

Thèse de Doctorat

Clara Maria SCARLATA

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : Biologie-Santé

Discipline : Biologie, Médecine et Santé

Spécialité : *Immunologie*

Unité de recherche : 892/1015

Soutenue le 5 Décembre 2016

Les lymphocytes T_H17 et T régulateurs :

mécanismes de développement partagés et relation avec le microbiote intestinal

JURY

Président :	Yannick GUILLOUX , Professeur, Université de Nantes
Rapporteurs :	Lionel APETOH , Chargé de recherche, INSERM, Université de Dijon Jean-Charles GUERY , Directeur de Recherche, INSERM, Université de Toulouse
Examineur :	Nadine CERF-BENSUSSAN , Directeur de Recherche, INSERM, Université Paris Descartes
Directeur de Thèse :	Maha AYYOUB , Directeur de Recherche, INSERM, Paris
Co-directeur de Thèse :	Emmanuel SCOTET , Chargé de recherche, Université de Nantes

UNIVERSITÉ DE NANTES

FACULTÉ DE MÉDECINE

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTÉ

Les lymphocytes T_H17 et T régulateurs humains :
mécanismes de développement partagés et relation avec le
microbiote intestinal

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie Médecine et Santé

Spécialité : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

Clara Maria SCARLATA

Le 5 Décembre 2016, devant le jury ci-dessous

Président: Pr. Yannick GUILLOUX, PU, Nantes

Rapporteur : Dr. Lionel APETOH, CR, Dijon

Rapporteur : Dr. Jean Charles GUERY, DR, Toulouse

Examineur : Dr. Nadine CERF-BENSUSSAN, DR, Paris

Directeurs de thèse

Dr. Maha AYYOUB, DR, Paris

Dr. Emmanuel SCOTET, CR, Nantes

(INSERM UMR892/UMR1015)

« Il est des personnes, ô roi Gélon, qui pensent que le nombre des grains de sable est infini. Je ne parle point du sable qui est autour de Syracuse et qui est répandu dans le reste de la Sicile, mais bien de celui qui se trouve non seulement dans les régions habitées, mais encore dans les régions inhabitées. Quelques-uns croient que le nombre des grains de sable n'est pas infini, mais qu'il est impossible d'assigner un nombre plus grand. Si ceux qui pensent ainsi se représentaient un volume de sable qui fût égal à celui de la terre, qui remplît toutes ses cavités, et les abîmes delà mer, et qui s'élevât jusqu'aux sommets des plus hautes montagnes, il est évident qu'ils seraient bien moins persuadés qu'il pût exister un nombre qui surpassât celui des grains de sable.

Quant à moi, je vais faire voir par des démonstrations géométriques auxquelles tu ne pourras refuser ton assentiment, que parmi les nombres dénommés par nous dans les livres adressés à Zeuxippe, il en est qui excèdent le nombre des grains d'un volume de sable égal non seulement à la grandeur de la terre, mais encore à celui de l'univers entier. »

L'Arénaire, Archimède. Syracuse 287-212 a.C.

Remerciements

Arrivée a la fin de cette étape importante, je voudrais tout d'abord remercier le *Dr. Lionel Apetoh* et le *Dr. Jean-Charles Guery* d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse et le *Dr. Nadine Cerf-Bensussan* ainsi que le *Pr. Yannick Guilloux* pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je tiens également à remercier les membres de mon comité de suivi de thèse, le *Dr. Paola Nisticò* et le *Dr. Kunle Odunsi* pour avoir suivi avec intérêt le déroulement de ma thèse et pour leurs précieux conseils.

Je remercie sincèrement le *Pr. Danila Valmori* pour avoir cru en moi et m'avoir initiée à la recherche, mon co-directeur de thèse le *Dr. Emmanuel Scotet* et mon directeur de thèse le *Dr. Maha Ayyoub*, mon mentor humain et professionnel. Merci pour votre formation, patience, confiance et merci pour m'avoir transmis le sens du détail.

En ce qui concerne ma dernière année à Paris je tiens à remercier sincèrement le *Pr. Laurence Zitvogel* qui m'a accueillie dans son laboratoire en permettant l'évolution de mon projet, le *Dr. Nadine Cerf-Bensussan* et le *Pr. Xavier Mariette* et leurs équipes pour leur précieuse collaboration.

Je souhaite aussi remercier l'INSERM et la Région Pays de la Loire pour avoir financé mes années de thèse.

Je remercie aussi mes directeurs de stage pendant mon master universitaire en Italie le *Dr. Cristina Colarossi* et le *Dr. Lorenzo Memeo* pour avoir cru en mes capacités.

