.* a mis en évidence que la microglie joue un rôle prépondérant dans la réponse anti-virale en limitant la neurotoxicité (Wang et al., 2012a). Cependant, comme décrit dans l'introduction, l'implication pro- ou anti-inflammatoire de la microglie dans les maladies neurologiques est encore controversée (Li and Barres, 2018). Dans la maladie d'Alzheimer, l'IL-34 joue un rôle bénéfique via l'induction d'IDE, d'HO-1 de TGFβ1 par la microglie générant une action neuroprotectrice (Mizuno et al., 2011a; Ma et al., 2012a). Ainsi, étudier l'impact d'une déficience en IL-34 ou d'une thérapie par injection de la protéine permettrait de confirmer son rôle et d'établir une nouvelle stratégie thérapeutique. D'autant plus que les patients atteints de cette pathologie présentent une plus faible expression de l'IL-34 (Walker et al., 2017). Par ailleurs, nous avons étudié la conséquence d'une déficience en IL-34 dans le développement de l'EAE chez la souris *IL34^{LacZ/LacZ}*. Bien que ces résultats soient à confirmer, les résultats préliminaires indiquent que l'IL-34 joue un rôle protecteur. En effet son absence induit un développement de la pathologie plus précoce et associé à une perte de poids plus importante. Par ailleurs, nous allons étudier les effets d'une thérapie par l'injection d'un adénovirus codant pour l'IL-34 dans le développement de l'EAE afin d'établir le potentiel thérapeutique. Il serait intéressant

d'étudier l'impact sur les lésions neuronales ainsi que l'infiltrat leucocytaire de ces lésions afin d'élucider le rôle de l'IL-34 dans la neuroprotection et/ou sur l'infiltration de cellules régulatrices. En effet, notre équipe a mis en évidence que l'IL-34 permettait de générer des macrophages pro-régulateurs capables d'induire la prolifération des Tregs CD4⁺FoxP3⁺ et Tregs CD8⁺FoxP3⁺ et d'améliorer leurs fonctions suppressives (Bézie et al., 2015d). La microglie induite par l'IL-34 pourrait alors entraîner l'accumulation de cellules régulatrices inhibant les lymphocytes T effecteurs neurotoxiques. Analyser les cellules présentes dans le liquide céphalo-rachidien permettraient d'éclaircir les mécanismes sous-jacents. Ainsi, il serait possible d'imaginer une thérapie par injection d'IL-34 chez les patients souffrant de maladies neurodégénératives afin de limiter la destruction neuronale. Enfin, une récente étude a démontré la nécessité de l'IL-34 dans le développement de la microglie située dans la couche plexiforme interne (O'Koren et al., 2019) soulevant la question du rôle de l'IL-34/microglie dans le développement de l'uvéite. Une étude non publiée présentée au congrès FOCIS de 2019 d'une équipe américaine de l'Eye Institute du NIH a montré un effet protecteur de l'IL-34 dans un modèle d'uvéite auto-immune via sa capacité à générer la microglie (Interleukin-34 Provides Neuroprotection in a Mouse Model of Experimental Autoimmune Uveitis, Mattapallil *et al.*). Dans l'objectif d'étudier le rôle de l'IL-34 dans cette pathologie, nous allons collaborer avec une équipe spécialisée dans des modèles d'uvéite chez le rat afin d'y étudier l'implication de l'IL-34. Une autre collaboration sera initiée sur le rôle de l'IL-34 dans un modèle de sclérose latérale amyotrophique chez des rats transgéniques pour une forme mutée de la superoxyde dismutase (SOD1^{G93A}) (Trias et al., 2019).

Le rôle de l'IL-34 dans le développement et la maintenance des cellules de Langerhans a été mis en évidence dans deux études grâce aux souris déficientes en *Il34* (Greter et al., 2012; Wang et al., 2012a). Je n'ai pas encore pu démontrer l'absence de cellules de Langerhans chez nos rats *Il34*^{-/-} en utilisant le marqueur CD207 (langérine). Cependant, le modèle de rats déficients en *Csf1r* présente une absence de cellules de Langerhans, identifiées comme CMH-II⁺ suggérant que l'IL-34 joue le même rôle chez le rat dans la génération de ces cellules (Pridans et al., 2018). Je vais ainsi analyser l'expression des cellules CMH-II⁺ situées dans l'épiderme des rats *Il34*^{-/-}. Le rôle des cellules de Langerhans dans le psoriasis est encore controversé, en effet Greter *et al.* ont utilisé les souris déficientes en *Il34* pour démontrer qu'elles n'impactent pas sur la réponse immunitaire dans

cette pathologie (Greter et al., 2012). Cependant, une étude plus récente met en évidence que les cellules de Langerhans sont primordiales dans l'établissement de la réponse immune (Xiao et al., 2017). Afin d'étudier le rôle de l'IL-34 dans le psoriasis nous avons étudié la réponse par l'Imiquimod (un agoniste du TLR7 induisant une pathologie similaire au psoriasis) chez les rats *Il34^{+/+}* et *Il34^{-/-}*. De manière intéressante, l'épaisseur des oreilles des rats *Il34^{-/-}* semble diminuée par rapport aux rats *Il34^{+/+}* suggérant une inflammation moins importante (**Figure 26A**). Dans ce sens, l'infiltration de cellules dans les nœuds lymphatiques drainants (situés au niveau du cou) est moins importante chez les rats déficients (**Figure 26B**).



Figure 26: Les rats *Il34^{-/-}* semblent présenter une inflammation et une infiltration diminuée en réponse à l'Imiquimod par rapport aux rats *Il34^{+/+}*. Chaque rat *Il34^{+/+}* (n=3) et *Il34^{-/-}* (n=3) a été son propre contrôle, et seulement une des deux oreilles a été traitée avec l'Imiquimod (Crème Aldara 5%) du jour 0 à jour 5. **(A)** Mesure de l'épaisseur de l'oreille par rapport au jour 0 du jour 0 au jour 5 reflétant l'inflammation. **(B)** Nombre de cellules dans les ganglions drainants situés au niveau du cou (histogramme de gauche) ou non drainants, nœuds lymphatiques axillaires (histogramme de droite) au sacrifice à jour 6.

Ces résultats sont à confirmer avec un nombre plus important d'animaux et à approfondir mais suggèrent que l'IL-34 est importante dans le maintien des cellules de Langerhans qui en retour semblent impliquée dans la réponse induite par l'Imiquimod. Cette hypothèse est confortée par l'étude chez l'Homme, en effet les patients atteints du psoriasis arthritique présentent un taux sérique d'IL-34 plus élevé. Bien que dans cette cohorte ce taux d'IL-34 corrèle avec différentes caractéristiques cliniques, dont le nombre de précurseurs d'ostéoclastes circulants (Li et al., 2017) suggérant un rôle délétère de l'IL-34 dans l'ostéoclastogénèse, il est aussi possible que l'IL-34 soit impliquée dans l'accumulation des cellules de Langerhans favorisant une réponse inflammatoire.

L'analyse de différents paramètres biochimiques a révélé que les rats *Il34^{-/-}* présentaient des ALAT ainsi qu'un ratio ALAT/LDH plus élevés que chez les rats *Il34^{+/+}*

suggérant une souffrance hépatique (Cassidy and Reynolds, 1994; Kotoh et al., 2008). De plus, les rats *Il34*^{-/-} présentent des perturbations dans les taux de cytokines qui suggèrent une dérégulation vers un phénotype pro-inflammatoire, cependant les animaux ne présentent pas de symptômes auto-immuns puisque les organes ne présentent ni infiltrats ni lésions. Ces caractéristiques ne sont donc pas suffisantes pour déclencher une réponse auto-immune spontanée. Ceci peut s'expliquer par la compensation du CSF-1, en effet les rats *Il34*^{-/-} présentent un taux sérique nettement augmenté pouvant alors remplacer les fonctions de l'IL-34 dans les organes où leurs expressions se chevauchent. Ce mécanisme de compensation peut « effacer » les rôles de l'IL-34, il pourrait être envisagé de réaliser une étude de comparaison des modèles déficients en *Il34*, *Csf1* et *Csf1r* afin d'identifier de nouveaux rôles de l'IL-34 indépendants de CSF-1. Dans cet objectif nous pourrions utiliser un anticorps bloquant anti-CSF-1 dans le modèle de rats *Il34*^{-/-} ou bien générer un modèle inductible *Csf1*^{-/-} dans la souche *Il34*^{-/-} pour analyser l'impact sur le phénotype et corrélérer avec les symptômes des rats *Csf1r*^{-/-}.

L'augmentation de CSF-1 implique une boucle de rétroaction entre l'IL-34 et le CSF-1. Dans cet objectif, j'ai montré qu'une culture de monocytes de rat *Il34*^{+/+} pendant 3 jours avec du CSF-1 recombinant de rat permet d'augmenter l'expression de *Csf1* mais pas celle de l'*Il34* (indétectable) (Figure 27).

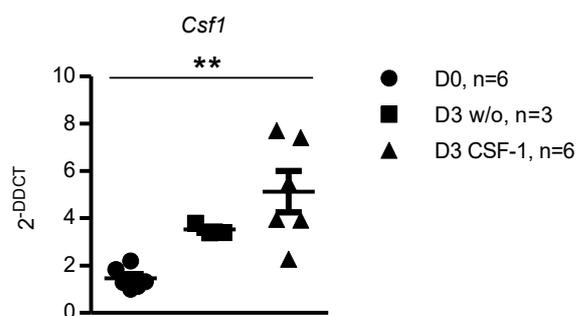


Figure 27: L'ajout de CSF-1 recombinant permet d'induire l'expression de CSF-1 par les monocytes de rat *Il34*^{+/+}. Les monocytes TCR $\alpha\beta$ ⁻SIRP α ⁺ de rat *Il34*^{+/+} ont été triés et mis en culture ou non (D0) pendant 3 jours (D3) avec 100 ng/mL de CSF-1 (D3 CSF-1) ou non (D3 w/o). L'ARNm total des cellules a été extrait et l'expression du messageur de *Csf1* a été analysée par RT-qPCR. Les résultats ont été normalisés selon l'HPRTet sont représentés selon la moyenne du 2- $\Delta\Delta$ CT \pm SEM. Test Mann Whitney, ** $P < 0,01$.

Cette boucle d'augmentation peut s'expliquer soit par un effet direct de l'IL-34 inhibant l'expression de CSF-1 via son interaction avec CSF-1R, soit par compétition entre l'IL-34 et le CSF-1 pour leur récepteur. En effet, Wei *et al.* ont mis en évidence que l'affinité

de l'IL-34 pour CSF-1R est plus importante que le CSF-1 (Wei et al., 2010a), ainsi l'IL-34 se fixe de façon prioritaire bloquant la boucle de rétroaction autocrine du CSF-1. Afin de vérifier ces hypothèses, il serait intéressant d'étudier l'effet de l'IL-34 recombinante sur une culture de monocytes. Néanmoins, l'IL-34 de rat n'est pas encore commercialisée, mais il est possible de purifier la cytokine à partir de cellules transfectées ou d'analyser les possibles réactions croisées de l'IL-34 humaine/murine avec les cellules de rat ou encore analyser l'effet de l'IL-34 humaine sur les monocytes humains.

L'IL-34 agit sur la survie, la prolifération et la différenciation des monocytes/macrophages (Lin et al., 2008), ainsi j'ai analysé les populations de myéloïdes chez les rats *Il34*^{-/-} dans différents organes. Cependant, la déficience en IL-34 n'affecte pas de manière drastique les populations de monocytes/macrophages et de cellules dendritiques. Ces résultats sont similaires à ceux retrouvés chez la souris *Il34*^{LacZ/LacZ}, en effet seulement une sous-population de cellules dendritiques CD11c⁺CD11b⁺ pulmonaires est diminuée (Wang et al., 2012a). Mais dans le colon et l'iléon les *mononuclear phagocytes* (MNP : CD103⁻) semblent diminués et à l'inverse les cellules dendritiques (CD103⁺) semblent augmentées chez les rats *Il34*^{-/-} par rapport aux rats *Il34*^{+/+}. Il serait intéressant de vérifier l'expression des récepteurs de l'IL-34 sur ces populations afin d'analyser l'implication de l'IL-34 vs le CSF-1. L'augmentation des cellules dendritiques pourrait être expliquée par la forte concentration en CSF-1, qui *in vitro* est capable de différencier des pDC (MacDonald et al., 2005; Fancke et al., 2008). La diminution des MNP suggère un rôle de l'IL-34 dans la génération et/ou homéostasie de ces cellules. Dans la continuité de ces résultats, analyser les macrophages résidents comme les cellules de Kupffer et les macrophages alvéolaires permettraient d'étudier de façon plus large le rôle de l'IL-34 dans la génération des macrophages tissulaires. Cependant, il serait aussi nécessaire de bloquer le CSF-1 qui pourrait compenser les effets de l'IL-34.

Le nombre et/ou la proportion des cellules myéloïdes est équivalente entre les rats *Il34*^{+/+} et *Il34*^{-/-}, mais il est important d'analyser la fonction de ces cellules. En effet, la signalisation est similaire entre l'IL-34 et le CSF-1 mais l'intensité de phosphorylation induite par l'IL-34 est plus forte (Chihara et al., 2010; Garceau et al., 2010; Boulakirba et al., 2018). L'absence d'IL-34 pourrait induire un déséquilibre envers un phénotype pro-inflammatoire étant donné que l'IL-34 permet d'induire des macrophages pro-régulateur (Foucher et al., 2013; Bézie et al., 2015d). Par ailleurs des tests *in vitro* peuvent facilement être réalisés afin

d'étudier leur capacité immunostimulatrice de la prolifération de lymphocytes T, de Tregs et l'impact sur leur phénotype par MLR. Des tests de suppression peuvent aussi être effectués avec co-culture de monocytes de rats *Il34^{-/-}* ou *Il34^{+/+}* avec des lymphocytes T CD4⁺CD25⁻ et Tregs CD4⁺ ou Tregs CD8⁺ allogéniques. De plus, étudier le transcriptome des monocytes/macrophages par RNA-sequencing permettrait d'élucider l'impact de la déficience sur l'état de d'activation des cellules à l'homéostasie. Etudier le transcriptome pourrait également servir à l'analyse de l'impact des agonistes des TLR tel que le LPS sur le phénotype des monocytes afin d'améliorer la compréhension du rôle de l'IL-34 sur les monocytes en cas d'infections.

L'IL-34 est exprimée par les Tregs CD4⁺FoxP3⁺ et Tregs CD8⁺FoxP3⁺ (Bézie et al., 2015d), j'ai ainsi analysé la déficience sur la génération des lymphocytes T ainsi que sur les autres populations de lymphocytes B, NK et NKT. De façon intéressante, seuls les lymphocytes T CD8⁺ et particulièrement les T CD8⁺CD45RC^{high} et Tregs CD8⁺FoxP3⁺ sont diminués dans le sang et la rate des rats *Il34^{-/-}* suggérant un rôle de l'IL-34 dans leur développement. Néanmoins, dans le thymus le nombre des différentes populations est similaire indiquant que la diminution des lymphocytes T CD8⁺ est générée en périphérie. Afin d'élucider ce rôle, nous avons réalisé une analyse transcriptomique par DGE RNA-sequencing et de façon intéressante, les Tregs CD4⁺ et Tregs CD8⁺ des rats *Il34^{-/-}* présentent une augmentation d'un seul et même gène *Dnaja1*. Ce gène code pour une protéine de choc thermique (HSP) appartenant à la famille des HSP40 et agit comme co-chaperonne des HSP70 impliquées dans la conformation, le trafic, la prévention d'agrégation et l'hydrolyse des protéines (Spierings and van Eden, 2017). Peu d'études se sont intéressées à *Dnaja1*, cependant les patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde présentent un fort taux d'anticorps anti-Dnaj correspondant à la forme bactérienne et ces anticorps sont aussi capables de reconnaître la forme humaine (Kotlarz et al., 2013). De plus, les HSP40 sont capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ et d'induire l'expression d'IL-10 à partir de PBMC provenant de patients souffrants de polyarthrite rhumatoïde mais pas des volontaires sains suggérant un rôle anti-inflammatoire des HSP40 et leur potentiel d'utilisation thérapeutique (Tukaj et al., 2010). Par ailleurs, des souris *Dnaja1^{-/-}* ont été générées et présentent un défaut de spermatogenèse (Terada et al., 2005). Le lien entre l'IL-34 et *Dnaja1* reste encore à définir. Cependant, nous avons mis en évidence qu'au niveau protéique les Tregs FoxP3⁺ expriment plus fortement *Dnaja1* par rapport aux cellules FoxP3⁻

suggérant une activité plus importante dans les Tregs dont les causes et conséquences restent à être identifiées.

La déficience en IL-34 n'impacte pas sur le phénotype des lymphocytes T après activation. Néanmoins en étudiant leur fonction de prolifération, j'ai démontré que les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{high} des rats *Il34*^{-/-} prolifèrent plus vite avec une stimulation polyclonale. Les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} déficients prolifèrent moins en présence de CPA par rapport aux cellules des rats *Il34*^{+/+}. Afin d'élucider le rôle de l'IL-34 dans la prolifération des Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} *Il34*^{+/+} il serait intéressant de bloquer l'IL-34 dans les MLR afin de confirmer le rôle de l'IL-34 dans leur prolifération. En effet, l'IL-34 permet la génération de macrophages régulateurs (Foucher et al., 2013) capables d'induire la prolifération des Tregs (Bézie et al., 2015d), ainsi son absence pourrait expliquer la diminution de la prolifération. Cependant, les Teff n'exprimant pas l'IL-34, l'augmentation de leur prolifération suggère une dérégulation intrinsèque survenant durant le développement. Le messager de l'*Il34* est exprimé dans le thymus (Wang et al., 2012a) et les macrophages présents jouent un rôle majeur dans l'élimination des débris apoptotiques (Esashi et al., 2003), ils sécrètent des cytokines pouvant affecter la prolifération, maturation et différenciation des thymocytes (Liu et al., 2013). Ainsi, même si la déficience n'impacte pas le nombre de cellules, les fonctions des cellules peuvent être modifiées via les macrophages. L'expression des récepteurs de l'IL-34 pourrait être analysée sur ces macrophages ainsi que sur les cellules épithéliales thymiques afin d'évaluer la possible implication de l'IL-34. De plus, analyser le répertoire TCR des cellules matures permettrait de compléter cette étude quant au rôle de l'IL-34 dans la sélection thymique.

L'utilisation du modèle de « wasting disease » publié par Powrie *et al.* nous a permis de tester la fonction suppressive des Tregs *in vivo* (Powrie, 1990). De manière très intéressante, les Tregs CD4⁺CD25⁺CD127^{low} des rats *Il34*^{-/-} ne permettent pas de protéger du développement de la maladie à la différence des Tregs CD4⁺ des rats *Il34*^{+/+}. Ces résultats mettent en évidence, pour la première fois, le rôle crucial et non compensé de l'IL-34 dans les fonctions suppressives des Tregs CD4⁺. Afin d'élucider le mécanisme, utiliser des stratégies de déplétion des macrophages permettraient d'analyser l'implication des macrophages dans l'induction de la protection comme démontré par notre équipe (Bézie et al., 2015d). Dans cet objectif, il est possible d'utiliser un traitement inhibiteur de la phosphorylation de CSF-1R grâce au GW2580 ou d'utiliser le clodronate liposome.

Cependant ce dernier n'induit pas la déplétion de tous les macrophages tissulaires, en effet en fonction de la voie d'injection certaines populations persistent (van Rooijen and Hendriks, 2010). Une analyse du phénotype des macrophages dans différents organes permettrait de rendre compte de l'état d'activation des rats. La faible protection des Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} peut s'expliquer par la faible proportion de cellules FoxP3⁺ dans cette population. En effet, environ 70% des cellules FoxP3⁺ sont comprises dans les Tregs CD4⁺CD25⁺CD127^{low} (Liu et al., 2006) contre environ 5% dans les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} (Bézie et al., 2018a). Par ailleurs, il serait intéressant d'analyser le transcriptome de ces cellules stimulées afin d'améliorer les connaissances sur le rôle de l'IL-34 dans les fonctions des Tregs en cas d'inflammation. Les fonctions de l'IL-34 sont mises en évidence lorsque les cellules sont présentes dans un contexte pathologique. Ainsi, nous avons étudié l'impact de la déficience en *Il34* dans un modèle de colite chez le rat par injection de TNBS. De manière intéressante, six jours après le début du protocole, le colon des rats *Il34*^{-/-} est plus court suggérant une inflammation plus importante par rapport aux rats *Il34*^{+/+}. Ces résultats peuvent impliquer que les Tregs jouent un rôle dans le contrôle de l'inflammation et que la déficience en *Il34* impacte leurs fonctions ou que l'IL-34 participe au développement/homéostasie des MNP de la lamina propria nécessaire à l'inhibition de l'inflammation. Cependant, bien que les mécanismes soient peu clairs, le modèle de colite induit par le TNBS implique principalement les lymphocytes T. L'IL-12, le TNF α et l'IL-23 sont les principales cytokines induisant la pathologie via la génération et maintien des cellules Th1, Th17 et ILC3, en effet les souris *Il17r*^{-/-} sont résistantes à l'induction de la colite (Buonocore et al., 2010; Takagi et al., 2010). Ces résultats suggèrent que l'IL-34 joue un rôle de régulation via sa sécrétion par les Tregs dans ce modèle. Il est nécessaire d'approfondir l'étude en analysant l'éventuelle compensation du CSF-1 et la composition des cellules présentes dans l'infiltrat afin de vérifier notre hypothèse. Par ailleurs, l'utilisation du modèle de colite par administration de DSS dans l'eau de boisson permettrait d'étudier l'impact de la déficience en *Il34* dans le compartiment myéloïde. Ce modèle étant décrit comme enclenché par les TLR, les récepteurs dectin ou l'inflammasome suite à la rupture de la barrière intestinale aboutissant à l'entrée des microorganismes dans la lamina propria (Kiesler et al., 2015).