Un remerciement spécial va à mes collègues de travail à Nantes, qui ont partagé mes joies et m'ont aidée et supportée dans les moments difficiles. Merci donc à *Clothilde* et *Pascale*. Merci aussi à *Caroline* pour m'avoir transmis son savoir-faire et à *Alessandro* pour sa loyauté. Merci également à *Emilie*, *Isabelle*, *Kanako* et *Quentin*.

Je tiens à saluer tous mes collègues de travail actuels ici à Paris. Merci *Connie*, *Paulita* et *Sonia* pour votre soutien et votre amitié sincère. Merci *Romain* pour ton amitié et ta perpétuelle bonne humeur! Merci *Jono* pour ta patience et ton amitié et merci *Alexandre* et *Laetitia* pour votre amitié et disponibilité. Merci à *Caroline* pour ton dynamisme et disponibilité, merci *Claudine* et *Nathalie* pour votre franchise, loyauté et disponibilité. Merci à tous les autres : *Antoine*, *Aurélie*, *Baptiste*, *Bertrand*, *Bo*, *Laetitia F.*, *Marie*, *Meriem*, *Nicolas* et *Taka*.

Etre une doctorante ne signifie pas seulement expérimenter et chercher les solutions aux problèmes qui empêchent la finalisation d'une recherche mais signifie aussi côtoyer quotidiennement avec des personnes rencontrées au cours de ces années qui deviennent comme une deuxième famille : merci *Viola*, *Teodora*, *Gilberto*, *Varvara*, *Guillame* et *Hassan*.

Etre une doctorante ambitieuse signifie aussi changer de ville et partager une nouvelle vie avec des personnes qui deviennent comme une troisième famille. Merci à *Angela*, *Chiara*, *Claudia*, *Federica*, *Daniela*, *Domenico*, *Pauline* et *Valentina*.

Enfin, je voudrais remercier ma (vraie) famille pour son amour inconditionnel, son soutien et sa présence constante: Merci *Maman*, *Papà* et *Luca*. Merci aussi à ma tante *Giulia* qui m'a toujours suivie de près ou de loin. Merci aussi à tous les autres membres de ma famille: mon oncle *Giuseppe*, ma tante *Teresa* et ma tante *Stella* (merci pour le cours accéléré de français) et toute leur famille. Merci aussi à tous mes grands-parents qui même s'ils ne sont plus là, seront je l'espère fiers de moi.

Sommaire

Remerciements	3
Abréviations	6
INTRODUCTION	10
I. La réponse immunitaire- Généralités	11
I. 1. La réponse innée	11
I. 2. La réponse adaptative	19
II. Rôle central des CD4 dans l'orientation de la réponse immunitaire adaptative	28
II. 1. Les lymphocytes T CD4 auxiliaires et régulateurs	28
II. 2. Les sous-populations de lymphocytes T CD4 auxiliaires : Les lymphocytes T _H 1/T _H 2	29
II. 3. Les lymphocytes T _H 17	33
II. 4. a. Identification des T _H 17	33
II. 4. b. Ontogénie des T _H 17	35
II. 4. c. Rôle des T _H 17 dans la défense immunitaire et dans les maladies auto-immunes	37
II. 4. d. Mécanismes limitant la dangerosité des T _H 17	38
II. 5. Les lymphocytes T régulateurs CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ (Treg)	39
II. 5. a. Identification des Treg CD4 ⁺ CD25 ⁺	41
II. 5. b. Mécanismes de suppression.....	42
II. 5. c. Treg naturels et induits : ontogénie, marqueurs et fonctions	45
II. 5. d. Treg humains naïfs et mémoires	48
II. 6. Plasticité des T _H 17 : relations avec les Treg et les T _H 1.....	50
II. 6. a. T _H 17 et Treg	50
II. 6. b. T _H 17 et T _H 1.....	53
II. 7. Les autres populations de LT CD4.....	55
II. 7. a. Les autres populations de LT CD4 ⁺ auxiliaires	56
II. 7. b. Les autres populations de LT CD4 ⁺ suppressives.....	57
III. Les enzymes immunosuppressives	58