Afin de confirmer le rôle de l'IL-34 dans les fonctions suppressives des Tregs, une partie de mon projet de thèse s'est concentrée sur la génération de Tregs CD4⁺ et Tregs CD8⁺ déficientes en IL-34. Pour cela, la technologie CRISPR/Cas9 est utilisée et est en cours de

mise au point avec des résultats préliminaires très satisfaisants (>90% de cellules déficientes pour un gène situé à la membrane cellulaire) afin d'obtenir un nombre de cellules déficientes en *IL34* suffisant pour analyser leur phénotype, ainsi que leurs fonctions de prolifération et de suppression *in vitro* et *in vivo* grâce aux modèles de GVHD et de rejet allogénique de peau chez la souris humanisée. Il est aussi prévu de réaliser une analyse du transcriptome et d'étudier le gène *DNAJA1*.

Nous avons démontré le rôle crucial de l'IL-34 dans les fonctions suppressives, de plus sa surexpression en association à la rapamycine permet d'induire la tolérance à l'allogreffe cardiaque chez le rat (Bézie et al., 2015d). Ainsi, nous avons étudié le potentiel thérapeutique de l'IL-34 dans un modèle de GVHD et de rejet de peau allogénique chez la souris humanisée. Dans ces modèles, l'association de l'IL-34 à une dose sous optimale de rapamycine est nécessaire afin de retarder le développement de la GVHD et du rejet allogénique. En effet, l'IL-34 permet l'induction de macrophages régulateurs qui induisent la prolifération des Tregs (Bézie et al., 2015d), ce mécanisme est indirect sur l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T effecteurs (**Figure 17, p69**). Ainsi, l'ajout de la rapamycine permet de limiter et retarder le développement de la GVHD et du rejet de peau fournissant du temps à l'IL-34 pour agir. De plus, la rapamycine est un immunosuppresseur décrit comme favorisant l'expression de FoxP3 par les Tregs CD4⁺CD25⁺ (Battaglia et al., 2005). Notre équipe a mis en évidence que l'ajout de rapamycine pendant la culture des Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} permet d'améliorer leur prolifération ainsi que leur fonction suppressive par rapport à des Tregs cultivés sans rapamycine (Bézie et al., 2018a). Dans ces modèles, l'effet de l'IL-34 pourrait être amélioré en calculant la demi-vie de cette protéine permettant d'adapter le protocole de traitement. En effet, les cytokines ont généralement une faible demi-vie, une injection tous les 2,5 jours semble donc sous-optimale. C'est pourquoi, l'utilisation de pompes délivrant une dose continue d'IL-34 semble plus efficace dans le retard de la GVHD, ces résultats sont à confirmer. L'analyse des populations humaines dans le sang des souris humanisées révèle que 15 jours après l'injection des PBMC, la majorité des cellules humaines sont des lymphocytes T et les monocytes sont très peu représentés limitant l'action de l'IL-34. De plus, l'IL-34 humaine ne peut pas agir sur les cellules humaines (Wei et al., 2010a). L'utilisation de souris humanisées reconstituées avec des cellules CD34⁺ permet d'obtenir une reconstitution hématopoïétique plus diverse incluant les monocytes (Ito et al., 2002; Shultz et al., 2005). Ainsi, utiliser l'IL-34

dans ces souris permettrait d'augmenter le nombre de cible de l'IL-34 afin de potentialiser son effet.

Enfin pour améliorer l'effet de l'IL-34, des stratégies d'optimisation sont possibles pour une utilisation thérapeutique. Nous avons développé différents mutants de l'IL-34 afin d'améliorer l'affinité pour le récepteur CSF-1R ainsi que sa demi-vie par fusion avec un fragment Fc. La présence de ce fragment Fc permettra à l'IL-34 d'être recyclée via le récepteur FcRn (Roopenian and Akilesh, 2007). Des études sont en cours afin d'évaluer leurs effets sur les monocytes *in vitro* ainsi que dans le modèle de GVHD chez la souris humanisée. De plus, l'utilisation des complexes de cytokines/anticorps anti-cytokines est une stratégie permettant de potentialiser les effets de la cytokine. Par exemple, le complexe d'IL-2/anticorps anti-IL-2 permet d'induire efficacement la prolifération des Tregs inhibant l'inflammation (Wang and Alexander, 2013; Gao et al., 2017). Ainsi, nous pourrions envisager d'étudier l'effet du complexe IL-34/anticorps anti-IL-34 sur la génération et le phénotype des macrophages et l'induction de Tregs *in vitro* et *in vivo*. Par ailleurs, dans l'objectif d'utiliser l'IL-34 dans un protocole de thérapie cellulaire, des résultats préliminaires indiquent que l'IL-34 permet de différencier les monocytes en macrophages régulateurs capables d'induire la prolifération et l'amélioration des fonctions suppressives des Tregs CD8⁺CD45RC^{low}/. Il serait alors possible d'utiliser ces Tregs induits dans des modèles de transplantation chez la souris humanisée.

L'utilisation d'un anticorps bloquant anti-IL-34 est une stratégie envisageable dans le psoriasis. En effet, nous avons montré que les rats *Il34*^{-/-} sont déficients en cellules de Langerhans rendant l'inflammation induite par l'Imiquimod moins importante. L'IL-34 étant impliquée dans l'ostéoclastogénèse et le recrutement de macrophages/TAM, l'anticorps bloquant semble être une stratégie efficace dans l'inhibition de la polyarthrite rhumatoïde ou des cancers. De par son expression préférentielle dans le cerveau et son rôle dans la génération de la microglie ainsi que l'expression de PTP ζ et de CSF-1R, l'administration de l'IL-34 dans les maladies neurodégénératives est une thérapie prometteuse pour induire une neuroprotection afin d'atténuer les symptômes de la maladie d'Alzheimer, de l'uvéite ou de la sclérose en plaque. Enfin, les résultats obtenus dans les modèles de GVHD et de rejet d'allogreffe de peau chez la souris humanisée sont très encourageants quant à l'utilisation de l'IL-34 chez l'Homme dans le cadre de greffe de cellules CD34⁺ de sang placentaire et de

transplantation d'organe soit par administration directe, ou par l'utilisation de Tregs générés par les macrophages différenciés avec l'IL-34 (Figure 28).

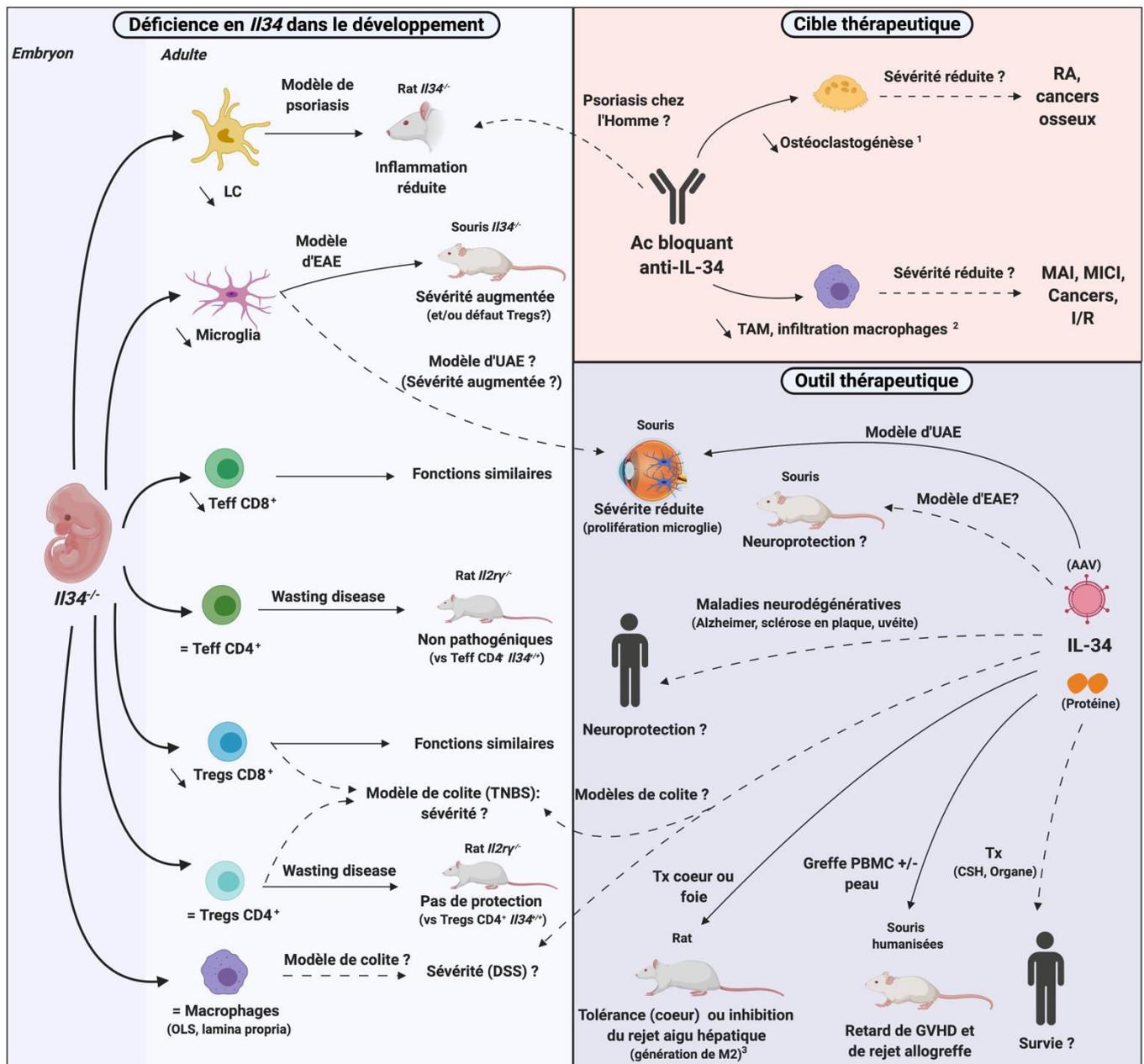


Figure 28: Schéma bilan du rôle de l'IL-34 et de son potentiel d'utilisation. LC : Langerhans cells (cellules de Langerhans) ; EAE : experimental autoimmune encephalomyelitis (encéphalomyélite auto-immune expérimentale) ; UAE : uvéite auto-immune expérimentale ; RA : rhumatoid arthritis (polyarthrite rhumatoïde) ; TAM : tumor associated macrophages ; MAI : maladies auto-immunes ; MICI : maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ; I/R : ischémie/reperfusion ; AAV : adeno-associated virus ; OLS : organes lymphoïdes secondaires (rate et nœuds lymphatiques) ; Tx : transplantation ; M2 : macrophages de type 2 (pro-régulateurs) ; CSH : cellules souches hématopoïétiques ; GVHD : graft-versus-host-disease (maladie du greffon contre l'hôte). ¹ : (Baud'huin et al., 2010) ; ² : (Foucher et al., 2013) (Baek et al., 2015) ; ³ : (Bézie et al., 2015a; Zhao et al., 2018) ; —> : rôle démontré ; - -> : potentiel d'utilisation.

Bibliographie

- Abd, A.H., Savage, N.W., Halliday, W.J., and Hume, D.A. (1991). The role of macrophages in experimental arthritis induced by *Streptococcus agalactiae* sonicate: actions of macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) and other macrophage-modulating agents. *Lymphokine Cytokine Res.* *10*, 43–50.
- Abdel-Dayem, M.A., Shaker, M.E., and Gameil, N.M. (2019). Impact of interferon β -1b, interferon β -1a and fingolimod therapies on serum interleukins-22, 32 α and 34 concentrations in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* *337*, 577062.
- Akane, K., Kojima, S., Mak, T.W., Shiku, H., and Suzuki, H. (2016). CD8+CD122+CD49d^{low} regulatory T cells maintain T-cell homeostasis by killing activated T cells via Fas/FasL-mediated cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *113*, 2460–2465.
- Allard, B., Longhi, M.S., Robson, S.C., and Stagg, J. (2017). The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets. *Immunol. Rev.* *276*, 121–144.
- Altin, J.G., and Sloan, E.K. (1997). The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation. *Immunol. Cell Biol.* *75*, 430–445.
- Apostolou, I., Sarukhan, A., Klein, L., and von Boehmer, H. (2002). Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat. Immunol.* *3*, 756–763.
- Bacchetta, R., Passerini, L., Gambineri, E., Dai, M., Allan, S.E., Perroni, L., Dagna-Bricarelli, F., Sartirana, C., Matthes-Martin, S., Lawitschka, A., et al. (2006). Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations. *J. Clin. Invest.* *116*, 1713–1722.
- Baek, J.-H., Zeng, R., Weinmann-Menke, J., Valerius, M.T., Wada, Y., Ajay, A.K., Colonna, M., and Kelley, V.R. (2015). IL-34 mediates acute kidney injury and worsens subsequent chronic kidney disease. *J. Clin. Invest.* *125*, 3198–3214.
- Baghdadi, M., Wada, H., Nakanishi, S., Abe, H., Han, N., Putra, W.E., Endo, D., Watari, H., Sakuragi, N., Hida, Y., et al. (2016). Chemotherapy-Induced IL34 Enhances Immunosuppression by Tumor-Associated Macrophages and Mediates Survival of Chemoresistant Lung Cancer Cells. *Cancer Res* *76*, 6030–6042.
- Baghdadi, M., Endo, H., Tanaka, Y., Wada, H., and Seino, K.-I. (2017). Interleukin 34, from pathogenesis to clinical applications. *Cytokine* *99*, 139–147.
- Baghdadi, M., Endo, H., Takano, A., Ishikawa, K., Kameda, Y., Wada, H., Miyagi, Y., Yokose, T., Ito, H., Nakayama, H., et al. (2018a). High co-expression of IL-34 and M-CSF correlates with tumor progression and poor survival in lung cancers. *Scientific Reports* *8*, 418.

Baghdadi, M., Umeyama, Y., Hama, N., Kobayashi, T., Han, N., Wada, H., and Seino, K.-I. (2018b). Interleukin-34, a comprehensive review. *J. Leukoc. Biol.* *104*, 931–951.

Baghdadi, M., Umeyama, Y., Hama, N., Kobayashi, T., Han, N., Wada, H., and Seino, K.-I. (2018c). Interleukin-34, a comprehensive review. *J. Leukoc. Biol.* *104*, 931–951.

Baghdadi, M., Ishikawa, K., Nakanishi, S., Murata, T., Umeyama, Y., Kobayashi, T., Kameda, Y., Endo, H., Wada, H., Bogen, B., et al. (2019). A role for IL-34 in osteolytic disease of multiple myeloma. *Blood Adv* *3*, 541–551.

Bain, C.C., Bravo-Blas, A., Scott, C.L., Gomez Perdiguero, E., Geissmann, F., Henri, S., Malissen, B., Osborne, L.C., Artis, D., and Mowat, A.M. (2014). Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nature Immunology* *15*, 929–937.

Bartocci, A., Mastrogiannis, D.S., Migliorati, G., Stockert, R.J., Wolkoff, A.W., and Stanley, E.R. (1987). Macrophages specifically regulate the concentration of their own growth factor in the circulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *84*, 6179–6183.

Battaglia, M., Stabilini, A., and Roncarolo, M.-G. (2005). Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. *Blood* *105*, 4743–4748.

Baud’huin, M., Renault, R., Charrier, C., Riet, A., Moreau, A., Brion, R., Gouin, F., Duplomb, L., and Heymann, D. (2010). Interleukin-34 is expressed by giant cell tumours of bone and plays a key role in RANKL-induced osteoclastogenesis. *J. Pathol.* *221*, 77–86.

Bayry, J., Triebel, F., Kaveri, S.V., and Tough, D.F. (2007). Human Dendritic Cells Acquire a Semimature Phenotype and Lymph Node Homing Potential through Interaction with CD4+CD25+ Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology* *178*, 4184–4193.

Begg, S.K., and Bertocello, I. (1993). The hematopoietic deficiencies in osteopetrotic (op/op) mice are not permanent, but progressively correct with age. *Exp. Hematol.* *21*, 493–495.

Below, J.E., Gamazon, E.R., Morrison, J.V., Konkashbaev, A., Pluzhnikov, A., McKeigue, P.M., Parra, E.J., Elbein, S.C., Hallman, D.M., Nicolae, D.L., et al. (2011). Genome-wide association and meta-analysis in populations from Starr County, Texas, and Mexico City identify type 2 diabetes susceptibility loci and enrichment for expression quantitative trait loci in top signals. *Diabetologia* *54*, 2047–2055.

Beres, A.J., Haribhai, D., Chadwick, A.C., Gonyo, P.J., Williams, C.B., and Drobyski, W.R. (2012). CD8⁺ Foxp3⁺ Regulatory T Cells Are Induced during Graft-versus-Host Disease and Mitigate Disease Severity. *The Journal of Immunology* *189*, 464–474.

Bertrand, J.Y., Giroux, S., Golub, R., Klaine, M., Jalil, A., Boucontet, L., Godin, I., and

Cumano, A. (2005). Characterization of purified intraembryonic hematopoietic stem cells as a tool to define their site of origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 134–139.

Bestard, O., Cuñetti, L., Cruzado, J.M., Lucia, M., Valdez, R., Olek, S., Melilli, E., Torras, J., Mast, R., Gomà, M., et al. (2011). Intragraft regulatory T cells in protocol biopsies retain foxp3 demethylation and are protective biomarkers for kidney graft outcome. *Am. J. Transplant.* *11*, 2162–2172.

Bethunaickan, R., Berthier, C.C., Zhang, W., Kretzler, M., and Davidson, A. (2013). Comparative Transcriptional Profiling of 3 Murine Models of SLE Nephritis Reveals Both Unique and Shared Regulatory Networks. *PLOS ONE* *8*, e77489.

Bézie, S., Picarda, E., Ossart, J., Tesson, L., Usal, C., Renaudin, K., Anegon, I., and Guillonueau, C. (2015a). IL-34 is a Treg-specific cytokine and mediates transplant tolerance. *J Clin Invest* *125*, 3952–3964.

Bézie, S., Picarda, E., Tesson, L., Renaudin, K., Durand, J., Ménoret, S., Mérieau, E., Chiffolleau, E., Guillonueau, C., Caron, L., et al. (2015b). Fibrinogen-like protein 2/fibroleukin induces long-term allograft survival in a rat model through regulatory B cells. *PLoS ONE* *10*, e0119686.

Bézie, S., Picarda, E., Ossart, J., Tesson, L., Usal, C., Renaudin, K., Anegon, I., and Guillonueau, C. (2015c). IL-34 is a Treg-specific cytokine and mediates transplant tolerance. *J. Clin. Invest.* *125*, 3952–3964.

Bézie, S., Picarda, E., Ossart, J., Tesson, L., Usal, C., Renaudin, K., Anegon, I., and Guillonueau, C. (2015d). IL-34 is a Treg-specific cytokine and mediates transplant tolerance. *J. Clin. Invest.* *125*, 3952–3964.

Bézie, S., Meistermann, D., Boucault, L., Kilens, S., Zoppi, J., Autrusseau, E., Donnart, A., Nerrière-Daguin, V., Bellier-Waast, F., Charpentier, E., et al. (2018a). Ex Vivo Expanded Human Non-Cytotoxic CD8+CD45RClow/- Tregs Efficiently Delay Skin Graft Rejection and GVHD in Humanized Mice. *Front Immunol* *8*.

Bézie, S., Anegon, I., and Guillonueau, C. (2018b). Advances on CD8+ Treg Cells and Their Potential in Transplantation. *Transplantation* *102*, 1467–1478.

Bézie, S., Meistermann, D., Boucault, L., Kilens, S., Zoppi, J., Autrusseau, E., Donnart, A., Nerrière-Daguin, V., Bellier-Waast, F., Charpentier, E., et al. (2018c). Ex Vivo Expanded Human Non-Cytotoxic CD8+CD45RClow/- Tregs Efficiently Delay Skin Graft Rejection and GVHD in Humanized Mice. *Frontiers in Immunology* *8*, 2014.

Birkeland, M.L., Johnson, P., Trowbridge, I.S., and Puré, E. (1989). Changes in CD45 isoform expression accompany antigen-induced murine T-cell activation. *Proc. Natl. Acad.*

Sci. U.S.A. 86, 6734–6738.

Blazar, B.R., Aukerman, S.L., and Vallera, D.A. (1992). Effect of recombinant human macrophage colony-stimulating factor in irradiated murine recipients of T-cell-depleted allogeneic or non-depleted syngeneic bone marrow transplants. *Blood* 79, 1636–1642.

Blevins, G., and Fedoroff, S. (1995). Microglia in colony-stimulating factor 1-deficient op/op mice. *J. Neurosci. Res.* 40, 535–544.

Boissonneault, V., Filali, M., Lessard, M., Relton, J., Wong, G., and Rivest, S. (2009). Powerful beneficial effects of macrophage colony-stimulating factor on beta-amyloid deposition and cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Brain* 132, 1078–1092.

Booker, B.E., Clark, R.S., Pellom, S.T., and Adunyah, S.E. (2015). Interleukin-34 induces monocytic-like differentiation in leukemia cell lines. *Int J Biochem Mol Biol* 6, 1–16.

Bopp, T., Becker, C., Klein, M., Klein-Hessling, S., Palmetshofer, A., Serfling, E., Heib, V., Becker, M., Kubach, J., Schmitt, S., et al. (2007). Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J. Exp. Med.* 204, 1303–1310.

Boström, E.A., and Lundberg, P. (2013). The Newly Discovered Cytokine IL-34 Is Expressed in Gingival Fibroblasts, Shows Enhanced Expression by Pro-Inflammatory Cytokines, and Stimulates Osteoclast Differentiation. *PLOS ONE* 8, e81665.

Boulakirba, S., Pfeifer, A., Mhaidly, R., Obba, S., Goulard, M., Schmitt, T., Chaintreuil, P., Calleja, A., Furstoss, N., Orange, F., et al. (2018). IL-34 and CSF-1 display an equivalent macrophage differentiation ability but a different polarization potential. *Scientific Reports* 8, 256.

Boyton, R.J., and Altmann, D.M. (2002). Is selection for TCR affinity a factor in cytokine polarization? *Trends Immunol.* 23, 526–529.

Braudeau, C., Racape, M., Giral, M., Louis, S., Moreau, A., Berthelot, L., Heslan, M., Ashton-Chess, J., Soulillou, J.-P., and Brouard, S. (2007). Variation in numbers of CD4⁺ CD25^{high} FOXP3⁺ T cells with normal immuno-regulatory properties in long-term graft outcome. *Transplant International* 20, 845–855.

Braza, M.S., Conde, P., Garcia, M., Cortegano, I., Brahmachary, M., Pothula, V., Fay, F., Boros, P., Werner, S.A., Ginhoux, F., et al. (2018). Neutrophil derived CSF1 induces macrophage polarization and promotes transplantation tolerance. *American Journal of Transplantation* 18, 1247–1255.

Brito-Zerón, P., Baldini, C., Bootsma, H., Bowman, S.J., Jonsson, R., Mariette, X., Sivils, K., Theander, E., Tzioufas, A., and Ramos-Casals, M. (2016). Sjögren syndrome. *Nature Reviews Disease Primers* 2.

Brockmann, L., Gagliani, N., Steglich, B., Giannou, A.D., Kempinski, J., Pelczar, P., Geffken, M., Mfarrej, B., Huber, F., Herkel, J., et al. (2017). IL-10 Receptor Signaling Is Essential for TR1 Cell Function In Vivo. *J. Immunol.* *198*, 1130–1141.

Broichhausen, C., Riquelme, P., Geissler, E.K., and Hutchinson, J.A. (2012). Regulatory macrophages as therapeutic targets and therapeutic agents in solid organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* *17*, 332–342.

Brubaker, S.W., Bonham, K.S., Zanoni, I., and Kagan, J.C. (2015). Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annu. Rev. Immunol.* *33*, 257–290.

Brunkow, M.E., Jeffery, E.W., Hjerrild, K.A., Paeper, B., Clark, L.B., Yasayko, S.A., Wilkinson, J.E., Galas, D., Ziegler, S.F., and Ramsdell, F. (2001). Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.* *27*, 68–73.

Brunstein, C.G., Miller, J.S., Cao, Q., McKenna, D.H., Hippen, K.L., Curtsinger, J., DeFor, T., Levine, B.L., June, C.H., Rubinstein, P., et al. (2011). Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics. *Blood* *117*, 1061–1070.

Budhu, A., Forgues, M., Ye, Q.-H., Jia, H.-L., He, P., Zanetti, K.A., Kammula, U.S., Chen, Y., Qin, L.-X., Tang, Z.-Y., et al. (2006). Prediction of venous metastases, recurrence, and prognosis in hepatocellular carcinoma based on a unique immune response signature of the liver microenvironment. *Cancer Cell* *10*, 99–111.

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

Burbelo, P.D., Ching, K.H., Klimavicz, C.M., and Iadarola, M.J. (2009). Antibody Profiling by Luciferase Immunoprecipitation Systems (LIPS). *JoVE* 1549.

Cai, Y., Shen, X., Ding, C., Qi, C., Li, K., Li, X., Jala, V.R., Zhang, H., Wang, T., Zheng, J., et al. (2011). Pivotal role of dermal IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells in skin inflammation. *Immunity* *35*, 596–610.

Campbell, I.K., Rich, M.J., Bischof, R.J., and Hamilton, J.A. (2000). The colony-stimulating factors and collagen-induced arthritis: exacerbation of disease by M-CSF and G-CSF and requirement for endogenous M-CSF. *J. Leukoc. Biol.* *68*, 144–150.

Cannarile, M.A., Weisser, M., Jacob, W., Jegg, A.-M., Ries, C.H., and Rüttinger, D. (2017). Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) inhibitors in cancer therapy. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* *5*.

Carr, T.M., Wheaton, J.D., Houtz, G.M., and Ciofani, M. (2017). JunB promotes Th17 cell identity and restrains alternative CD4⁺ T-cell programs during inflammation. *Nature Communications* 8.

Carter, L.L., and Dutton, R.W. (1995). Relative perforin- and Fas-mediated lysis in T1 and T2 CD8 effector populations. *J. Immunol.* 155, 1028–1031.

Cassidy, W.M., and Reynolds, T.B. (1994). Serum lactic dehydrogenase in the differential diagnosis of acute hepatocellular injury. *J. Clin. Gastroenterol.* 19, 118–121.

Cautain, B., Damoiseaux, J., Bernard, I., Fournié, E., van Breda Vriesman, P., Druet, P., and Saoudi, A. (1999). Non-MHC determined resistance of Brown-Norway rats to develop experimental allergic encephalomyelitis is mediated by the endogenous production of transforming growth factor-beta. *Transplant. Proc.* 31, 1602–1603.

Cautain, B., Damoiseaux, J., Bernard, I., van Straaten, H., van Breda Vriesman, P., Boneu, B., Druet, P., and Saoudi, A. (2001). Essential role of TGF-beta in the natural resistance to experimental allergic encephalomyelitis in rats. *Eur. J. Immunol.* 31, 1132–1140.

Chan, C.W.Y., Kay, L.S., Khadaroo, R.G., Chan, M.W.C., Lakatoo, S., Young, K.J., Zhang, L., Gorczyński, R.M., Cattral, M., Rotstein, O., et al. (2003). Soluble Fibrinogen-Like Protein 2/Fibroleukin Exhibits Immunosuppressive Properties: Suppressing T Cell Proliferation and Inhibiting Maturation of Bone Marrow-Derived Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* 170, 4036–4044.

Chang, E.-J., Lee, S.K., Song, Y.S., Jang, Y.J., Park, H.S., Hong, J.P., Ko, A.R., Kim, D.Y., Kim, J.-H., Lee, Y.J., et al. (2014). IL-34 Is Associated with Obesity, Chronic Inflammation, and Insulin Resistance. *None* 99, E1263–E1271.

Chang, S.H., Choi, B.Y., Choi, J., Yoo, J.J., Ha, Y.-J., Cho, H.J., Kang, E.H., Song, Y.W., and Lee, Y.J. (2015). Baseline serum interleukin-34 levels independently predict radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 35, 71–79.

Chatila, T.A., Blaeser, F., Ho, N., Lederman, H.M., Voulgaropoulos, C., Helms, C., and Bowcock, A.M. (2000). JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J. Clin. Invest.* 106, R75-81.

Chauhan, S.K., Saban, D.R., Lee, H.K., and Dana, R. (2009). Levels of Foxp3 in regulatory T cells reflect their functional status in transplantation. *J. Immunol.* 182, 148–153.

Chemel, M., Goff, B.L., Brion, R., Cozic, C., Berreur, M., Amiaud, J., Bougras, G., Touchais, S., Blanchard, F., Heymann, M.F., et al. (2012a). Interleukin 34 expression is associated with synovitis severity in rheumatoid arthritis patients. *Annals of the Rheumatic Diseases* 71, 150–154.

Chemel, M., Le Goff, B., Brion, R., Cozic, C., Berreur, M., Amiaud, J., Bougras, G., Touchais, S., Blanchard, F., Heymann, M.F., et al. (2012b). Interleukin 34 expression is associated with synovitis severity in rheumatoid arthritis patients. *Ann. Rheum. Dis.* *71*, 150–154.

Chemel, M., Brion, R., Segaliny, A.-I., Lamora, A., Charrier, C., Brulin, B., Maugars, Y., Le Goff, B., Heymann, D., and Verrecchia, F. (2017). Bone Morphogenetic Protein 2 and Transforming Growth Factor β 1 Inhibit the Expression of the Proinflammatory Cytokine IL-34 in Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts. *The American Journal of Pathology* *187*, 156–162.

Chen, M.J., Li, Y., De Obaldia, M.E., Yang, Q., Yzaguirre, A.D., Yamada-Inagawa, T., Vink, C.S., Bhandoola, A., Dzierzak, E., and Speck, N.A. (2011a). Erythroid/myeloid progenitors and hematopoietic stem cells originate from distinct populations of endothelial cells. *Cell Stem Cell* *9*, 541–552.

Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.-J., 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.

Chen, Z., Laurence, A., and O’Shea, J.J. (2007). Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation. *Semin Immunol* *19*, 400–408.

Chen, Z., Buki, K., Vääräniemi, J., Gu, G., and Väänänen, H.K. (2011b). The critical role of IL-34 in osteoclastogenesis. *PLoS ONE* *6*, e18689.

Chéné, A.-L., d’Almeida, S., Blondy, T., Tabiasco, J., Deshayes, S., Fonteneau, J.-F., Cellerin, L., Delneste, Y., Grégoire, M., and Blanquart, C. (2016). Pleural Effusions from Patients with Mesothelioma Induce Recruitment of Monocytes and Their Differentiation into M2 Macrophages. *Journal of Thoracic Oncology* *11*, 1765–1773.

Cheng, S.-B., and Sharma, S. (2015). Interleukin-10: A Pleiotropic Regulator in Pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology* *73*, 487–500.

Cheng, S.-T., Tang, H., Ren, J.-H., Chen, X., Huang, A.-L., and Chen, J. (2017). Interleukin-34 inhibits hepatitis B virus replication in vitro and in vivo. *PLOS ONE* *12*, e0179605.

Chenouard, V., Brusselle, L., Heslan, J.-M., Remy, S., Ménoret, S., Usal, C., Ouisse, L.-H., NGuyen, T.H., Anegon, I., and Tesson, L. (2016). A Rapid and Cost-Effective Method for Genotyping Genome-Edited Animals: A Heteroduplex Mobility Assay Using Microfluidic Capillary Electrophoresis. *Journal of Genetics and Genomics* *43*, 341–348.

Chihara, T., Suzu, S., Hassan, R., Chutiwitoonchai, N., Hiyoshi, M., Motoyoshi, K., Kimura, F., and Okada, S. (2010). IL-34 and M-CSF share the receptor Fms but are not identical in

biological activity and signal activation. *Cell Death Differ.* 17, 1917–1927.

Chitu, V., and Stanley, E.R. (2006). Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation. *Curr. Opin. Immunol.* 18, 39–48.

Chockalingam, S., and Ghosh, S.S. (2014). Macrophage colony-stimulating factor and cancer: a review. *Tumor Biol.* 35, 10635–10644.

Ciccia, F., Alessandro, R., Rodolico, V., Guggino, G., Raimondo, S., Guarnotta, C., Giardina, A., Sireci, G., Campisi, G., De Leo, G., et al. (2013a). IL-34 is overexpressed in the inflamed salivary glands of patients with Sjogren's syndrome and is associated with the local expansion of pro-inflammatory CD14(bright)CD16+ monocytes. *Rheumatology (Oxford)* 52, 1009–1017.

Ciccia, F., Alessandro, R., Rodolico, V., Guggino, G., Raimondo, S., Guarnotta, C., Giardina, A., Sireci, G., Campisi, G., De Leo, G., et al. (2013b). IL-34 is overexpressed in the inflamed salivary glands of patients with Sjogren's syndrome and is associated with the local expansion of pro-inflammatory CD14(bright)CD16+ monocytes. *Rheumatology (Oxford)* 52, 1009–1017.

Clark, M.C., and Baum, L.G. (2012). T cells modulate glycans on CD43 and CD45 during development and activation, signal regulation, and survival. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1253, 58–67.

Cohen, S., Bigazzi, P.E., and Yoshida, T. (1974). Commentary. Similarities of T cell function in cell-mediated immunity and antibody production. *Cell. Immunol.* 12, 150–159.

Cohen, S., Shoshana, O., Zelman-Toister, E., Maharshak, N., Binsky-Ehrenreich, I., Gordin, M., Hazan-Halevy, I., Herishanu, Y., Shvidel, L., Haran, M., et al. (2012). The Cytokine Midkine and Its Receptor RPTP ζ Regulate B Cell Survival in a Pathway Induced by CD74. *The Journal of Immunology* 188, 259–269.

Coillard, A., and Segura, E. (2019). In vivo Differentiation of Human Monocytes. *Frontiers in Immunology* 10.

Cole, D.J., Sanda, M.G., Yang, J.C., Schwartzenuber, D.J., Weber, J., Ettinghausen, S.E., Pockaj, B.A., Kim, H.I., Levin, R.D., and Pogrebniak, H.W. (1994). Phase I trial of recombinant human macrophage colony-stimulating factor administered by continuous intravenous infusion in patients with metastatic cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 86, 39–45.

Collins, T., Korman, A.J., Wake, C.T., Boss, J.M., Kappes, D.J., Fiers, W., Ault, K.A., Gimbrone, M.A., Strominger, J.L., and Pober, J.S. (1984). Immune interferon activates multiple class II major histocompatibility complex genes and the associated invariant chain gene in human endothelial cells and dermal fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81,

4917–4921.

Collison, L.W., Workman, C.J., Kuo, T.T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K.M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R.S., and Vignali, D.A.A. (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450, 566–569.

Conde, P., Rodriguez, M., van der Touw, W., Jimenez, A., Burns, M., Miller, J., Brahmachary, M., Chen, H., Boros, P., Rausell-Palamos, F., et al. (2015). DC-SIGN(+) Macrophages Control the Induction of Transplantation Tolerance. *Immunity* 42, 1143–1158.

Cotton, W.R., and Gaines, J.F. (1974). Unruptured Dentition Secondary to Congenital Osteopetrosis in the Osborne-Mendel Rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 146, 554–561.

Cowan, J.E., Baik, S., McCarthy, N.I., Parnell, S.M., White, A.J., Jenkinson, W.E., and Anderson, G. (2018). Aire controls the recirculation of murine Foxp3+ regulatory T-cells back to the thymus. *Eur. J. Immunol.* 48, 844–854.

Cox, M.A., Harrington, L.E., and Zajac, A.J. (2011). Cytokines and the Inception of CD8 T Cell Responses. *Trends Immunol* 32, 180–186.

Crotti, A., Benner, C., Kerman, B.E., Gosselin, D., Lagier-Tourenne, C., Zuccato, C., Cattaneo, E., Gage, F.H., Cleveland, D.W., and Glass, C.K. (2014). Mutant Huntingtin promotes autonomous microglia activation via myeloid lineage-determining factors. *Nat. Neurosci.* 17, 513–521.

Cui, M.Y., Li, X., Lei, Y.M., Xia, L.P., Lu, J., and Shen, H. (2019). Effects of IL-34 on the secretion of RANKL/OPG by fibroblast-like synoviocytes and peripheral blood mononuclear cells in rheumatoid arthritis. *Eur. Cytokine Netw.* 30, 67–73.

Cumano, A., and Godin, I. (2007). Ontogeny of the hematopoietic system. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 745–785.

Cupp, J.S., Miller, M.A., Montgomery, K.D., Nielsen, T.O., O’Connell, J.X., Huntsman, D., van de Rijn, M., Gilks, C.B., and West, R.B. (2007). Translocation and expression of CSF1 in pigmented villonodular synovitis, tenosynovial giant cell tumor, rheumatoid arthritis and other reactive synovitides. *Am. J. Surg. Pathol.* 31, 970–976.

Dai, X.-M., Ryan, G.R., Hapel, A.J., Dominguez, M.G., Russell, R.G., Kapp, S., Sylvestre, V., and Stanley, E.R. (2002). Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood* 99, 111–120.

Dai, Z., Zhang, S., Xie, Q., Wu, S., Su, J., Li, S., Xu, Y., and Li, X.C. (2014). Natural CD8+CD122+ T cells are more potent in suppression of allograft rejection than CD4+CD25+

regulatory T cells. *Am. J. Transplant.* *14*, 39–48.

Danks, L., Sabokbar, A., Gundle, R., and Athanasou, N.A. (2002). Synovial macrophage-osteoclast differentiation in inflammatory arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* *61*, 916–921.

Das, S.K., Stanley, E.R., Guilbert, L.J., and Forman, L.W. (1980). Discrimination of a colony stimulating factor subclass by a specific receptor on a macrophage cell line. *J. Cell. Physiol.* *104*, 359–366.

Dawod, B., and Marshall, J.S. (2019). Cytokines and Soluble Receptors in Breast Milk as Enhancers of Oral Tolerance Development. *Front Immunol* *10*.

De, I., Steffen, M.D., Clark, P.A., Patros, C.J., Sokn, E., Bishop, S.M., Litscher, S., Maklakova, V.I., Kuo, J.S., Rodriguez, F.J., et al. (2016). CSF1 Overexpression Promotes High-Grade Glioma Formation without Impacting the Polarization Status of Glioma-Associated Microglia and Macrophages. *Cancer Research* *76*, 2552–2560.

Denning, T.L., Granger, S.W., Granger, S., Mucida, D., Graddy, R., Leclercq, G., Zhang, W., Honey, K., Rasmussen, J.P., Cheroutre, H., et al. (2007). Mouse TCRalpha+CD8alpha intraepithelial lymphocytes express genes that down-regulate their antigen reactivity and suppress immune responses. *J. Immunol.* *178*, 4230–4239.

Deshmane, S.L., Kremlev, S., Amini, S., and Sawaya, B.E. (2009). Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *J Interferon Cytokine Res* *29*, 313–326.

Deverman, B.E., and Patterson, P.H. (2009). Cytokines and CNS Development. *Neuron* *64*, 61–78.

Diebold, R.J., Eis, M.J., Yin, M., Ormsby, I., Boivin, G.P., Darrow, B.J., Saffitz, J.E., and Doetschman, T. (1995). Early-onset multifocal inflammation in the transforming growth factor beta 1-null mouse is lymphocyte mediated. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *92*, 12215–12219.

Dinarello, C.A. (2007). Historical Review of Cytokines. *Eur J Immunol* *37*, S34–S45.

Ding, L.L., Li, X., Lei, Y.M., Xia, L.P., Lu, J., and Shen, H. (2019). Effect of Interleukin-34 on Secretion of Angiogenesis Cytokines by Peripheral Blood Mononuclear Cells of Rheumatoid Arthritis. *Immunol. Invest.* 1–7.

Ding, R., Li, P., Song, D., Zhang, X., and Bi, L. (2015). Predictors of response to TNF- α antagonist therapy in Chinese rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* *34*, 1203–1210.

Doebel, T., Voisin, B., and Nagao, K. (2017). Langerhans Cells - The Macrophage in Dendritic Cell Clothing. *Trends Immunol.* *38*, 817–828.

Duarte, P.M., de Oliveira, M.C.G., Tambeli, C.H., Parada, C.A., Casati, M.Z., and Nociti, F.H. (2007). Overexpression of interleukin-1 β and interleukin-6 may play an important role in

periodontal breakdown in type 2 diabetic patients. *Journal of Periodontal Research* 42, 377–381.

Duluc, D., Delneste, Y., Tan, F., Moles, M.-P., Grimaud, L., Lenoir, J., Preisser, L., Anegon, I., Catala, L., Ifrah, N., et al. (2007). Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood* 110, 4319–4330.