III. 1. Métabolisme de l'Arginine (Arg-1 et iNOS)	60
III. 2. Métabolisme du tryptophane (IDO)	63
III. 3. Métabolisme de la phénylalanine (IL4I1)	67
IV. Le microbiote	73
IV. 1. Impact sur la physiologie de l'hôte et implication dans les états pathologiques	76
IV. 2. Le microbiote et le système immunitaire : immunité innée, Treg et T _H 17	80
IV. 2. a. Activation des PRR	81
IV. 2. b. T _H 17 et microbiote	83
IV. 2. c. Treg FOXP3 ⁺ et microbiote.....	86
IV. 3. Rôle du microbiota dans la pathogenèse des maladies autoimmunes.....	88
IV. 4. Les bactéries segmentées filamenteuses et le système immunitaire.....	94
OBJECTIFS DE LA THESE ET APPROCHE EXPERIMENTALE	102
V. 1. a. Partie I: Etude de l'expression de l'enzyme immunosuppressive IL4I1 dans les TH17 et les lymphocytes T régulateurs.	104
V. 1. b. Partie I: Travail expérimentale et résultats.	107
V. 1. c. Article.....	108
V. 2. a. Partie II : Etude des la réponses T CD4 spécifique des bactéries filamenteuses segmentées (SFB) chez les donneurs sains et les patients atteints de maladies autoimmunes.	109
V. 2. b. Travail expérimental et résultats	112
V. 2. c. Matériels et méthodes	124
DISCUSSION	127
PERSPECTIVES	138
BIBLIOGRAPHIE	139

Abréviations

1-MT :	1- Methyl tryptophane
ACE2 :	Angiotensine I Converting Enzyme 2
ACPA	Anti-citrullinated protein antibodies
ADP :	Adenosine diphosphate
AhR :	Aryl Hydrocarbon Receptor
AIP:	Apoptosis-Inducing Protein
ALR:	AIM-2 Like Receptor
AMP:	Adenosine Monophosphate
APC:	Antigen Presenting Cells
Arg-1:	Arginase 1
ARN:	Acide Ribonucléique
AS:	Ankylosant Spondylarthritis
ATP:	Adenosine Triphosphate
BCR:	B Cell Receptor
CCL:	CC Chemokine ligand
CD:	Chron's Disease
CIA:	Collagen Induced Arthritis
CLR:	Type C Lectine Receptor
c-MAF:	MusculoAponeurotic Fibrosarcoma
CMH:	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CNS:	Conserve Non Coding Sequences
CRC:	Colorectal Cancer
cTEC:	cortical Thymic Epithelial Cells
CTL:	Cytotoxic Lymphocyte
CTLA4 :	Cytotoxic T-lymphocyte Antigen 4
CXCR:	C-X-C chemokine receptor
DC:	Dendritic Cell

DSS: Dextran Sodium Sulphate

EAE: Experimental Autoimmune Encephalomyelitis

eIF-2 α : Eukaryotic Initiation Factor 2

FOXP3: Forkhead box P3

FUT2: 2 Fucosyltransférase

GALT: Gut Associated Lymphoid Tissue

GATA-3: GATA binding protein 3

GCN2: General Control Nonderepressible 2

G-CSF: Granulocyte Colony-Stimulating Factor

GF: Germ Free

GM-CSF:Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor

IBD: Inflammatory Bowel Disease

IDO: Indoleamine 2,3-DiOxygenase

IFN: Interferon

iHDAC: Histone Deacetylase

IL: Interleukine

IL4I1: IL-4 induced gene 1

ILC: Innate Lymphoid Cells

IRF4: Interferon Regulatory Factor 4

ITIM: Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif

LAAO: L-amino acid oxidases

LP: Lamina Propria

LPS: Lipopolysaccharide

LT: Lymphocyte T

LTA: Lipoteichoic acid

MAGE-A3: Melanoma-associated antigen 3

mDC: Monocyte derived Dendritic Cells

mTEC: medullar Thymic Epithelial Cells

mTOR: mammalian Target Of Rapamycin,

NAD: Nicotinamide Adenine Dinucleotide

NFAT: Nuclear factor of activated T-cells

NFIL3: Nuclear Factor, Interleukin 3 Regulated

NFκB: Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NK: Natural Killer

NLR: Nod Like Receptor

NO: Nitric Oxide

NOS: Nitric Oxide Synthase

NRP- 1: Neuropeptide-1

Ntreg: Treg naif

nTreg: Treg naturel

PAMP: Pathogen Associated Molecular Pattern

pDC: Plasmacytoid Dendritic Cell

PRR: Pattern Recognition Receptor

PSA: Polysaccharide A

RAG: Recombination-Activating Gene

RF: Rheumatoid Factor

RLR: RIG-I Like Receptor

RORγt: RAR-related orphan receptor gamma

SCFA: Short Chain Fatty Acid

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

SOCS3: Suppressor Of Cytokine Signaling 3

SpA: Spondylarthropaty

SPF: Specific Pathogen Free

SRB: Sulfate Reductor Bacteria

STAT: Signaling Transducer and Activator of Transcription

T1D: Diabetes de Type 1

TAM: Tumor Associated Macrophages

T-bet: T box expressed in T cells

TCR: T Cell Receptor
TDO: Tryptophane 2,3 dioxygenase
TGF-b: Transforming Growth Factor b
TLR: Toll Like Recetor
TNF: Tumor Necrosis Factor
TOB1: tTransducer Of erbB2
UC: Ulcerative Colitis
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