Dumonde, D.C., Wolstencroft, R.A., Panayi, G.S., Matthew, M., Morley, J., and Howson, W.T. (1969). “Lymphokines”: non-antibody mediators of cellular immunity generated by lymphocyte activation. *Nature* 224, 38–42.

Elkhider, A., Wei, J., Al-Azab, M., Tang, Y., Walana, W., Li, W., Yuan, B., Ye, Y., Zhang, Y., and Li, X. (2019). IL-34 modulates rheumatoid synovial fibroblasts proliferation and migration via ERK/AKT signalling pathway. *Clin. Exp. Rheumatol.*

Endharti, A.T., Okuno, Y., Shi, Z., Misawa, N., Toyokuni, S., Ito, M., Isobe, K., and Suzuki, H. (2011). CD8+CD122+ regulatory T cells (Tregs) and CD4+ Tregs cooperatively prevent and cure CD4+ cell-induced colitis. *J. Immunol.* 186, 41–52.

Epelman, S., Lavine, K.J., Beaudin, A.E., Sojka, D.K., Carrero, J.A., Calderon, B., Brija, T., Gautier, E.L., Ivanov, S., Satpathy, A.T., et al. (2014). Embryonic and Adult-Derived Resident Cardiac Macrophages Are Maintained through Distinct Mechanisms at Steady State and during Inflammation. *Immunity* 40, 91–104.

Esaki, H., Ewald, D.A., Ungar, B., Rozenblit, M., Zheng, X., Xu, H., Estrada, Y.D., Peng, X., Mitsui, H., Litman, T., et al. (2015). Identification of novel immune and barrier genes in atopic dermatitis by means of laser capture microdissection. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 135, 153–163.

Esashi, E., Sekiguchi, T., Ito, H., Koyasu, S., and Miyajima, A. (2003). Cutting Edge: A Possible Role for CD4⁺ Thymic Macrophages as Professional Scavengers of Apoptotic Thymocytes. *The Journal of Immunology* 171, 2773–2777.

Fan, Q., Yan, X., Zhang, H., Lu, L., Zhang, Q., Wang, F., Xi, R., Hu, J., Chen, Q., Niu, W., et al. (2016). IL-34 is associated with the presence and severity of renal dysfunction and coronary artery disease in patients with heart failure. *Scientific Reports* 6, 39324.

Fancke, B., Suter, M., Hochrein, H., and O’Keeffe, M. (2008). M-CSF: a novel plasmacytoid and conventional dendritic cell poietin. *Blood* 111, 150–159.

Feldmann, M. (2008). Many cytokines are very useful therapeutic targets in disease. *J Clin Invest* 118, 3533–3536.

Felix, J., Elegheert, J., Gutsche, I., Shkumatov, A.V., Wen, Y., Bracke, N., Pannecoucke, E.,

Vandenberghe, I., Devreese, B., Svergun, D.I., et al. (2013). Human IL-34 and CSF-1 establish structurally similar extracellular assemblies with their common hematopoietic receptor. *Structure* 21, 528–539.

Felix, R., Cecchini, M.G., Hofstetter, W., Elford, P.R., Stutzer, A., and Fleisch, H. (1990). Impairment of macrophage colony-stimulating factor production and lack of resident bone marrow macrophages in the osteopetrotic op/op mouse. *J. Bone Miner. Res.* 5, 781–789.

Filippi, M., Bar-Or, A., Piehl, F., Preziosa, P., Solari, A., Vukusic, S., and Rocca, M.A. (2018). Multiple sclerosis. *Nature Reviews Disease Primers* 4.

van der Fits, L., Mourits, S., Voerman, J.S.A., Kant, M., Boon, L., Laman, J.D., Cornelissen, F., Mus, A.-M., Floencia, E., Prens, E.P., et al. (2009). Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *J. Immunol.* 182, 5836–5845.

Fleetwood, A.J., Lawrence, T., Hamilton, J.A., and Cook, A.D. (2007). Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (CSF) and Macrophage CSF-Dependent Macrophage Phenotypes Display Differences in Cytokine Profiles and Transcription Factor Activities: Implications for CSF Blockade in Inflammation. *The Journal of Immunology* 178, 5245–5252.

Flippe, L., Bézie, S., Anegon, I., and Guillonneau, C. (2019a). Future prospects for CD8⁺ regulatory T cells in immune tolerance. *Immunol Rev* imr.12812.

Flippe, L., Bézie, S., Anegon, I., and Guillonneau, C. (2019b). Future prospects for CD8⁺ regulatory T cells in immune tolerance. *Immunological Reviews*.

Foucher, E.D., Blanchard, S., Preisser, L., Garo, E., Ifrah, N., Guardiola, P., Delneste, Y., and Jeannin, P. (2013). IL-34 induces the differentiation of human monocytes into immunosuppressive macrophages. antagonistic effects of GM-CSF and IFN γ . *PLoS ONE* 8, e56045.

Foucher, E.D., Blanchard, S., Preisser, L., Descamps, P., Ifrah, N., Delneste, Y., and Jeannin, P. (2015). IL-34- and M-CSF-induced macrophages switch memory T cells into Th17 cells via membrane IL-1 α . *Eur. J. Immunol.* 45, 1092–1102.

Fournie, G.J., Cautain, B., Xystrakis, E., Damoiseaux, J., Lagrange, M.M.D., Bernard, I., Subra, J.-F., Pelletier, L., Druet, P., and Saoudi, A. (2001). Cellular and genetic factors involved in the difference between Brown Norway and Lewis rats to develop respectively type-2 and type-1 immune-mediated diseases. *Immunological Reviews* 184, 145–160.

Frame, J.M., McGrath, K.E., and Palis, J. (2013). Erythro-myeloid progenitors: “definitive” hematopoiesis in the conceptus prior to the emergence of hematopoietic stem cells. *Blood Cells Mol. Dis.* 51, 220–225.

Franzè, E., Monteleone, I., Cupi, M.L., Mancia, P., Caprioli, F., Marafini, I., Colantoni, A., Ortenzi, A., Laudisi, F., Sica, G., et al. (2015). Interleukin-34 sustains inflammatory pathways in the gut. *Clinical Science* 129, 271–280.

Franzè, E., Marafini, I., De Simone, V., Monteleone, I., Caprioli, F., Colantoni, A., Ortenzi, A., Crescenzi, F., Izzo, R., Sica, G., et al. (2016). Interleukin-34 Induces Cc-chemokine Ligand 20 in Gut Epithelial Cells. *Journal of Crohn's and Colitis* 10, 87–94.

Franzè, E., Dinallo, V., Rizzo, A., Di Giovangiulio, M., Bevivino, G., Stolfi, C., Caprioli, F., Colantoni, A., Ortenzi, A., Grazia, A.D., et al. (2017). Interleukin-34 sustains pro-tumorigenic signals in colon cancer tissue. *Oncotarget* 9, 3432–3445.

Fujii, T., Okada, M., Fujita, Y., Sato, T., Tanaka, M., Usui, T., Umehara, H., and Mimori, T. (2009). Vaccination with autoreactive CD4(+)Th1 clones in lupus-prone MRL/Mp-Fas(lpr/lpr) mice. *J. Autoimmun.* 33, 125–134.

Fujikawa, A., Nagahira, A., Sugawara, H., Ishii, K., Imajo, S., Matsumoto, M., Kuboyama, K., Suzuki, R., Tanga, N., Noda, M., et al. (2016). Small-molecule inhibition of PTPRZ reduces tumor growth in a rat model of glioblastoma. *Sci Rep* 6, 20473.

Fujikawa, A., Sugawara, H., Tanaka, T., Matsumoto, M., Kuboyama, K., Suzuki, R., Tanga, N., Ogata, A., Masumura, M., and Noda, M. (2017). Targeting PTPRZ inhibits stem cell-like properties and tumorigenicity in glioblastoma cells. *Sci Rep* 7, 5609.

van Furth, R., and Cohn, Z.A. (1968). The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.* 128, 415–435.

van Furth, R., and Diesselhoff-Den Dulk, M.M. (1970). The kinetics of promonocytes and monocytes in the bone marrow. *J. Exp. Med.* 132, 813–828.

Gagliani, N., Magnani, C.F., Huber, S., Gianolini, M.E., Pala, M., Licona-Limon, P., Guo, B., Herbert, D.R., Bulfone, A., Trentini, F., et al. (2013). Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nat. Med.* 19, 739–746.

Galligan, C.L., and Fish, E.N. (2012). Circulating fibrocytes contribute to the pathogenesis of collagen antibody-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 64, 3583–3593.

Galligan, C.L., and Fish, E.N. (2017). Interleukin-34 Promotes Fibrocyte Proliferation. *J. Interferon Cytokine Res.* 37, 440–448.

Galligan, C.L., Siminovitch, K.A., Keystone, E.C., Bykerk, V., Perez, O.D., and Fish, E.N. (2010). Fibrocyte activation in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 49, 640–651.

Gallo, P., Pagni, S., Giometto, B., Piccinno, M.G., Bozza, F., Argentiero, V., and Tavalato, B. (1990). Macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) in the cerebrospinal fluid. *J. Neuroimmunol.* 29, 105–112.

Gao, W., Li, F., Zhou, Z., Xu, X., Wu, Y., Zhou, S., Yin, D., Sun, D., Xiong, J., Jiang, R., et al. (2017). IL-2/Anti-IL-2 Complex Attenuates Inflammation and BBB Disruption in Mice Subjected to Traumatic Brain Injury. *Frontiers in Neurology* 8.

Garceau, V., Smith, J., Paton, I.R., Davey, M., Fares, M.A., Sester, D.P., Burt, D.W., and Hume, D.A. (2010). Pivotal Advance: Avian colony-stimulating factor 1 (CSF-1), interleukin-34 (IL-34), and CSF-1 receptor genes and gene products. *J. Leukoc. Biol.* 87, 753–764.

Garcia, S., Hartkamp, L.M., Malvar-Fernandez, B., van Es, I.E., Lin, H., Wong, J., Long, L., Zanghi, J.A., Rankin, A.L., Masteller, E.L., et al. (2016). Colony-stimulating factor (CSF) 1 receptor blockade reduces inflammation in human and murine models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 18, 75.

Garnier, A.-S., Planchais, M., Riou, J., Jacquemin, C., Ordonez, L., Saint-André, J.-P., Croue, A., Saoudi, A., Delneste, Y., Devys, A., et al. (2019). Pre-transplant CD45RC expression on blood T cells differentiates patients with cancer and rejection after kidney transplantation. *PLOS ONE* 14, e0214321.

Gerngross, L., and Fischer, T. (2015). Evidence for cFMS signaling in HIV production by brain macrophages and microglia. *J. Neurovirol.* 21, 249–256.

Gerngross, L., Lehmicke, G., Belkadi, A., and Fischer, T. (2015). Role for cFMS in maintaining alternative macrophage polarization in SIV infection: implications for HIV neuropathogenesis. *Journal of Neuroinflammation* 12, 58.

Gershon, R.K., and Kondo, K. Cell Interactions in the Induction of Tolerance: The Role of Thymic Lymphocytes. 15.

Gershon, R.K., Cohen, P., Hencin, R., and Liebhaver, S.A. (1972). Suppressor T cells. *J. Immunol.* 108, 586–590.

Ginhoux, F., and Guilliams, M. (2016). Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity* 44, 439–449.

Ginhoux, F., and Jung, S. (2014). Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nature Reviews Immunology* 14, 392–404.

Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., et al. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330, 841–845.

Giricz, O., Mo, Y., Dahlman, K.B., Cotto-Rios, X.M., Vardabasso, C., Nguyen, H., Matusow, B., Bartenstein, M., Polishchuk, V., Johnson, D.B., et al. (2018). The RUNX1/IL-34/CSF-1R axis is an autocrinally regulated modulator of resistance to BRAF-V600E inhibition in melanoma. *JCI Insight* 3.

Glatigny, S., and Bettelli, E. (2018). Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) as Animal Models of Multiple Sclerosis (MS). *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 8, a028977.

Godin, I., and Cumano, A. (2002). The hare and the tortoise: an embryonic haematopoietic race. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 593–604.

Gomez Perdiguero, E., Klapproth, K., Schulz, C., Busch, K., Azzoni, E., Crozet, L., Garner, H., Trouillet, C., de Bruijn, M.F., Geissmann, F., et al. (2015). Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* 518, 547–551.

Gomez-Nicola, D., Fransen, N.L., Suzzi, S., and Perry, V.H. (2013). Regulation of Microglial Proliferation during Chronic Neurodegeneration. *Journal of Neuroscience* 33, 2481–2493.

Gondek, D.C., Lu, L.-F., Quezada, S.A., Sakaguchi, S., and Noelle, R.J. (2005). Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J. Immunol.* 174, 1783–1786.

González-Muniesa, P., Martínez-González, M.-A., Hu, F.B., Després, J.-P., Matsuzawa, Y., Loos, R.J.F., Moreno, L.A., Bray, G.A., and Martinez, J.A. (2017). Obesity. *Nat Rev Dis Primers* 3, 17034.

Gotot, J., Gottschalk, C., Leopold, S., Knolle, P.A., Yagita, H., Kurts, C., and Ludwig-Portugall, I. (2012). Regulatory T cells use programmed death 1 ligands to directly suppress autoreactive B cells in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 10468–10473.

Greenwell-Wild, T., Moutsopoulos, N.M., Gliozzi, M., Kapsogeorgou, E., Rangel, Z., Munson, P.J., Moutsopoulos, H.M., and Wahl, S.M. (2011). Chitinases in the salivary glands and circulation of patients with Sjögren's syndrome: macrophage harbingers of disease severity. *Arthritis Rheum.* 63, 3103–3115.

Gregori, S., and Roncarolo, M.G. (2018). Engineered T Regulatory Type 1 Cells for Clinical Application. *Front. Immunol.* 9.

Gregori, S., Tomasoni, D., Pacciani, V., Scirpoli, M., Battaglia, M., Magnani, C.F., Hauben, E., and Roncarolo, M.-G. (2010). Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway. *Blood* 116, 935–944.

Greter, M., Lelios, I., Pelczar, P., Hoeffel, G., Price, J., Leboeuf, M., Kündig, T.M., Frei, K., Ginhoux, F., Merad, M., et al. (2012). Stroma-Derived Interleukin-34 Controls the Development and Maintenance of Langerhans Cells and the Maintenance of Microglia. *Immunity* 37, 1050–1060.

Grohmann, U., Orabona, C., Fallarino, F., Vacca, C., Calcinaro, F., Falorni, A., Candeloro, P., Belladonna, M.L., Bianchi, R., Fioretti, M.C., et al. (2002). CTLA-4-Ig regulates tryptophan

catabolism in vivo. *Nat. Immunol.* *3*, 1097–1101.

Grossman, W.J., Verbsky, J.W., Barchet, W., Colonna, M., Atkinson, J.P., and Ley, T.J. (2004). Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* *21*, 589–601.

Gruber, M.F., Weih, K.A., Boone, E.J., Smith, P.D., and Clouse, K.A. (1995). Endogenous macrophage CSF production is associated with viral replication in HIV-1-infected human monocyte-derived macrophages. *J. Immunol.* *154*, 5528–5535.

Guillonnet, C., Hill, M., Hubert, F.-X., Chiffolleau, E., Hervé, C., Li, X.-L., Heslan, M., Usal, C., Tesson, L., Ménoret, S., et al. (2007a). CD40Ig treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN-gamma, and indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Clin. Invest.* *117*, 1096–1106.

Guillonnet, C., Hill, M., Hubert, F.-X., Chiffolleau, E., Hervé, C., Li, X.-L., Heslan, M., Usal, C., Tesson, L., Ménoret, S., et al. (2007b). CD40Ig treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN-gamma, and indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Clin. Invest.* *117*, 1096–1106.

Guillonnet, C., Bézie, S., and Anegon, I. (2017a). Immunoregulatory properties of the cytokine IL-34. *Cell. Mol. Life Sci.* *74*, 2569–2586.

Guillonnet, C., Bézie, S., and Anegon, I. (2017b). Immunoregulatory properties of the cytokine IL-34. *Cell. Mol. Life Sci.* *74*, 2569–2586.

Guillot, C., Guillonnet, C., Mathieu, P., Gerdes, C.A., Ménoret, S., Braudeau, C., Tesson, L., Renaudin, K., Castro, M.G., Löwenstein, P.R., et al. (2002). Prolonged blockade of CD40-CD40 ligand interactions by gene transfer of CD40Ig results in long-term heart allograft survival and donor-specific hyporesponsiveness, but does not prevent chronic rejection. *J. Immunol.* *168*, 1600–1609.

Gunnlaugsdottir, B., Maggadottir, S.M., Skaftadottir, I., and Ludviksson, B.R. (2013). The Ex Vivo Induction of Human CD103⁺ CD25^{hi} Foxp3⁺ CD4⁺ and CD8⁺ Tregs is IL-2 and TGF- β 1 Dependent. *Scandinavian Journal of Immunology* *77*, 125–134.

Guo, L., Bertola, D.R., Takanohashi, A., Saito, A., Segawa, Y., Yokota, T., Ishibashi, S., Nishida, Y., Yamamoto, G.L., Franco, J.F. da S., et al. (2019). Bi-allelic CSF1R Mutations Cause Skeletal Dysplasia of Dysosteosclerosis-Pyle Disease Spectrum and Degenerative Encephalopathy with Brain Malformation. *The American Journal of Human Genetics* *104*, 925–935.

Guruprasad, C.N., and Pradeep, A.R. (2018). Interleukin-34 levels in gingival crevicular fluid and plasma in periodontal health and disease with and without type-2 diabetes mellitus.

Journal of Investigative and Clinical Dentistry 9, e12317.

Hamilton, J.A. (2008). Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 8, 533–544.

Han, N., Baghdadi, M., Ishikawa, K., Endo, H., Kobayashi, T., Wada, H., Imafuku, K., Hata, H., and Seino, K. (2018). Enhanced IL-34 expression in Nivolumab-resistant metastatic melanoma. *Inflammation and Regeneration* 38, 3.

Hanna, R.N., Carlin, L.M., Hubbeling, H.G., Nackiewicz, D., Green, A.M., Punt, J.A., Geissmann, F., and Hedrick, C.C. (2011). The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and the survival of Ly6C⁻ monocytes. *Nat. Immunol.* 12, 778–785.

Hashimoto, D., Chow, A., Greter, M., Saenger, Y., Kwan, W.-H., Leboeuf, M., Ginhoux, F., Ochando, J.C., Kunisaki, Y., van Rooijen, N., et al. (2011). Pretransplant CSF-1 therapy expands recipient macrophages and ameliorates GVHD after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J. Exp. Med.* 208, 1069–1082.

Hausenloy, D.J., and Yellon, D.M. (2016). Ischaemic conditioning and reperfusion injury. *Nat Rev Cardiol* 13, 193–209.

Hermiston, M.L., Xu, Z., and Weiss, A. (2003). CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 107–137.

Hine, A.M., and Loke, P. (2019). Intestinal Macrophages in Resolving Inflammation. *The Journal of Immunology* 203, 593–599.

Hodge, J.M., Kirkland, M.A., and Nicholson, G.C. (2007). Multiple roles of M-CSF in human osteoclastogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry* 102, 759–768.

Hoeffel, G., Wang, Y., Greter, M., See, P., Teo, P., Malleret, B., Leboeuf, M., Low, D., Oller, G., Almeida, F., et al. (2012). Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *J. Exp. Med.* 209, 1167–1181.

Hoeffel, G., Chen, J., Lavin, Y., Low, D., Almeida, F.F., See, P., Beaudin, A.E., Lum, J., Low, I., Forsberg, E.C., et al. (2015). C-Myb(+) erythro-myeloid progenitor-derived fetal monocytes give rise to adult tissue-resident macrophages. *Immunity* 42, 665–678.

Hoffmann, P., Ermann, J., Edinger, M., Fathman, C.G., and Strober, S. (2002). Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J. Exp. Med.* 196, 389–399.

Horwitz, D.A., Zheng, S.G., and Gray, J.D. (2008). Natural and TGF-beta-induced Foxp3(+)CD4(+) CD25(+) regulatory T cells are not mirror images of each other. *Trends*

Immunol. 29, 429–435.

Hume, D.A., Pavli, P., Donahue, R.E., and Fidler, I.J. (1988). The effect of human recombinant macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) on the murine mononuclear phagocyte system in vivo. *J. Immunol.* 141, 3405–3409.

Hume, D.A., Irvine, K.M., and Pridans, C. (2019). The Mononuclear Phagocyte System: The Relationship between Monocytes and Macrophages. *Trends in Immunology* 40, 98–112.

Huynh, D., Dai, X.-M., Nandi, S., Lightowler, S., Trivett, M., Chan, C.-K., Bertoncello, I., Ramsay, R.G., and Stanley, E.R. (2009). Colony stimulating factor-1 dependence of paneth cell development in the mouse small intestine. *Gastroenterology* 137, 136–144, 144.e1-3.

Huynh, D., Akçora, D., Malaterre, J., Chan, C.K., Dai, X.-M., Bertoncello, I., Stanley, E.R., and Ramsay, R.G. (2013). CSF-1 Receptor-Dependent Colon Development, Homeostasis and Inflammatory Stress Response. *PLoS One* 8.

Hwang, S.-J., Choi, B., Kang, S.-S., Chang, J.-H., Kim, Y.-G., Chung, Y.-H., Sohn, D.H., So, M.W., Lee, C.-K., Robinson, W.H., et al. (2012). Interleukin-34 produced by human fibroblast-like synovial cells in rheumatoid arthritis supports osteoclastogenesis. *Arthritis Res. Ther.* 14, R14.

Ingersoll, M.A., Spanbroek, R., Lottaz, C., Gautier, E.L., Frankenberger, M., Hoffmann, R., Lang, R., Haniffa, M., Collin, M., Tacke, F., et al. (2010). Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood* 115, e10-19.

Isaacs, A., and Lindenmann, J. (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 147, 258–267.

Italiani, P., and Boraschi, D. (2014). From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front Immunol* 5, 514.

Ito, M., Hiramatsu, H., Kobayashi, K., Suzue, K., Kawahata, M., Hioki, K., Ueyama, Y., Koyanagi, Y., Sugamura, K., Tsuji, K., et al. (2002). NOD/SCID/ γ cnul mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* 100, 3175–3182.

Jakubzick, C., Gautier, E.L., Gibbings, S.L., Sojka, D.K., Schlitzer, A., Johnson, T.E., Ivanov, S., Duan, Q., Bala, S., Condon, T., et al. (2013). Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. *Immunity* 39, 599–610.

James, B.D., and Bennett, D.A. (2019). Causes and Patterns of Dementia: An Update in the Era of Redefining Alzheimer's Disease. *Annual Review of Public Health* 40, 65–84.

Jin, S., Sonobe, Y., Kawanokuchi, J., Horiuchi, H., Cheng, Y., Wang, Y., Mizuno, T., Takeuchi, H., and Suzumura, A. (2014). Interleukin-34 Restores Blood–Brain Barrier

Integrity by Upregulating Tight Junction Proteins in Endothelial Cells. *PLoS One* 9.

Jordan, M.S., Boesteanu, A., Reed, A.J., Petrone, A.L., Holenbeck, A.E., Lerman, M.A., Naji, A., and Caton, A.J. (2001). Thymic selection of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat. Immunol.* 2, 301–306.

Jose, M.D., Le Meur, Y., Atkins, R.C., and Chadban, S.J. (2003). Blockade of macrophage colony-stimulating factor reduces macrophage proliferation and accumulation in renal allograft rejection. *Am. J. Transplant.* 3, 294–300.

Kacinski, B.M. (1995). CSF-1 and its receptor in ovarian, endometrial and breast cancer. *Ann. Med.* 27, 79–85.

Kana, V., Desland, F.A., Casanova-Acebes, M., Ayata, P., Badimon, A., Nabel, E., Yamamuro, K., Sneeboer, M., Tan, I.-L., Flanigan, M.E., et al. (2019a). CSF-1 controls cerebellar microglia and is required for motor function and social interaction. *J. Exp. Med.*

Kana, V., Desland, F.A., Casanova-Acebes, M., Ayata, P., Badimon, A., Nabel, E., Yamamuro, K., Sneeboer, M., Tan, I.-L., Flanigan, M.E., et al. (2019b). CSF-1 controls cerebellar microglia and is required for motor function and social interaction. *J. Exp. Med.* 216, 2265–2281.

Kanamori, M., Nakatsukasa, H., Okada, M., Lu, Q., and Yoshimura, A. (2016). Induced Regulatory T Cells: Their Development, Stability, and Applications. *Trends in Immunology* 37, 803–811.

Kärner, J., Meager, A., Laan, M., Maslovskaja, J., Pihlap, M., Remm, A., Juronen, E., Wolff, A.S.B., Husebye, E.S., Podkrajšek, K.T., et al. (2013). Anti-cytokine autoantibodies suggest pathogenetic links with autoimmune regulator deficiency in humans and mice: Anti-cytokine autoantibodies in mice and humans. *Clin Exp Immunol* 171, 263–272.

Kaul, A., Gordon, C., Crow, M.K., Touma, Z., Urowitz, M.B., van Vollenhoven, R., Ruiz-Irastorza, G., and Hughes, G. (2016). Systemic lupus erythematosus. *Nature Reviews Disease Primers* 2.

Kawabe, M., Ohyama, H., Kato-Kogoe, N., Yamada, N., Yamanegi, K., Nishiura, H., Hirano, H., Kishimoto, H., and Nakasho, K. (2015). Expression of interleukin-34 and colony stimulating factor-1 in the stimulated periodontal ligament cells with tumor necrosis factor- α . *Medical Molecular Morphology* 48, 169–176.

Khoshnan, A., Ko, J., Watkin, E.E., Paige, L.A., Reinhart, P.H., and Patterson, P.H. (2004). Activation of the IkappaB kinase complex and nuclear factor-kappaB contributes to mutant huntingtin neurotoxicity. *J. Neurosci.* 24, 7999–8008.

Khoshnan, A., Sabbaugh, A., Calamini, B., Marinero, S.A., Dunn, D.E., Yoo, J.H., Ko, J., Lo,

D.C., and Patterson, P.H. (2017). IKK β and mutant huntingtin interactions regulate the expression of IL-34: implications for microglial-mediated neurodegeneration in HD. *Hum Mol Genet* 26, 4267–4277.

Kiesler, P., Fuss, I.J., and Strober, W. (2015). Experimental Models of Inflammatory Bowel Diseases. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 1, 154–170.

Koch, S.D., Uss, E., van Lier, R.A.W., and ten Berge, I.J.M. (2008). Alloantigen-induced regulatory CD8+CD103+ T cells. *Hum. Immunol.* 69, 737–744.

Koenecke, C., Lee, C.-W., Thamm, K., Föhse, L., Schafferus, M., Mittrücker, H.-W., Floess, S., Huehn, J., Ganser, A., Förster, R., et al. (2012). IFN- γ Production by Allogeneic Foxp3+ Regulatory T Cells Is Essential for Preventing Experimental Graft-versus-Host Disease. *The Journal of Immunology* 189, 2890–2896.

Kohm, A.P., Carpentier, P.A., Anger, H.A., and Miller, S.D. (2002). Cutting Edge: CD4⁺ CD25⁺ Regulatory T Cells Suppress Antigen-Specific Autoreactive Immune Responses and Central Nervous System Inflammation During Active Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol* 169, 4712–4716.

Kotlarz, A., Tukaj, S., Krzewski, K., Brycka, E., and Lipinska, B. (2013). Human Hsp40 proteins, DNAJA1 and DNAJA2, as potential targets of the immune response triggered by bacterial DnaJ in rheumatoid arthritis. *Cell Stress Chaperones* 18, 653–659.

Kotoh, K., Enjoji, M., Kato, M., Kohjima, M., Nakamuta, M., and Takayanagi, R. (2008). A new parameter using serum lactate dehydrogenase and alanine aminotransferase level is useful for predicting the prognosis of patients at an early stage of acute liver injury: A retrospective study. *Comp Hepatol* 7, 6.

Kraya, T., Quandt, D., Pfirrmann, T., Kindermann, A., Lampe, L., Schroeter, M.L., Kohlhasse, J., Stoevesandt, D., Hoffmann, K., and Villavicencio-Lorini, P. (2019). Functional characterization of a novel *CSF1R* mutation causing hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* 7, e00595.

Kresse, H., and Schönherr, E. (2001). Proteoglycans of the extracellular matrix and growth control. *J. Cell. Physiol.* 189, 266–274.

Kühn, R., Löhler, J., Rennick, D., Rajewsky, K., and Müller, W. (1993). Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75, 263–274.

Kurowska-Stolarska, M., Stolarski, B., Kewin, P., Murphy, G., Corrigan, C.J., Ying, S., Pitman, N., Mirchandani, A., Rana, B., van Rooijen, N., et al. (2009). IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. *J. Immunol.* 183, 6469–6477.

Kuzumi, A., Yoshizaki, A., Toyama, S., Fukasawa, T., Ebata, S., Nakamura, K., Yamashita, T., Saigusa, R., Miura, S., Hirabayashi, M., et al. (2018). Serum interleukin-34 levels in patients with systemic sclerosis: Clinical association with interstitial lung disease. *J. Dermatol.* *45*, 1216–1220.

La Rocca, C., Carbone, F., Longobardi, S., and Matarese, G. (2014). The immunology of pregnancy: Regulatory T cells control maternal immune tolerance toward the fetus. *Immunology Letters* *162*, 41–48.

Lassmann, H., and Bradl, M. (2017). Multiple sclerosis: experimental models and reality. *Acta Neuropathologica* *133*, 223–244.

Le Meur, Y., Leprivey-Lorgeot, V., Mons, S., José, M., Dantal, J., Lemauff, B., Aldigier, J.-C., Leroux-Robert, C., and Praloran, V. (2004). Serum levels of macrophage-colony stimulating factor (M-CSF): a marker of kidney allograft rejection. *Nephrol. Dial. Transplant.* *19*, 1862–1865.

Le Texier, L., Thebault, P., Carvalho-Gaspar, M., Vignard, V., Merieau, E., Usal, C., Cuturi, M.-C., Wood, K.J., and Chiffolleau, E. (2012). Immunoregulatory function of IL-27 and TGF- β 1 in cardiac allograft transplantation. *Transplantation* *94*, 226–233.

Lee, S., Huen, S., Nishio, H., Nishio, S., Lee, H.K., Choi, B.-S., Ruhrberg, C., and Cantley, L.G. (2011). Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair. *J. Am. Soc. Nephrol.* *22*, 317–326.

Lee, Y.-H., Ishida, Y., Rifa'i, M., Shi, Z., Isobe, K., and Suzuki, H. (2008). Essential role of CD8+CD122+ regulatory T cells in the recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* *180*, 825–832.

Leeuwenberg, J.F., Van Damme, J., Meager, T., Jeunhomme, T.M., and Buurman, W.A. (1988). Effects of tumor necrosis factor on the interferon-gamma-induced major histocompatibility complex class II antigen expression by human endothelial cells. *Eur. J. Immunol.* *18*, 1469–1472.

Lenda, D.M., Stanley, E.R., and Kelley, V.R. (2004). Negative role of colony-stimulating factor-1 in macrophage, T cell, and B cell mediated autoimmune disease in MRL-Fas(lpr) mice. *J. Immunol.* *173*, 4744–4754.

Leon, L.R., Kozak, W., and Kluger, M.J. (1998). Role of IL-10 in Inflammation: Studies Using Cytokine Knockout Mice. *Annals of the New York Academy of Sciences* *856*, 69–75.

Leonard, E.P., Cotton, W.R., and Keene, H.J. (1974). Morphological and histochemical observations on the lack of osteoclasts in the “tl” strain of rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* *147*, 596–598.

- Li, Q., and Barres, B.A. (2018). Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nat. Rev. Immunol.* *18*, 225–242.
- Li, J., Chen, K., Zhu, L., and Pollard, J.W. (2006). Conditional deletion of the colony stimulating factor-1 receptor (c-fms proto-oncogene) in mice. *Genesis* *44*, 328–335.
- Li, J., Liu, L., Rui, W., Li, X., Xuan, D., Zheng, S., Yu, Y., Zhang, J., Kong, N., Zhu, X., et al. (2017). New Interleukins in Psoriasis and Psoriatic Arthritis Patients: The Possible Roles of Interleukin-33 to Interleukin-38 in Disease Activities and Bone Erosions. *DRM* *233*, 37–46.
- Li, N., Jiang, L., Cai, Y., Liu, J.Y., Zhao, T., Kong, N., Yu, Y., Xuan, D.D., Zou, H., Xue, Y., et al. (2019). The correlation between interleukin-34 and bone erosion under ultrasound in rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 1–7.
- Li, X.L., Ménoret, S., Bezie, S., Caron, L., Chabannes, D., Hill, M., Halary, F., Angin, M., Heslan, M., Usal, C., et al. (2010). Mechanism and localization of CD8 regulatory T cells in a heart transplant model of tolerance. *J. Immunol.* *185*, 823–833.
- Li, Z., Jin, D., Wu, Y., Zhang, K., Hu, P., Cao, X., and Chen, Z. (2012). Increased Serum Interleukin-34 in Patients with Coronary Artery Disease. *J Int Med Res* *40*, 1866–1870.
- Liang, B., Workman, C., Lee, J., Chew, C., Dale, B.M., Colonna, L., Flores, M., Li, N., Schweighoffer, E., Greenberg, S., et al. (2008). Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J. Immunol.* *180*, 5916–5926.
- Liang, Y., Pan, H.-F., and Ye, D.-Q. (2015). Tc17 Cells in Immunity and Systemic Autoimmunity. *Int. Rev. Immunol.* *34*, 318–331.
- Liao, L.-N., Chen, C.-C., Wu, F.-Y., Lin, C.-C., Hsiao, J.-H., Chang, C.-T., Kardia, S.L., Li, T.-C., and Tsai, F.-J. (2014). Identified single-nucleotide polymorphisms and haplotypes at 16q22.1 increase diabetic nephropathy risk in Han Chinese population. *BMC Genetics* *15*, 113.
- Lin, E.Y., Nguyen, A.V., Russell, R.G., and Pollard, J.W. (2001). Colony-Stimulating Factor 1 Promotes Progression of Mammary Tumors to Malignancy. *J Exp Med* *193*, 727–740.
- Lin, H., Lee, E., Hestir, K., Leo, C., Huang, M., Bosch, E., Halenbeck, R., Wu, G., Zhou, A., Behrens, D., et al. (2008). Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome. *Science* *320*, 807–811.
- Lin, S.-C., Chen, K.-H., Lin, C.-H., Kuo, C.-C., Ling, Q.-D., and Chan, C.-H. (2007). The quantitative analysis of peripheral blood FOXP3-expressing T cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients. *Eur. J. Clin. Invest.* *37*, 987–996.
- Lin, W., Xu, D., Austin, C.D., Caplazi, P., Senger, K., Sun, Y., Jeet, S., Young, J., Delarosa,

- D., Suto, E., et al. (2019). Function of CSF1 and IL34 in Macrophage Homeostasis, Inflammation, and Cancer. *Frontiers in Immunology* 10.
- Lin, X., Luo, H., Yan, X., Song, Z., Gao, X., Xia, Y., Zhang, L., Yin, Y., and Cao, J. (2018a). Interleukin-34 Ameliorates Survival and Bacterial Clearance in Polymicrobial Sepsis*: *Critical Care Medicine* 46, e584–e590.
- Lin, X., Luo, H., Yan, X., Song, Z., Gao, X., Xia, Y., Zhang, L., Yin, Y., and Cao, J. (2018b). Interleukin-34 Ameliorates Survival and Bacterial Clearance in Polymicrobial Sepsis*: *Critical Care Medicine* 46, e584–e590.
- Lindau, R., Mehta, R.B., Lash, G.E., Papapavlou, G., Boij, R., Berg, G., Jenmalm, M.C., Ernerudh, J., and Svensson-Arvelund, J. (2018). Interleukin-34 is present at the fetal-maternal interface and induces immunoregulatory macrophages of a decidual phenotype in vitro. *Hum. Reprod.* 33, 588–599.
- Liu, S., and Cheng, C. (2013). Alternative RNA splicing and cancer: Alternative RNA splicing and cancer. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 4, 547–566.
- Liu, H., Leo, C., Chen, X., Wong, B.R., Williams, L.T., Lin, H., and He, X. (2012). The mechanism of shared but distinct CSF-1R signaling by the non-homologous cytokines IL-34 and CSF-1. *Biochim. Biophys. Acta* 1824, 938–945.
- Liu, L.-T., Lang, Z.-F., Li, Y., Zhu, Y.-J., Zhang, J.-T., Guo, S.-F., Wang, J.-X., Wang, H.-W., and Xu, Y.-D. (2013). Composition and characteristics of distinct macrophage subpopulations in the mouse thymus. *Molecular Medicine Reports* 7, 1850–1854.
- Liu, Q., Fan, J., Bai, J., Peng, L., Zhang, T., Deng, L., Wang, G., Zhao, Y., Nong, J., Zhang, M., et al. (2018). IL-34 promotes foam cell formation by enhancing CD36 expression through p38 MAPK pathway. *Sci Rep* 8, 17347.
- Liu, W., Putnam, A.L., Xu-Yu, Z., Szot, G.L., Lee, M.R., Zhu, S., Gottlieb, P.A., Kapranov, P., Gingeras, T.R., Fazekas de St Groth, B., et al. (2006). CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J. Exp. Med.* 203, 1701–1711.
- Long, X., Cheng, Q., Liang, H., Zhao, J., Wang, J., Wang, W., Tomlinson, S., Chen, L., Atkinson, C., Zhang, B., et al. (2017). Memory CD4+ T cells are suppressed by CD8+ regulatory T cells in vitro and in vivo. *Am J Transl Res* 9, 63–78.
- Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15, 550.
- Luo, J., Elwood, F., Britschgi, M., Villeda, S., Zhang, H., Ding, Z., Zhu, L., Alabsi, H., Getachew, R., Narasimhan, R., et al. (2013a). Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R)

signaling in injured neurons facilitates protection and survival. *Journal of Experimental Medicine* 210, 157–172.

Luo, J., Elwood, F., Britschgi, M., Villeda, S., Zhang, H., Ding, Z., Zhu, L., Alabsi, H., Getachew, R., Narasimhan, R., et al. (2013b). Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) signaling in injured neurons facilitates protection and survival. *J. Exp. Med.* 210, 157–172.

Lu'o'ng, K.V.Q., and Nguyen, L.T.H. (2013). The role of vitamin D in Alzheimer's disease: possible genetic and cell signaling mechanisms. *Am J Alzheimers Dis Other Demen* 28, 126–136.

Ma, D., Doi, Y., Jin, S., Li, E., Sonobe, Y., Takeuchi, H., Mizuno, T., and Suzumura, A. (2012a). TGF- β induced by interleukin-34-stimulated microglia regulates microglial proliferation and attenuates oligomeric amyloid β neurotoxicity. *Neuroscience Letters* 529, 86–91.

Ma, D., Doi, Y., Jin, S., Li, E., Sonobe, Y., Takeuchi, H., Mizuno, T., and Suzumura, A. (2012b). TGF- β induced by interleukin-34-stimulated microglia regulates microglial proliferation and attenuates oligomeric amyloid β neurotoxicity. *Neurosci. Lett.* 529, 86–91.

Ma, N., Qu, L., Xu, L.Y., Yu, Y.Q., and Qiu, L.H. (2016a). [Expression of IL-34 in chronic periapical lesions and its clinical significance]. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue* 25, 53–57.

Ma, Q., Garber, H.R., Lu, S., He, H., Tallis, E., Ding, X., Sergeeva, A., Wood, M.S., Dotti, G., Salvado, B., et al. (2016b). A novel TCR-like CAR with specificity for PR1/HLA-A2 effectively targets myeloid leukemia in vitro when expressed in human adult peripheral blood and cord blood T cells. *Cytotherapy* 18, 985–994.

Ma, X., Lin, W.Y., Chen, Y., Stawicki, S., Mukhyala, K., Wu, Y., Martin, F., Bazan, J.F., and Starovasnik, M.A. (2012c). Structural basis for the dual recognition of helical cytokines IL-34 and CSF-1 by CSF-1R. *Structure* 20, 676–687.

MacDonald, K.G., Hoeppli, R.E., Huang, Q., Gillies, J., Luciani, D.S., Orban, P.C., Broady, R., and Levings, M.K. (2016). Alloantigen-specific regulatory T cells generated with a chimeric antigen receptor. *Journal of Clinical Investigation* 126, 1413–1424.

MacDonald, K.P.A., Rowe, V., Bofinger, H.M., Thomas, R., Sasmono, T., Hume, D.A., and Hill, G.R. (2005). The colony-stimulating factor 1 receptor is expressed on dendritic cells during differentiation and regulates their expansion. *J. Immunol.* 175, 1399–1405.

Magnani, C.F., Alberigo, G., Bacchetta, R., Serafini, G., Andreani, M., Roncarolo, M.G., and Gregori, S. (2011). Killing of myeloid APCs via HLA class I, CD2 and CD226 defines a novel mechanism of suppression by human Tr1 cells. *Eur. J. Immunol.* 41, 1652–1662.

Mangalam, A.K., Luckey, D., Giri, S., Smart, M., Pease, L.R., Rodriguez, M., and David,

C.S. (2012). Two discreet subsets of CD8 T cells modulate PLP(91-110) induced experimental autoimmune encephalomyelitis in HLA-DR3 transgenic mice. *J. Autoimmun.* 38, 344–353.

Manoussakis, M.N., and Kapsogeorgou, E.K. (2010). The role of intrinsic epithelial activation in the pathogenesis of Sjögren’s syndrome. *J. Autoimmun.* 35, 219–224.