INTRODUCTION

I. La réponse immunitaire- Généralités

Le système immunitaire constitue un réseau complexe de tissus, de cellules et de molécules qui garantissent une protection durable contre les agents infectieux tout en tolérant les tissus normaux de l'hôte ainsi que les microorganismes commensaux qui le colonisent. Dans cet équilibre, la réponse immunitaire qui doit discriminer l'intégrité des tissus du soi ainsi que du microbiote qui y est associé qui doivent être « tolérés » des agressions externes ou internes à cette intégrité, a subi une adaptation progressive au cours de l'évolution des espèces en raison de l'évolution concomitante des agents pathogènes et des commensaux. Chez les mammifères, où la réponse immunitaire est le plus largement étudiée, suite à une infection, le système immunitaire met successivement en place deux types de réponses : la réponse innée et la réponse adaptative. La réponse innée, qui s'est développée dès l'apparition des organismes multicellulaires, représente la première ligne de défense rapide contre les agents pathogènes. Elle repose sur des récepteurs génériques capables de reconnaître des motifs conservés des pathogènes. La réponse adaptative, qui dépend de la diversification somatique des gènes codant pour des récepteurs spécifiques des antigènes s'est développée chez les gnathostomes. Cette réponse est plus lente à se mettre en place et se distingue de la réponse innée par deux caractéristiques principales : la spécificité et la mémoire.

I. 1 La réponse innée

La première ligne de défense contre une possible infection est représentée par des barrières physiques et mécaniques comme la peau, les épithéliums internes, le péristaltisme intestinal et les oscillations des cils broncho-pulmonaires. Cependant en cas de dommage tissulaire, ces barrières peuvent être franchies donnant aux microorganismes la possibilité de coloniser les tissus de l'hôte. Afin d'éviter que l'infection se produise, l'immunité innée intervient essentiellement par la mise en place de la réponse inflammatoire. La réponse inflammatoire est caractérisée par la constitution d'un œdème et le recrutement, médié par des facteurs solubles, des cellules de l'immunité innée qui œuvrent à l'élimination de l'agent infectieux.

Afin que la réponse inflammatoire puisse être déclenchée la reconnaissance du microorganisme par le système immunitaire doit avoir lieu. Une des caractéristiques du système inné qui le différencie du système adaptatif est que les récepteurs qui lui permettent de détecter les pathogènes sont codés dans le génome constitutionnel (germline) et ont donc un degré de variabilité limité. Ces récepteurs, appelés « Pattern Recognition Receptors (PRR) » permettent la détection de motifs spécifiques, « Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMP) », partagés par plusieurs pathogènes. De nombreux ligands microbiens, allant des composants structuraux des bactéries, des champignons et des virus à des molécules biosynthétiques tels que les acides nucléiques, activent les PRRs. Plusieurs familles de PRRs ont été identifiées et caractérisées : les récepteurs Toll-like (**TLRs**), les récepteurs Nod-like (**NLRs**), les récepteurs RIG-I-like (**RLRs**), les récepteurs AIM-2-like (**ALRs**) et les récepteurs lectines de types C (**CLRs**)[1] (Fig. 1).