Manoussakis, M.N., Boiu, S., Korkolopoulou, P., Kapsogeorgou, E.K., Kavantzias, N., Ziakas, P., Patsouris, E., and Moutsopoulos, H.M. (2007). Rates of infiltration by macrophages and dendritic cells and expression of interleukin-18 and interleukin-12 in the chronic inflammatory lesions of Sjögren’s syndrome: correlation with certain features of immune hyperactivity and factors associated with high risk of lymphoma development. *Arthritis Rheum.* 56, 3977–3988.

Manto, M., Bower, J.M., Conforto, A.B., Delgado-García, J.M., da Guarda, S.N.F., Gerwig, M., Habas, C., Hagura, N., Ivry, R.B., Mariën, P., et al. (2012). Consensus Paper: Roles of the Cerebellum in Motor Control—The Diversity of Ideas on Cerebellar Involvement in Movement. *Cerebellum* 11, 457–487.

Marks, S.C., and Lane, P.W. (1976). Osteopetrosis, a new recessive skeletal mutation on chromosome 12 of the mouse. *J. Hered.* 67, 11–18.

Marks, S.C., Iizuka, T., MacKay, C.A., Mason-Savas, A., and Cielinski, M.J. (1997). The effects of colony-stimulating factor-1 on the number and ultrastructure of osteoclasts in toothless (tl) rats and osteopetrotic (op) mice. *Tissue Cell* 29, 589–595.

Martinez, G.L., Majster, M., Bjurshammar, N., Johannsen, A., Figueredo, C.M., and Boström, E.A. (2017). Salivary Colony Stimulating Factor-1 and Interleukin-34 in Periodontal Disease. *J. Periodontol.* 88, e140–e149.

Martínez-Llordella, M., Puig-Pey, I., Orlando, G., Ramoni, M., Tisone, G., Rimola, A., Lerut, J., Latinne, D., Margarit, C., Bilbao, I., et al. (2007). Multiparameter Immune Profiling of Operational Tolerance in Liver Transplantation. *American Journal of Transplantation* 7, 309–319.

Masoumi, A., Goldenson, B., Ghirmai, S., Avagyan, H., Zaghi, J., Abel, K., Zheng, X., Espinosa-Jeffrey, A., Mahanian, M., Liu, P.T., et al. (2009). 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 interacts with curcuminoids to stimulate amyloid-beta clearance by macrophages of Alzheimer’s disease patients. *J. Alzheimers Dis.* 17, 703–717.

Matsuda, M., Shikata, K., Makino, H., Sugimoto, H., and Ota, Z. (1996). Glomerular expression of macrophage colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with various forms of glomerulonephritis. *Lab. Invest.* 75, 403–

- McColgan, P., and Tabrizi, S.J. (2018). Huntington's disease: a clinical review. *European Journal of Neurology* 25, 24–34.
- McGrath, K.E., Frame, J.M., Fegan, K.H., Bowen, J.R., Conway, S.J., Catherman, S.C., Kingsley, P.D., Koniski, A.D., and Palis, J. (2015). Distinct Sources of Hematopoietic Progenitors Emerge before HSCs and Provide Functional Blood Cells in the Mammalian Embryo. *Cell Rep* 11, 1892–1904.
- Menke, J., Iwata, Y., Rabacal, W.A., Basu, R., Yeung, Y.G., Humphreys, B.D., Wada, T., Schwarting, A., Stanley, E.R., and Kelley, V.R. (2009a). CSF-1 signals directly to renal tubular epithelial cells to mediate repair in mice. *J. Clin. Invest.* 119, 2330–2342.
- Menke, J., Rabacal, W.A., Byrne, K.T., Iwata, Y., Schwartz, M.M., Stanley, E.R., Schwarting, A., and Kelley, V.R. (2009b). Circulating CSF-1 promotes monocyte and macrophage phenotypes that enhance lupus nephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20, 2581–2592.
- Menke, J., Amann, K., Cavagna, L., Blettner, M., Weinmann, A., Schwarting, A., and Kelley, V.R. (2015). Colony-stimulating factor-1: a potential biomarker for lupus nephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 26, 379–389.
- Ménoret, S., De Cian, A., Tesson, L., Remy, S., Usal, C., Boulé, J.-B., Boix, C., Fontanière, S., Crénéguy, A., Nguyen, T.H., et al. (2015). Homology-directed repair in rodent zygotes using Cas9 and TALEN engineered proteins. *Scientific Reports* 5.
- Ménoret, S., Ouisse, L.-H., Tesson, L., Delbos, F., Garnier, D., Remy, S., Usal, C., Concordet, J.-P., Giovannangeli, C., Chenouard, V., et al. (2018). Generation of Immunodeficient Rats With Rag1 and Il2rg Gene Deletions and Human Tissue Grafting Models: Transplantation 102, 1271–1278.
- Metcalf, D. (2013). The Colony-Stimulating Factors and Cancer. *Cancer Immunol Res* 1, 351–356.
- Metra, M., and Teerlink, J.R. (2017). Heart failure. *The Lancet* 390, 1981–1995.
- Misharin, A.V., Cuda, C.M., Saber, R., Turner, J.D., Gierut, A.K., Haines, G.K., Berdnikovs, S., Filer, A., Clark, A.R., Buckley, C.D., et al. (2014). Nonclassical Ly6C(-) monocytes drive the development of inflammatory arthritis in mice. *Cell Rep* 9, 591–604.
- Misra, N., Bayry, J., Lacroix-Desmazes, S., Kazatchkine, M.D., and Kaveri, S.V. (2004). Cutting Edge: Human CD4+CD25+ T Cells Restrain the Maturation and Antigen-Presenting Function of Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* 172, 4676–4680.
- Miyara, M., Yoshioka, Y., Kitoh, A., Shima, T., Wing, K., Niwa, A., Parizot, C., Taflin, C., Heike, T., Valeyre, D., et al. (2009). Functional delineation and differentiation dynamics of

human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 30, 899–911.

Miyara, M., Gorochov, G., Ehrenstein, M., Musset, L., Sakaguchi, S., and Amoura, Z. (2011). Human FoxP3⁺ regulatory T cells in systemic autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 10, 744–755.

Mizuno, T., Doi, Y., Mizoguchi, H., Jin, S., Noda, M., Sonobe, Y., Takeuchi, H., and Suzumura, A. (2011a). Interleukin-34 Selectively Enhances the Neuroprotective Effects of Microglia to Attenuate Oligomeric Amyloid- β Neurotoxicity. *The American Journal of Pathology* 179, 2016–2027.

Mizuno, T., Doi, Y., Mizoguchi, H., Jin, S., Noda, M., Sonobe, Y., Takeuchi, H., and Suzumura, A. (2011b). Interleukin-34 Selectively Enhances the Neuroprotective Effects of Microglia to Attenuate Oligomeric Amyloid- β Neurotoxicity. *The American Journal of Pathology* 179, 2016–2027.

Mizwicki, M.T., Menegaz, D., Zhang, J., Barrientos-Durán, A., Tse, S., Cashman, J.R., Griffin, P.R., and Fiala, M. (2012). Genomic and nongenomic signaling induced by 1 α ,25(OH)₂-vitamin D₃ promotes the recovery of amyloid- β phagocytosis by Alzheimer's disease macrophages. *J. Alzheimers Dis.* 29, 51–62.

Moon, S.-J., Hong, Y.-S., Ju, J.H., Kwok, S.-K., Park, S.-H., and Min, J.-K. (2013). Increased Levels of Interleukin 34 in Serum and Synovial Fluid Are Associated with Rheumatoid Factor and Anticyclic Citrullinated Peptide Antibody Titers in Patients with Rheumatoid Arthritis. *The Journal of Rheumatology* 40, 1842–1849.

Moore, M.J., Blachere, N.E., Fak, J.J., Park, C.Y., Sawicka, K., Parveen, S., Zucker-Scharff, I., Moltedo, B., Rudensky, A.Y., and Darnell, R.B. (2018). ZFP36 RNA-binding proteins restrain T cell activation and anti-viral immunity. *ELife* 7.

Morikawa, H., and Sakaguchi, S. (2014). Genetic and epigenetic basis of Treg cell development and function: from a FoxP3-centered view to an epigenome-defined view of natural Treg cells. *Immunol Rev* 259, 192–205.

Morris, G.P., Beck, P.L., Herridge, M.S., Depew, W.T., Szewczuk, M.R., and Wallace, J.L. (1989). Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 96, 795–803.

Möttönen, M., Heikkinen, J., Mustonen, L., Isomäki, P., Luukkainen, R., and Lassila, O. (2005). CD4⁺ CD25⁺ T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* 140, 360–367.

Mowat, A.McI. (2018). To respond or not to respond — a personal perspective of intestinal

tolerance. *Nature Reviews Immunology* 18, 405–415.

Mühl, H., and Pfeilschifter, J. (2003). Anti-inflammatory properties of pro-inflammatory interferon- γ . *International Immunopharmacology* 3, 1247–1255.

Munn, D.H., Garnick, M.B., and Cheung, N.K. (1990). Effects of parenteral recombinant human macrophage colony-stimulating factor on monocyte number, phenotype, and antitumor cytotoxicity in nonhuman primates. *Blood* 75, 2042–2048.

Murakami-Satsutani, N., Ito, T., Nakanishi, T., Inagaki, N., Tanaka, A., Vien, P.T.X., Kibata, K., Inaba, M., and Nomura, S. (2014). IL-33 promotes the induction and maintenance of Th2 immune responses by enhancing the function of OX40 ligand. *Allergol Int* 63, 443–455.

Murray, P.J. (2017). Macrophage Polarization. *Annu. Rev. Physiol.* 79, 541–566.

Murray, P.J., Allen, J.E., Biswas, S.K., Fisher, E.A., Gilroy, D.W., Goerdt, S., Gordon, S., Hamilton, J.A., Ivashkiv, L.B., Lawrence, T., et al. (2014). Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* 41, 14–20.

Mutis, T., van Rijn, R.S., Simonetti, E.R., Aarts-Riemens, T., Emmelot, M.E., van Bloois, L., Martens, A., Verdonck, L.F., and Ebeling, S.B. (2006). Human Regulatory T Cells Control Xenogeneic Graft-versus-Host Disease Induced by Autologous T Cells in RAG2^{-/-} c^{-/-} Immunodeficient Mice. *Clinical Cancer Research* 12, 5520–5525.

Nakamura, K., Kitani, A., and Strober, W. (2001). Cell Contact–Dependent Immunosuppression by Cd4⁺ Cd25⁺ Regulatory T Cells Is Mediated by Cell Surface–Bound Transforming Growth Factor β . *The Journal of Experimental Medicine* 194, 629–644.

Nakayama, W., Jinnin, M., Makino, K., Kajihara, I., Makino, T., Fukushima, S., Inoue, Y., and Ihn, H. (2012). Serum levels of soluble CD163 in patients with systemic sclerosis. *Rheumatol. Int.* 32, 403–407.

Nandi, S., Gokhan, S., Dai, X.-M., Wei, S., Enikolopov, G., Lin, H., Mehler, M.F., and Stanley, E.R. (2012). The CSF-1 receptor ligands IL-34 and CSF-1 exhibit distinct developmental brain expression patterns and regulate neural progenitor cell maintenance and maturation. *Dev. Biol.* 367, 100–113.

Nandi, S., Cioce, M., Yeung, Y.-G., Nieves, E., Tesfa, L., Lin, H., Hsu, A.W., Halenbeck, R., Cheng, H.-Y., Gokhan, S., et al. (2013). Receptor-type protein-tyrosine phosphatase ζ is a functional receptor for interleukin-34. *J. Biol. Chem.* 288, 21972–21986.

Nankivell, B.J., Borrows, R.J., Fung, C.L.-S., O’Connell, P.J., Allen, R.D.M., and Chapman, J.R. (2003). The Natural History of Chronic Allograft Nephropathy. *N Engl J Med* 349, 2326–2333.

Narasimhan, P.B., Marcovecchio, P., Hamers, A.A.J., and Hedrick, C.C. (2019). Nonclassical

Monocytes in Health and Disease. *Annual Review of Immunology* 37, 439–456.

Nathan, C.F., Murray, H.W., Wiebe, M.E., and Rubin, B.Y. (1983). Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J. Exp. Med.* 158, 670–689.

Ndisang, J.F., Vannacci, A., and Rastogi, S. (2017). Insulin Resistance, Type 1 and Type 2 Diabetes, and Related Complications 2017. *Journal of Diabetes Research* 2017, 1–3.

Niida, S., Kaku, M., Amano, H., Yoshida, H., Kataoka, H., Nishikawa, S., Tanne, K., Maeda, N., Nishikawa, S., and Kodama, H. (1999). Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony-stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption. *J. Exp. Med.* 190, 293–298.

Nishina, T., Naomoto, Y., Gouchi, A., Gunduz, M., Shirakawa, Y., Nobuhisa, T., Motoki, T., Kusaka, S., Haisa, M., Matsuoka, J., et al. (2004). Macrophage colony-stimulating factor inhibits tumor necrosis factor production and prolongs skin graft survival. *Transplantation* 77, 456–459.

Noble, A., Pestano, G.A., and Cantor, H. (1998). Suppression of immune responses by CD8 cells. I. Superantigen-activated CD8 cells induce unidirectional Fas-mediated apoptosis of antigen-activated CD4 cells. *J. Immunol.* 160, 559–565.

Noda, Y., Kawaguchi, T., Korenaga, M., Yoshio, S., Komukai, S., Nakano, M., Niizeki, T., Koga, H., Kawaguchi, A., Kanto, T., et al. (2019). High serum interleukin-34 level is a predictor of poor prognosis in patients with non-viral hepatocellular carcinoma. *Hepatol. Res.*

Noy, R., and Pollard, J.W. (2014). Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity* 41, 49–61.

Noyan, F., Zimmermann, K., Hardtke-Wolenski, M., Knoefel, A., Schulde, E., Geffers, R., Hust, M., Huehn, J., Galla, M., Morgan, M., et al. (2017). Prevention of Allograft Rejection by Use of Regulatory T Cells With an MHC-Specific Chimeric Antigen Receptor. *American Journal of Transplantation* 17, 917–930.

Nurieva, R.I., Chung, Y., Hwang, D., Yang, X.O., Kang, H.S., Ma, L., Wang, Y., Watowich, S.S., Jetten, A.M., Tian, Q., et al. (2008). Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity* 29, 138–149.

O’Koren, E.G., Yu, C., Klingeborn, M., Wong, A.Y.W., Prigge, C.L., Mathew, R., Kalnitsky, J., Msallam, R.A., Silvin, A., Kay, J.N., et al. (2019). Microglial Function Is Distinct in Different Anatomical Locations during Retinal Homeostasis and Degeneration. *Immunity* 50, 723-737.e7.

Oosterhof, N., Chang, I.J., Karimiani, E.G., Kuil, L.E., Jensen, D.M., Daza, R., Young, E.,

Astle, L., van der Linde, H.C., Shivaram, G.M., et al. (2019). Homozygous Mutations in CSF1R Cause a Pediatric-Onset Leukoencephalopathy and Can Result in Congenital Absence of Microglia. *The American Journal of Human Genetics* *104*, 936–947.

Ordonez, L., Bernard, I., L’Faqihi-Olive, F.-E., Tervaert, J.W.C., Damoiseaux, J., and Saoudi, A. (2009). CD45RC Isoform Expression Identifies Functionally Distinct T Cell Subsets Differentially Distributed between Healthy Individuals and AAV Patients. *PLoS ONE* *4*, e5287.

Ordonez, L., Bernard, I., Chabod, M., Augusto, J.-F., Lauwers-Cances, V., Cristini, C., Cuturi, M.-C., Subra, J.-F., and Saoudi, A. (2013). A higher risk of acute rejection of human kidney allografts can be predicted from the level of CD45RC expressed by the recipients’ CD8 T cells. *PLoS ONE* *8*, e69791.

Ouyang, W., and O’Garra, A. (2019). IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. *Immunity* *50*, 871–891.

Pandit, J., Bohm, A., Jancarik, J., Halenbeck, R., Koths, K., and Kim, S.H. (1992). Three-dimensional structure of dimeric human recombinant macrophage colony-stimulating factor. *Science* *258*, 1358–1362.

Pandiyani, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J., and Lenardo, M.J. (2007). CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat. Immunol.* *8*, 1353–1362.

Pantelyushin, S., Haak, S., Ingold, B., Kulig, P., Heppner, F.L., Navarini, A.A., and Becher, B. (2012). Ror γ t⁺ innate lymphocytes and $\gamma\delta$ T cells initiate psoriasiform plaque formation in mice. *J. Clin. Invest.* *122*, 2252–2256.

Paquin-Proulx, D., Greenspun, B.C., Kitchen, S.M., Saraiva Raposo, R.A., Nixon, D.F., and Grayfer, L. (2018). Human interleukin-34-derived macrophages have increased resistance to HIV-1 infection. *Cytokine* *111*, 272–277.

Pedros, C., Papapietro, O., Colacios, C., Casemayou, A., Bernard, I., Garcia, V., Lagrange, D., Mariamé, B., Andreoletti, O., Fournié, G.J., et al. (2013). Genetic control of HgCl₂-induced IgE and autoimmunity by a 117-kb interval on rat chromosome 9 through CD4⁺CD45RChigh T cells. *Genes & Immunity* *14*, 258–267.

Perdiguero, E.G., and Geissmann, F. (2016). The development and maintenance of resident macrophages. *Nature Immunology* *17*, 2–8.

Perry, D., Sang, A., Yin, Y., Zheng, Y.-Y., and Morel, L. (2011). Murine Models of Systemic Lupus Erythematosus. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* *2011*, 1–19.

Picarda, E., Bézie, S., Venturi, V., Echasserieau, K., Mérieau, E., Delhumeau, A., Renaudin,

K., Brouard, S., Bernardeau, K., Anegon, I., et al. (2014). MHC-derived allopeptide activates TCR-biased CD8⁺ Tregs and suppresses organ rejection. *J. Clin. Invest.* *124*, 2497–2512.

Picarda, E., Bézie, S., Boucault, L., Autrusseau, E., Kilens, S., Meistermann, D., Martinet, B., Daguin, V., Donnart, A., Charpentier, E., et al. (2017). Transient antibody targeting of CD45RC induces transplant tolerance and potent antigen-specific regulatory T cells. *JCI Insight* *2*, e90088.

Polansky, J.K., Kretschmer, K., Freyer, J., Floess, S., Garbe, A., Baron, U., Olek, S., Hamann, A., von Boehmer, H., and Huehn, J. (2008). DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *Eur. J. Immunol.* *38*, 1654–1663.

Powrie, F. (1990). OX-22high CD4⁺ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by the OX-22low subset [published erratum appears in *J Exp Med* 1991 Apr 1;173(4):1037]. *Journal of Experimental Medicine* *172*, 1701–1708.

Powrie, F., Leach, M.W., Mauze, S., Menon, S., Caddle, L.B., and Coffman, R.L. (1994). Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4⁺ T cells. *Immunity* *1*, 553–562.

Prasse, A., Pechkovsky, D.V., Toews, G.B., Schäfer, M., Eggeling, S., Ludwig, C., Germann, M., Kollert, F., Zissel, G., and Müller-Quernheim, J. (2007). CCL18 as an indicator of pulmonary fibrotic activity in idiopathic interstitial pneumonias and systemic sclerosis. *Arthritis & Rheumatism* *56*, 1685–1693.

Preisser, L., Miot, C., Guillou-Guillemette, H.L., Beaumont, E., Foucher, E.D., Garo, E., Blanchard, S., Frémaux, I., Croué, A., Fouchard, I., et al. (2014). IL-34 and macrophage colony-stimulating factor are overexpressed in hepatitis C virus fibrosis and induce profibrotic macrophages that promote collagen synthesis by hepatic stellate cells. *Hepatology* *60*, 1879–1890.

Pridans, C., Raper, A., Davis, G.M., Alves, J., Sauter, K.A., Lefevre, L., Regan, T., Meek, S., Sutherland, L., Thomson, A.J., et al. (2018). Pleiotropic Impacts of Macrophage and Microglial Deficiency on Development in Rats with Targeted Mutation of the *Csf1r* Locus. *J. Immunol.* *201*, 2683–2699.

Putnam, A.L., Safinia, N., Medvec, A., Laszkowska, M., Wray, M., Mintz, M.A., Trotta, E., Szot, G.L., Liu, W., Lares, A., et al. (2013). Clinical Grade Manufacturing of Human Alloantigen-Reactive Regulatory T Cells for Use in Transplantation: Clinical Grade Alloantigen-Reactive Tregs. *American Journal of Transplantation* *13*, 3010–3020.

Pyonteck, S.M., Akkari, L., Schuhmacher, A.J., Bowman, R.L., Sevenich, L., Quail, D.F., Olson, O.C., Quick, M.L., Huse, J.T., Teijeiro, V., et al. (2013). CSF-1R inhibition alters

macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nat. Med.* *19*, 1264–1272.

Qiu, T., Teng, Y., Wang, Y., and Xu, L. (2016). Adoptive transfer of transforming growth factor- β 1-induced CD4+CD25+ regulatory T cells prevents immune response-mediated spontaneous abortion. *Reproduction, Fertility and Development* *28*, 1788.

Rademakers, R., Baker, M., Nicholson, A.M., Rutherford, N.J., Finch, N., Soto-Ortolaza, A., Lash, J., Wider, C., Wojtas, A., DeJesus-Hernandez, M., et al. (2012). Mutations in the colony stimulating factor 1 receptor (CSF1R) gene cause hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids. *Nature Genetics* *44*, 200–205.

Raggi, C., Correnti, M., Sica, A., Andersen, J.B., Cardinale, V., Alvaro, D., Chiorino, G., Forti, E., Glaser, S., Alpini, G., et al. (2017). Cholangiocarcinoma stem-like subset shapes tumor-initiating niche by educating associated macrophages. *Journal of Hepatology* *66*, 102–115.

Ray, S., Britschgi, M., Herbert, C., Takeda-Uchimura, Y., Boxer, A., Blennow, K., Friedman, L.F., Galasko, D.R., Jutel, M., Karydas, A., et al. (2007). Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins. *Nat. Med.* *13*, 1359–1362.

Ren, X., Ye, F., Jiang, Z., Chu, Y., Xiong, S., and Wang, Y. (2007). Involvement of cellular death in TRAIL/DR5-dependent suppression induced by CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells. *Cell Death Differ.* *14*, 2076–2084.

Rheinländer, A., Schraven, B., and Bommhardt, U. (2018). CD45 in human physiology and clinical medicine. *Immunology Letters* *196*, 22–32.

Rio, B., Chevret, S., Vigouroux, S., Chevallier, P., Fürst, S., Sirvent, A., Bay, J.-O., Socié, G., Ceballos, P., Huynh, A., et al. (2015). Decreased Nonrelapse Mortality after Unrelated Cord Blood Transplantation for Acute Myeloid Leukemia Using Reduced-Intensity Conditioning: A Prospective Phase II Multicenter Trial. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* *21*, 445–453.

Riquelme, P., Geissler, E.K., and Hutchinson, J.A. (2012). Alternative approaches to myeloid suppressor cell therapy in transplantation: comparing regulatory macrophages to tolerogenic DCs and MDSCs. *Transplant Res* *1*, 17.

Robertson, S.A., Chin, P.-Y., Femia, J.G., and Brown, H.M. (2018). Embryotoxic cytokines—Potential roles in embryo loss and fetal programming. *J. Reprod. Immunol.* *125*, 80–88.

Rocha, B., and Tanchot, C. (2004). CD8 T cell memory. *Semin. Immunol.* *16*, 305–314.

Rojo, R., Raper, A., Ozdemir, D.D., Lefevre, L., Grabert, K., Wollscheid-Lengeling, E., Bradford, B., Caruso, M., Gazova, I., Sánchez, A., et al. (2019). Deletion of a Csf1r enhancer selectively impacts CSF1R expression and development of tissue macrophage populations.

Nature Communications *10*.

Romano, M., Fanelli, G., Albany, C.J., Giganti, G., and Lombardi, G. (2019). Past, Present, and Future of Regulatory T Cell Therapy in Transplantation and Autoimmunity. *Frontiers in Immunology 10*.

van Rooijen, N., and Hendriks, E. (2010). Liposomes for Specific Depletion of Macrophages from Organs and Tissues. In *Liposomes*, V. Weissig, ed. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 189–203.

Roopenian, D.C., and Akilesh, S. (2007). FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nature Reviews Immunology 7*, 715–725.

Rosenfeld, C.S. (1994). Transforming growth factor-beta 1 augments macrophage-colony stimulating factor activity on human marrow. *Stem Cells 12*, 527–532.

Rossol, M., Kraus, S., Pierer, M., Baerwald, C., and Wagner, U. (2012). The CD14(bright) CD16+ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population. *Arthritis Rheum. 64*, 671–677.

Sagoo, P., Ali, N., Garg, G., Nestle, F.O., Lechler, R.I., and Lombardi, G. (2011). Human Regulatory T Cells with Alloantigen Specificity Are More Potent Inhibitors of Alloimmune Skin Graft Damage than Polyclonal Regulatory T Cells. *Science Translational Medicine 3*, 83ra42-83ra42.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol. 155*, 1151–1164.

Salvadori, M., and Tsalouchos, A. (2017). Biomarkers in renal transplantation: An updated review. *WJT 7*, 161.

San Segundo, D., Ruiz, P., Irure, J., Arias-Loste, M.T., Cuadrado, A., Puente, A., Casafont, F., López-Hoyos, M., Crespo, J., and Fábrega, E. (2016). Serum Levels of Interleukin-34 During Acute Rejection in Liver Transplantation. *Transplantation Proceedings 48*, 2977–2979.

Sanchez-Niño, M.D., Sanz, A.B., and Ortiz, A. (2016). Chronicity following ischaemia-reperfusion injury depends on tubular-macrophage crosstalk involving two tubular cell-derived CSF-1R activators: CSF-1 and IL-34. *Nephrol Dial Transplant 31*, 1409–1416.

Sanyal, A.J. (2019). Past, present and future perspectives in nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol 16*, 377–386.

Sarris, M., Andersen, K.G., Randow, F., Mayr, L., and Betz, A.G. (2008). Neuropilin-1

expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition. *Immunity* 28, 402–413.

Sasmono, R.T., and Williams, E. (2012). Generation and characterization of MacGreen mice, the Cfs1r-EGFP transgenic mice. *Methods Mol. Biol.* 844, 157–176.

Saunders, S., Jalkanen, M., O'Farrell, S., and Bernfield, M. (1989). Molecular cloning of syndecan, an integral membrane proteoglycan. *J. Cell Biol.* 108, 1547–1556.

Scottà, C., Esposito, M., Fazekasova, H., Fanelli, G., Edozie, F.C., Ali, N., Xiao, F., Peakman, M., Afzali, B., Sagoo, P., et al. (2013). Differential effects of rapamycin and retinoic acid on expansion, stability and suppressive qualities of human CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) T regulatory cell subpopulations. *Haematologica* 98, 1291–1299.

Ségaly, A.I., Brion, R., Brulin, B., Maillason, M., Charrier, C., Téletchéa, S., and Heymann, D. (2015a). IL-34 and M-CSF form a novel heteromeric cytokine and regulate the M-CSF receptor activation and localization. *Cytokine* 76, 170–181.

Segaliny, A.I., Brion, R., Mortier, E., Maillason, M., Cherel, M., Jacques, Y., Le Goff, B., and Heymann, D. (2015a). Syndecan-1 regulates the biological activities of interleukin-34. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1853, 1010–1021.

Segaliny, A.I., Brion, R., Mortier, E., Maillason, M., Cherel, M., Jacques, Y., Le Goff, B., and Heymann, D. (2015b). Syndecan-1 regulates the biological activities of interleukin-34. *Biochim. Biophys. Acta* 1853, 1010–1021.

Ségaly, A.I., Mohamadi, A., Dizier, B., Lokajczyk, A., Brion, R., Lanel, R., Amiaud, J., Charrier, C., Boisson-Vidal, C., and Heymann, D. (2015b). Interleukin-34 promotes tumor progression and metastatic process in osteosarcoma through induction of angiogenesis and macrophage recruitment. *International Journal of Cancer* 137, 73–85.

Serão, N.V.L., Delfino, K.R., Southey, B.R., Beever, J.E., and Rodriguez-Zas, S.L. (2011). Cell cycle and aging, morphogenesis, and response to stimuli genes are individualized biomarkers of glioblastoma progression and survival. *BMC Med Genomics* 4, 49.

Seta, Y., Shan, K., Bozkurt, B., Oral, H., and Mann, D.L. (1996). Basic mechanisms in heart failure: the cytokine hypothesis. *J. Card. Fail.* 2, 243–249.

Shadle, P.J., Aldwin, L., Nitecki, D.E., and Kothe, K. (1989). Human macrophage colony-stimulating factor heterogeneity results from alternative mRNA splicing, differential glycosylation, and proteolytic processing. *J. Cell. Biochem.* 40, 91–107.

Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, S.-A., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J.T., and Sahebkar, A. (2018). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J. Cell. Physiol.* 233, 6425–6440.

- Sheng, J., Ruedl, C., and Karjalainen, K. (2015). Most Tissue-Resident Macrophages Except Microglia Are Derived from Fetal Hematopoietic Stem Cells. *Immunity* 43, 382–393.
- Sherr, C.J., Rettenmier, C.W., Sacca, R., Roussel, M.F., Look, A.T., and Stanley, E.R. (1985). The c-fms proto-oncogene product is related to the receptor for the mononuclear phagocyte growth factor, CSF-1. *Cell* 41, 665–676.
- Shitara, K., and Nishikawa, H. (2018). Regulatory T cells: a potential target in cancer immunotherapy: Regulatory T cells in cancer immunity. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1417, 104–115.
- Shoji, H., Yoshio, S., Mano, Y., Kumagai, E., Sugiyama, M., Korenaga, M., Arai, T., Itokawa, N., Atsukawa, M., Aikata, H., et al. (2016). Interleukin-34 as a fibroblast-derived marker of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Scientific Reports* 6, 28814.
- Shull, M.M., Ormsby, I., Kier, A.B., Pawlowski, S., Diebold, R.J., Yin, M., Allen, R., Sidman, C., Proetzel, G., and Calvin, D. (1992). Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359, 693–699.
- Shultz, L.D., Lyons, B.L., Burzenski, L.M., Gott, B., Chen, X., Chaleff, S., Kotb, M., Gillies, S.D., King, M., Mangada, J., et al. (2005). Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J. Immunol.* 174, 6477–6489.
- Smolen, J.S., Aletaha, D., Barton, A., Burmester, G.R., Emery, P., Firestein, G.S., Kavanaugh, A., McInnes, I.B., Solomon, D.H., Strand, V., et al. (2018). Rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Disease Primers* 4.
- Spickett, G.P., Brandon, M.R., Mason, D.W., Williams, A.F., and Woollett, G.R. (1983). MRC OX-22, a monoclonal antibody that labels a new subset of T lymphocytes and reacts with the high molecular weight form of the leukocyte-common antigen. *J. Exp. Med.* 158, 795–810.
- Spierings, J., and van Eden, W. (2017). Heat shock proteins and their immunomodulatory role in inflammatory arthritis. *Rheumatology* 56, 198–208.
- Stanley, E.R., and Chitu, V. (2014). CSF-1 Receptor Signaling in Myeloid Cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6.
- Stehling, O. (2004). Monocyte cytotoxicity during acute kidney graft rejection in rats. *International Immunology* 16, 101–110.
- Steinbrink, K., Wöflfl, M., Jonuleit, H., Knop, J., and Enk, A.H. (1997). Induction of tolerance

by IL-10-treated dendritic cells. *J. Immunol.* *159*, 4772–4780.

Steiniger, B., Stehling, O., Scriba, A., and Grau, V. (2001). Monocytes in the rat: phenotype and function during acute allograft rejection. *Immunol. Rev.* *184*, 38–44.

Streuli, M., Hall, L.R., Saga, Y., Schlossman, S.F., and Saito, H. (1987). Differential usage of three exons generates at least five different mRNAs encoding human leukocyte common antigens. *J. Exp. Med.* *166*, 1548–1566.

Stritesky, G.L., Muthukrishnan, R., Sehra, S., Goswami, R., Pham, D., Travers, J., Nguyen, E.T., Levy, D.E., and Kaplan, M.H. (2011). The transcription factor STAT3 is required for T helper 2 cell development. *Immunity* *34*, 39–49.

Svensson, J., Jenmalm, M.C., Matussek, A., Geffers, R., Berg, G., and Ernerudh, J. (2011). Macrophages at the fetal-maternal interface express markers of alternative activation and are induced by M-CSF and IL-10. *J. Immunol.* *187*, 3671–3682.

Svensson-Arvelund, J., Mehta, R.B., Lindau, R., Mirrasekhian, E., Rodriguez-Martinez, H., Berg, G., Lash, G.E., Jenmalm, M.C., and Ernerudh, J. (2015). The Human Fetal Placenta Promotes Tolerance against the Semiallogeneic Fetus by Inducing Regulatory T Cells and Homeostatic M2 Macrophages. *The Journal of Immunology* *194*, 1534–1544.

Sweeney, M.D., Sagare, A.P., and Zlokovic, B.V. (2018). Blood–brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Neurology* *14*, 133–150.

Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G., and Glimcher, L.H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* *100*, 655–669.

Tacke, F. (2012). Functional role of intrahepatic monocyte subsets for the progression of liver inflammation and liver fibrosis in vivo. *Fibrogenesis Tissue Repair* *5*, S27.

Takagi, T., Naito, Y., Mizushima, K., Akagiri, S., Suzuki, T., Hirata, I., Omatsu, T., Handa, O., Kokura, S., Ichikawa, H., et al. (2010). Inhalation of carbon monoxide ameliorates TNBS-induced colitis in mice through the inhibition of TNF- α expression. *Dig. Dis. Sci.* *55*, 2797–2804.

Tamoutounour, S., Guilliams, M., Montanana Sanchis, F., Liu, H., Terhorst, D., Malosse, C., Pollet, E., Ardouin, L., Luche, H., Sanchez, C., et al. (2013). Origins and Functional Specialization of Macrophages and of Conventional and Monocyte-Derived Dendritic Cells in Mouse Skin. *Immunity* *39*, 925–938.

Tanaka, H., Zhang, W., Yang, G.-X., Ando, Y., Tomiyama, T., Tsuneyama, K., Leung, P., Coppel, R.L., Ansari, A.A., Lian, Z.X., et al. (2014). Successful immunotherapy of autoimmune cholangitis by adoptive transfer of forkhead box protein 3⁺ regulatory T cells:

Regulatory T cells and PBC. *Clin Exp Immunol* 178, 253–261.

Tanaka, S., Takahashi, N., Udagawa, N., Tamura, T., Akatsu, T., Stanley, E.R., Kurokawa, T., and Suda, T. (1993). Macrophage colony-stimulating factor is indispensable for both proliferation and differentiation of osteoclast progenitors. *J. Clin. Invest.* 91, 257–263.

Tao, R., Fan, Q., Zhang, H., Xie, H., Lu, L., Gu, G., Wang, F., Xi, R., Hu, J., Chen, Q., et al. (2017). Prognostic Significance of Interleukin-34 (IL-34) in Patients With Chronic Heart Failure With or Without Renal Insufficiency. *J Am Heart Assoc* 6.

Taylor, P.A., Lees, C.J., and Blazar, B.R. (2002). The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood* 99, 3493–3499.

Teng, Y.H.-F., Aquino, R.S., and Park, P.W. (2012). Molecular functions of syndecan-1 in disease. *Matrix Biol* 31, 3–16.

Terada, K., Yomogida, K., Imai, T., Kiyonari, H., Takeda, N., Kadomatsu, T., Yano, M., Aizawa, S., and Mori, M. (2005). A type I DnaJ homolog, DjA1, regulates androgen receptor signaling and spermatogenesis. *EMBO J.* 24, 611–622.

Tesson, L., Usal, C., Ménoret, S., Leung, E., Niles, B.J., Remy, S., Santiago, Y., Vincent, A.I., Meng, X., Zhang, L., et al. (2011). Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. *Nat. Biotechnol.* 29, 695–696.

Thebault, P., Condamine, T., Heslan, M., Hill, M., Bernard, I., Saoudi, A., Josien, R., Anegon, I., Cuturi, M.C., and Chiffolleau, E. (2007). Role of IFN γ in Allograft Tolerance Mediated by CD4+CD25+ Regulatory T Cells by Induction of IDO in Endothelial Cells. *American Journal of Transplantation* 7, 2472–2482.

Thiault, N., Darrigues, J., Adoue, V., Gros, M., Binet, B., Peral, C., Leobon, B., Fazilleau, N., Joffre, O.P., Robey, E.A., et al. (2015). Peripheral regulatory T lymphocytes recirculating to the thymus suppress the development of their precursors. *Nat. Immunol.* 16, 628–634.

Thomas, M.L. (1989). The leukocyte common antigen family. *Annu. Rev. Immunol.* 7, 339–369.

Thornton, A.M., Korty, P.E., Tran, D.Q., Wohlfert, E.A., Murray, P.E., Belkaid, Y., and Shevach, E.M. (2010). Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J. Immunol.* 184, 3433–3441.

Tian, Y., Shen, H., Xia, L., and Lu, J. (2013). Elevated Serum and Synovial Fluid Levels of Interleukin-34 in Rheumatoid Arthritis: Possible Association with Disease Progression via Interleukin-17 Production. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 33, 398–401.

Trenado, A., Sudres, M., Tang, Q., Maury, S., Charlotte, F., Grégoire, S., Bonyhadi, M., Klatzmann, D., Salomon, B.L., and Cohen, J.L. (2006). Ex vivo-expanded CD4+CD25+ immunoregulatory T cells prevent graft-versus-host-disease by inhibiting activation/differentiation of pathogenic T cells. *J. Immunol.* *176*, 1266–1273.

Trias, E., Beilby, P.R., Kovacs, M., Ibarburu, S., Varela, V., Barreto-Núñez, R., Bradford, S.C., Beckman, J.S., and Barbeito, L. (2019). Emergence of Microglia Bearing Senescence Markers During Paralysis Progression in a Rat Model of Inherited ALS. *Frontiers in Aging Neuroscience* *11*.

Trzonkowski, P., Bieniaszewska, M., Juścińska, J., Dobyszuk, A., Krzystyniak, A., Marek, N., Myśliwska, J., and Hellmann, A. (2009). First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4+CD25+CD127- T regulatory cells. *Clinical Immunology* *133*, 22–26.

Tsuchida, T., and Friedman, S.L. (2017). Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* *14*, 397–411.

Tukaj, S., Kotlarz, A., Jozwik, A., Smolenska, Z., Bryl, E., Witkowski, J.M., and Lipinska, B. (2010). Hsp40 proteins modulate humoral and cellular immune response in rheumatoid arthritis patients. *Cell Stress and Chaperones* *15*, 555–566.

Ulich, T.R., del Castillo, J., Watson, L.R., Yin, S.M., and Garnick, M.B. (1990). In vivo hematologic effects of recombinant human macrophage colony-stimulating factor. *Blood* *75*, 846–850.

Vacca, P., Cantoni, C., Vitale, M., Prato, C., Canegallo, F., Fenoglio, D., Ragni, N., Moretta, L., and Mingari, M.C. (2010). Crosstalk between decidual NK and CD14+ myelomonocytic cells results in induction of Tregs and immunosuppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *107*, 11918–11923.

VandePol, C.J., and Garnick, M.B. (1991). Clinical applications of recombinant macrophage-colony stimulating factor (rhM-CSF). *Biotechnol Ther* *2*, 231–239.

Verreck, F.A.W., Boer, T. de, Langenberg, D.M.L., Hoeve, M.A., Kramer, M., Vaisberg, E., Kastelein, R., Kolk, A., Waal-Malefyt, R. de, and Ottenhoff, T.H.M. (2004). Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *PNAS* *101*, 4560–4565.

Verreck, F.A.W., Boer, T. de, Langenberg, D.M.L., Zanden, L. van der, and Ottenhoff, T.H.M. (2006). Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN- γ - and CD40L-mediated costimulation.

- Vieyra-Lobato, M.R., Vela-Ojeda, J., Montiel-Cervantes, L., López-Santiago, R., and Moreno-Lafont, M.C. (2018). Description of CD8⁺ Regulatory T Lymphocytes and Their Specific Intervention in Graft-versus-Host and Infectious Diseases, Autoimmunity, and Cancer. *J Immunol Res* 2018, 3758713.
- Vogelzang, A., McGuire, H.M., Yu, D., Sprent, J., Mackay, C.R., and King, C. (2008). A fundamental role for interleukin-21 in the generation of T follicular helper cells. *Immunity* 29, 127–137.
- Vuddamalay, Y., Attia, M., Vicente, R., Pomié, C., Enault, G., Leobon, B., Joffre, O., Romagnoli, P., and van Meerwijk, J.P.M. (2016). Mouse and human CD8⁺ CD28^{low} regulatory T lymphocytes differentiate in the thymus. *Immunology* 148, 187–196.
- Wada, Y., Gonzalez-Sanchez, H.M., Weinmann-Menke, J., Iwata, Y., Ajay, A.K., Meineck, M., and Kelley, V.R. (2019). IL-34-Dependent Intrarenal and Systemic Mechanisms Promote Lupus Nephritis in MRL-Faslpr Mice. *J. Am. Soc. Nephrol.* 30, 244–259.
- Walker, D.G., Tang, T.M., and Lue, L.-F. (2017). Studies on Colony Stimulating Factor Receptor-1 and Ligands Colony Stimulating Factor-1 and Interleukin-34 in Alzheimer's Disease Brains and Human Microglia. *Front. Aging Neurosci.* 9.
- Wang, Y.M., and Alexander, S.I. (2013). IL-2/Anti-IL-2 Complex: A Novel Strategy of *In Vivo* Regulatory T Cell Expansion in Renal Injury. *Journal of the American Society of Nephrology* 24, 1503–1504.
- Wang, B., Xu, W., Tan, M., Xiao, Y., Yang, H., and Xia, T.-S. (2015a). Integrative genomic analyses of a novel cytokine, interleukin-34 and its potential role in cancer prediction. *Int. J. Mol. Med.* 35, 92–102.
- Wang, B., Ma, Z., Wang, M., Sun, X., Tang, Y., Li, M., Zhang, Y., Li, F., and Li, X. (2017a). IL-34 Upregulated Th17 Production through Increased IL-6 Expression by Rheumatoid Fibroblast-Like Synoviocytes.
- Wang, B., Tang, Y., Sun, X., Ouyang, X., Li, H., Wei, J., Zhang, Y., and Li, X. (2018a). Increased IL-6 expression on THP-1 by IL-34 stimulation up-regulated rheumatoid arthritis Th17 cells. *Clin Rheumatol* 37, 127–137.
- Wang, H., Cao, J., and Lai, X. (2017b). Serum Interleukin-34 Levels Are Elevated in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Molecules* 22, 35.
- Wang, J., Gu, B.J., Masters, C.L., and Wang, Y.-J. (2017c). A systemic view of Alzheimer disease - insights from amyloid- β metabolism beyond the brain. *Nat Rev Neurol* 13, 703.
- Wang, Y., Kissenpfennig, A., Mingueneau, M., Richelme, S., Perrin, P., Chevrier, S., Genton, C., Lucas, B., DiSanto, J.P., Acha-Orbea, H., et al. (2008). Th2 Lymphoproliferative Disorder

of *Lat*^{Y136F} Mutant Mice Unfolds Independently of TCR-MHC Engagement and Is Insensitive to the Action of Foxp3⁺ Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology* *180*, 1565–1575.

Wang, Y., Szretter, K.J., Vermi, W., Gilfillan, S., Rossini, C., Cella, M., Barrow, A.D., Diamond, M.S., and Colonna, M. (2012a). IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. *Nat. Immunol.* *13*, 753–760.

Wang, Y., Szretter, K.J., Vermi, W., Gilfillan, S., Rossini, C., Cella, M., Barrow, A.D., Diamond, M.S., and Colonna, M. (2012b). IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. *Nat. Immunol.* *13*, 753–760.

Wang, Y., Bugatti, M., Ulland, T.K., Vermi, W., Gilfillan, S., and Colonna, M. (2015b). Non-redundant roles of keratinocyte-derived IL-34 and neutrophil-derived CSF1 in Langerhans cells renewal in the steady-state and skin inflammation. *Eur. J. Immunol.*

Wang, Y.-Q., Cao, W.-J., Gao, Y.-F., Ye, J., and Zou, G.-Z. (2018b). Serum interleukin-34 level can be an indicator of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* *24*, 1312–1320.

Watanabe, T., Yoshida, M., Shirai, Y., Yamori, M., Yagita, H., Itoh, T., Chiba, T., Kita, T., and Wakatsuki, Y. (2002). Administration of an antigen at a high dose generates regulatory CD4⁺ T cells expressing CD95 ligand and secreting IL-4 in the liver. *J. Immunol.* *168*, 2188–2199.

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, S., Nandi, S., Chitu, V., Yeung, Y.-G., Yu, W., Huang, M., Williams, L.T., Lin, H., and Stanley, E.R. (2010a). Functional overlap but differential expression of CSF-1 and IL-34 in their CSF-1 receptor-mediated regulation of myeloid cells. *J. Leukoc. Biol.* *88*, 495–505.

Wei, S., Nandi, S., Chitu, V., Yeung, Y.-G., Yu, W., Huang, M., Williams, L.T., Lin, H., and Stanley, E.R. (2010b). Functional overlap but differential expression of CSF-1 and IL-34 in their CSF-1 receptor-mediated regulation of myeloid cells. *J. Leukoc. Biol.* *88*, 495–505.

Wei, S., Nandi, S., Chitu, V., Yeung, Y.-G., Yu, W., Huang, M., Williams, L.T., Lin, H., and Stanley, E.R. (2010c). Functional overlap but differential expression of CSF-1 and IL-34 in their CSF-1 receptor-mediated regulation of myeloid cells. *J. Leukoc. Biol.* *88*, 495–505.

Weir, E.C., Lowik, C.W., Paliwal, I., and Insogna, K.L. (1996). Colony stimulating factor-1 plays a role in osteoclast formation and function in bone resorption induced by parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein. *J. Bone Miner. Res.* *11*, 1474–1481.

Wellen, K.E., and Hotamisligil, G.S. (2005). Inflammation, stress, and diabetes. *J. Clin. Invest.* *115*, 1111–1119.

Wensky, A., Marcondes, M.C.G., and Lafaille, J.J. (2001). The Role of IFN- γ in the Production of Th2 Subpopulations: Implications for Variable Th2-Mediated Pathologies in Autoimmunity. *The Journal of Immunology* *167*, 3074–3081.

Wesenbeeck, L.V., Odgren, P.R., MacKay, C.A., D'Angelo, M., Safadi, F.F., Popoff, S.N., Hul, W.V., and Marks, S.C. (2002). The osteopetrotic mutation toothless (tl) is a loss-of-function frameshift mutation in the rat *Csf1* gene: Evidence of a crucial role for CSF-1 in osteoclastogenesis and endochondral ossification. *PNAS* *99*, 14303–14308.

White, A.M., and Wraith, D.C. (2016). Tr1-Like T Cells - An Enigmatic Regulatory T Cell Lineage. *Front Immunol* *7*, 355.

Wiktor-Jedrzejczak, W., Bartocci, A., Ferrante, A.W., Ahmed-Ansari, A., Sell, K.W., Pollard, J.W., and Stanley, E.R. (1990). Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *87*, 4828–4832.

Wiktor-Jedrzejczak, W.W., Ahmed, A., Szczylik, C., and Skelly, R.R. (1982). Hematological characterization of congenital osteopetrosis in op/op mouse. Possible mechanism for abnormal macrophage differentiation. *J. Exp. Med.* *156*, 1516–1527.

Wildenberg, M.E., Welzen-Coppens, J.M.C., van Helden-Meeuwssen, C.G., Bootsma, H., Vissink, A., van Rooijen, N., van de Merwe, J.P., Drexhage, H.A., and Versnel, M.A. (2009). Increased frequency of CD16+ monocytes and the presence of activated dendritic cells in salivary glands in primary Sjogren syndrome. *Annals of the Rheumatic Diseases* *68*, 420–426.

Wildin, R.S., Ramsdell, F., Peake, J., Faravelli, F., Casanova, J.L., Buist, N., Levy-Lahad, E., Mazzella, M., Goulet, O., Perroni, L., et al. (2001). X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat. Genet.* *27*, 18–20.

Wlodarczyk, A., Løbner, M., Cédile, O., and Owens, T. (2014). Comparison of microglia and infiltrating CD11c+ cells as antigen presenting cells for T cell proliferation and cytokine response. *Journal of Neuroinflammation* *11*, 57.

Wlodarczyk, A., Benmamar-Badel, A., Cédile, O., Jensen, K.N., Kramer, I., Elsborg, N.B., and Owens, T. (2019). CSF1R Stimulation Promotes Increased Neuroprotection by CD11c+ Microglia in EAE. *Frontiers in Cellular Neuroscience* *12*.

Wu, D.C., Hester, J., Nadig, S.N., Zhang, W., Trzonkowski, P., Gray, D., Hughes, S., Johnson, P., and Wood, K.J. (2013). Ex Vivo Expanded Human Regulatory T Cells Can

Prolong Survival of a Human Islet Allograft in a Humanized Mouse Model: *Transplantation Journal* 96, 707–716.

Wurtz, O., Bajénoff, M., and Guerder, S. (2004). IL-4-mediated inhibition of IFN-gamma production by CD4+ T cells proceeds by several developmentally regulated mechanisms. *Int. Immunol.* 16, 501–508.

Wynn, T.A., Chawla, A., and Pollard, J.W. (2013). Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 496, 445–455.

Xi, R., Fan, Q., Yan, X., Zhang, H., Xie, H., Gu, G., Xu, Y., Wang, F., and Tao, R. (2018). Increased Serum Interleukin-34 Levels Are Related to the Presence and Severity of Cardiac Dysfunction in Patients With Ischemic Cardiomyopathy. *Front Physiol* 9, 904.

Xiao, C., Zhu, Z., Sun, S., Gao, J., Fu, M., Liu, Y., Wang, G., Yao, X., and Li, W. (2017). Activation of Langerhans cells promotes the inflammation in imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis. *J. Dermatol. Sci.* 85, 170–177.

Xiao, F., Ma, L., Zhao, M., Huang, G., Mirenda, V., Dorling, A., Lechler, R., and Lombardi, G. (2014). Ex Vivo Expanded Human Regulatory T Cells Delay Islet Allograft Rejection via Inhibiting Islet-Derived Monocyte Chemoattractant Protein-1 Production in CD34+ Stem Cells-Reconstituted NOD-scid IL2rynull Mice. *PLoS ONE* 9, e90387.

Xie, H.H., Shen, H., Zhang, L., Cui, M.Y., Xia, L.P., and Lu, J. (2018). Elevated Serum Interleukin-34 Level in Patients with Systemic Lupus Erythematosus Is Associated with Disease Activity. *Scientific Reports* 8, 3462.

Xu, R., Sun, H.-F., Williams, D.W., Jones, A.V., Al-Hussaini, A., Song, B., and Wei, X.-Q. (2015). IL-34 Suppresses *Candida albicans* Induced TNF α Production in M1 Macrophages by Downregulating Expression of Dectin-1 and TLR2.

Xystrakis, E. (2004). Identification of a novel natural regulatory CD8 T-cell subset and analysis of its mechanism of regulation. *Blood* 104, 3294–3301.

Xystrakis, E., Bernard, I., Dejean, A.S., Alsaati, T., Druet, P., and Saoudi, A. (2004a). Alloreactive CD4 T lymphocytes responsible for acute and chronic graft-versus-host disease are contained within the CD45RChigh but not the CD45RClow subset. *European Journal of Immunology* 34, 408–417.

Xystrakis, E., Dejean, A.S., Bernard, I., Druet, P., Liblau, R., Gonzalez-Dunia, D., and Saoudi, A. (2004b). Identification of a novel natural regulatory CD8 T-cell subset and analysis of its mechanism of regulation. *Blood* 104, 3294–3301.

Xystrakis, E., Cavailles, P., Dejean, A.S., Cautain, B., Colacios, C., Lagrange, D., van de Gaar, M.-J., Bernard, I., Gonzalez-Dunia, D., Damoiseaux, J., et al. (2004c). Functional and

Genetic Analysis of Two CD8 T Cell Subsets Defined by the Level of CD45RC Expression in the Rat. *The Journal of Immunology* 173, 3140–3147.

Yadav, M., Louvet, C., Davini, D., Gardner, J.M., Martinez-Llordella, M., Bailey-Bucktrout, S., Anthony, B.A., Sverdrup, F.M., Head, R., Kuster, D.J., et al. (2012). Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. *J. Exp. Med.* 209, 1713–1722, S1-19.

Yang, J., Brook, M.O., Carvalho-Gaspar, M., Zhang, J., Ramon, H.E., Sayegh, M.H., Wood, K.J., Turka, L.A., and Jones, N.D. (2007). Allograft rejection mediated by memory T cells is resistant to regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 19954–19959.

Yang, S., Jiang, S., Wang, Y., Tu, S., Wang, Z., and Chen, Z. (2016). Interleukin 34 Upregulation Contributes to the Increment of MicroRNA 21 Expression through STAT3 Activation Associated with Disease Activity in Rheumatoid Arthritis. *J. Rheumatol.*

Yang, X., Yang, J., Xing, X., Wan, L., and Li, M. (2014). Increased frequency of Th17 cells in systemic sclerosis is related to disease activity and collagen overproduction. *Arthritis Res. Ther.* 16, R4.

Yoshida, H., Hayashi, S.-I., Kunisada, T., Ogawa, M., Nishikawa, S., Okamura, H., Sudo, T., Shultz, L.D., and Nishikawa, S.-I. (1990). The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* 345, 442–444.

Yu, G., Bing, Y., Zhu, S., Liu, Z., Li, W., Xia, L., and Li, Y. (2015). Activation of the Interleukin-34 Inflammatory Pathway in Response to Influenza A Virus Infection. *The American Journal of the Medical Sciences* 349, 145–150.

Yui, M.A., Brissette, W.H., Brennan, D.C., Wuthrich, R.P., and Rubin-Kelley, V.E. (1991). Increased macrophage colony-stimulating factor in neonatal and adult autoimmune MRL-lpr mice. *Am. J. Pathol.* 139, 255–261.

Zhang, J. (2007). Yin and yang interplay of IFN-gamma in inflammation and autoimmune disease. *J. Clin. Invest.* 117, 871–873.

Zhang, D., Li, M., Dong, Y., Zhang, X., Liu, X., Chen, Z., Zhu, Y., Wang, H., Liu, X., Zhu, J., et al. (2017). 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 up-regulates IL-34 expression in SH-SY5Y neural cells. *Innate Immun* 23, 584–591.

Zhang, F., Ding, R., Li, P., Ma, C., Song, D., Wang, X., Ma, T., and Bi, L. (2015a). Interleukin-34 in rheumatoid arthritis: potential role in clinical therapy. *Int J Clin Exp Med* 8, 7809–7815.

Zhang, J., Zhang, Y., Wang, Q., Li, C., Deng, H., Si, C., and Xiong, H. (2019). Interleukin-35 in immune-related diseases: protection or destruction. *Immunology* 157, 13–20.

- Zhang, L., Cui, M., Ding, L., Xia, L., Lu, J., and Shen, H. (2018a). Interleukin-34 Aggravates the Severity of Arthritis in Collagen-Induced Arthritis Mice by Inducing Interleukin-17 Production. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 38, 221–225.
- Zhang, Q., Lu, W., Liang, C.-L., Chen, Y., Liu, H., Qiu, F., and Dai, Z. (2018b). Chimeric Antigen Receptor (CAR) Treg: A Promising Approach to Inducing Immunological Tolerance. *Front Immunol* 9.
- Zhang, T., Pierson, R.N., and Azimzadeh, A.M. (2015b). Update on CD40 and CD154 blockade in transplant models. *Immunotherapy* 7, 899–911.
- Zhao, H., Liao, X., and Kang, Y. (2017). Tregs: Where We Are and What Comes Next? *Frontiers in Immunology* 8.
- Zhao, Y., Xiong, W., Yang, T., Prall, A., Baxter, B.T., and Langnas, A.N. (2003). Xenogeneic skin graft rejection in M-CSF/macrophage deficient osteopetrotic mice. *Xenotransplantation* 10, 232–239.
- Zhao, Z., Pan, G., Tang, C., Li, Z., Zheng, D., Wei, X., and Wu, Z. (2018a). IL-34 Inhibits Acute Rejection of Rat Liver Transplantation by Inducing Kupffer Cell M2 Polarization. *Transplantation* 102, e265.
- Zhao, Z., Pan, G., Tang, C., Li, Z., Zheng, D., Wei, X., and Wu, Z. (2018b). IL-34 Inhibits Acute Rejection of Rat Liver Transplantation by Inducing Kupffer Cell M2 Polarization: *Transplantation* 102, e265–e274.
- Zheng, J., Liu, Y., Liu, Y., Liu, M., Xiang, Z., Lam, K.-T., Lewis, D.B., Lau, Y.-L., and Tu, W. (2013). Human CD8⁺ regulatory T cells inhibit GVHD and preserve general immunity in humanized mice. *Sci Transl Med* 5, 168ra9.
- Zhou, R.-P., Wu, X.-S., Xie, Y.-Y., Dai, B.-B., Hu, W., Ge, J.-F., and Chen, F.-H. (2016a). Functions of interleukin-34 and its emerging association with rheumatoid arthritis. *Immunology* 149, 362–373.
- Zhou, S.-L., Hu, Z.-Q., Zhou, Z.-J., Dai, Z., Wang, Z., Cao, Y., Fan, J., Huang, X.-W., and Zhou, J. (2016b). miR-28-5p-IL-34-Macrophage Feedback Loop Modulates Hepatocellular Carcinoma Metastasis. *Hepatology*.
- Zhu, C., Herrmann, U.S., Falsig, J., Abakumova, I., Nuvolone, M., Schwarz, P., Frauenknecht, K., Rushing, E.J., and Aguzzi, A. (2016). A neuroprotective role for microglia in prion diseases. *Journal of Experimental Medicine* 213, 1047–1059.
- Ziegler-Heitbrock, L., and Hofer, T.P.J. (2013). Toward a refined definition of monocyte subsets. *Front Immunol* 4, 23.
- Zins, K., Heller, G., Mayerhofer, M., Schreiber, M., and Abraham, D. (2018). Differential

prognostic impact of interleukin-34 mRNA expression and infiltrating immune cell composition in intrinsic breast cancer subtypes. *Oncotarget* 9, 23126–23148.

Zorena, K., Jachimowicz-Duda, O., and Waż, P. (2016). The cut-off value for interleukin 34 as an additional potential inflammatory biomarker for the prediction of the risk of diabetic complications. *Biomarkers* 1–7.

Zwicker, S., Martinez, G.L., Bosma, M., Gerling, M., Clark, R., Majster, M., Söderman, J., Almer, S., and Boström, E.A. (2015). Interleukin 34: a new modulator of human and experimental inflammatory bowel disease. *Clin. Sci.* 129, 281–290.

Zwicker, S., Bureik, D., Bosma, M., Martinez, G.L., Almer, S., and Boström, E.A. (2016). Receptor-Type Protein-Tyrosine Phosphatase ζ and Colony Stimulating Factor-1 Receptor in the Intestine: Cellular Expression and Cytokine- and Chemokine Responses by Interleukin-34 and Colony Stimulating Factor-1. *PLOS ONE* 11, e0167324.

Titre : Etude de l'impact d'une déficience en interleukine-34 sur le développement et les réponses immunes.

Mots clés : Cellule T régulatrice, IL-34, auto-immunité, immunothérapie, tolérance, rat, CRISPR/Cas9

Résumé : Les cytokines sont de puissants outils pour réguler les réponses immunitaires. L'IL-34 est une cytokine qui se lie au CSF-1R, au PTP ζ et au CD138 et est impliquée dans la survie, la prolifération et la différenciation des monocytes/macrophages. Nous avons récemment décrit l'expression de l'IL-34 par les Tregs CD4⁺FoxP3⁺ et CD8⁺FoxP3⁺ induits chez l'Homme et dans un modèle de tolérance en transplantation chez le rat. Nous avons démontré que l'absence d'expression de l'IL-34 chez les rats *Il34*^{-/-} affecte le compartiment T CD8⁺ mais pas les cellules myéloïdes. De plus, la déficience conduit à un phénotype instable exacerbé dans des conditions inflammatoires. *In vivo*, nous avons mis en évidence l'incapacité des Tregs CD4 *Il34*^{-/-} à protéger de la wasting disease par rapport aux cellules *Il34*^{+/+}.

Nous avons également montré le rôle régulateur de l'IL-34 dans le retard de développement de la GVHD et le rejet de l'allogreffe dans des modèles de souris humanisées. De plus, dans des cohortes de patients transplantées ou greffées, nous avons démontré que le taux sérique d'IL-34 ne pouvait pas être utilisé comme marqueur de prédiction du rejet rénal. Mais une expression élevée de l'IL-34 par les Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} est un marqueur de bon pronostic d'incidence de la GVHD. Ainsi, nos données démontrent le rôle crucial de l'IL-34 dans la fonction suppressive des Tregs CD4⁺ ainsi que son potentiel thérapeutique en transplantation.

Title: Study of the impact of an interleukin-34 deficiency in the development and immune responses.

Keywords : Treg, IL-34, autoimmunity, immunotherapy, tolerance, rat, CRISPR/Cas9

Abstract: Cytokines are powerful tools for regulating immune responses. IL-34 is a cytokine that bonds to CSF-1R, PTP ζ and CD138 and is implicated in survival, proliferation and differentiation of monocytes/macrophages. We recently described the expression of IL-34 by induced FOXP3⁺ CD4⁺ and CD8⁺ Tregs in healthy individuals in human and in a model of tolerance in transplantation in rat. Here we report that the absence of expression of IL-34 in *Il34*^{-/-} rats impact the T CD8⁺ compartment but not myeloid cells. Moreover, the deficiency lead to an unstable phenotype exacerbated under inflammatory conditions.

In vivo, we revealed the inability of *Il34*^{-/-} CD4 Tregs to protect from the wasting disease compared to *Il34*^{+/+} cells. We also showed the regulatory role of IL-34 to delay GVHD development and allograft rejection in immune humanized mice models. In addition, using two different transplanted human cohorts, we showed that the IL-34 serum level can't be used as a prediction marker of kidney rejection. But a high expression of IL-34 by Tregs CD8⁺CD45RC^{low/-} is a marker of good prognosis for a reduced GVHD incidence. Altogether, our data demonstrate the crucial role of IL-34 in the CD4⁺ Treg suppressive function as well as its therapeutical potential in transplantation.