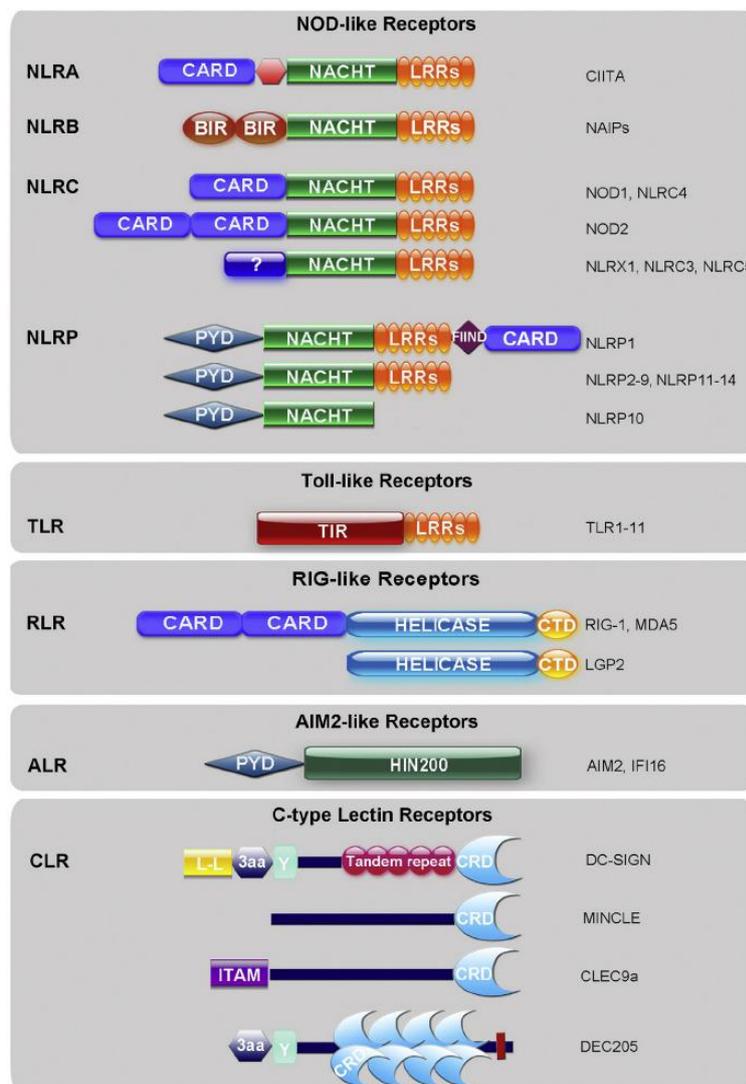


Figure 1. Différentes familles et sous-familles de « Pattern Recognition Receptors (PRR) »

Ces familles peuvent de plus être classées en fonction de leur localisation membranaire ou intracellulaire. Les récepteurs situés au niveau de la membrane reconnaissent surtout les motifs moléculaires (PAMPs) issus de la paroi bactérienne. En revanche, les récepteurs intracellulaires situés au niveau de la membrane endosomale ou au niveau du cytoplasme ont comme ligands les acides nucléiques d'origine bactérienne ou virale.

L'expression de ces récepteurs dans des populations cellulaires de l'immunité innée comme les macrophages, les mastocytes, les neutrophiles, les éosinophiles, les cellules dendritiques (DCs), et les cellules natural killer (NK) leur permet, après reconnaissance du ligand et activation des voies de transduction du signal, d'enclencher un certain nombre de processus comme l'activation du complément, la phagocytose, l'apoptose et l'activation des voies proinflammatoires, tous ayant pour but l'élimination de l'agent pathogène. Certaines de ces fonctions dépendent (production de cytokines) ou non (phagocytose, apoptose, autophagie) de la transcription.

Lors de l'interaction entre PAMP et PPR une série d'activités transcriptionnelles se mettent en place pour la production de cytokines inflammatoires et des interférons (IFNs) essentielle au déclenchement des réponses immunitaires innées et adaptatives. Cette production de cytokines inflammatoires entraîne dans les cellules immunitaires un nombre de changements morphologiques, fonctionnels et migratoires. Notamment, la réaction inflammatoire induite par la production locale de ces cytokines conduit au recrutement d'un plus grand nombre de cellules immunitaires au site d'intérêt. Par exemple, l'activation des voies de signalisation des TLR dans les macrophages résidant dans les tissus conduit à la production de cytokines pro- inflammatoires, comme le facteur de nécrose tumorale (TNF), les interleukines IL-1 β et IL-6, qui coordonnent les réponses inflammatoires locales et systémiques. Le TNF et l'IL-1 β activent l'endothélium local pour induire une vasodilatation et augmenter la perméabilité des vaisseaux sanguins, ce qui permet le recrutement des protéines sériques et des leucocytes au site de l'infection. Aussi, une augmentation de la concentration du facteur tissulaire (également connu sous le nom de facteur de coagulation III) dans l'endothélium, conduit à une cascade de coagulation locale qui contribue à empêcher la diffusion microbienne dans le sang. En outre, l'IL-1 β ainsi que l'IL-6 activent les hépatocytes pour produire des protéines qui, à leur tour, activent le complément et opsonisent les

pathogènes pour la phagocytose par les macrophages et les neutrophiles[2]. Les différentes populations cellulaires de l'immunité innée interviennent lors de l'enclenchement de la réponse avec une séquence d'évènements et une complémentarité de fonctions. Les mastocytes sont des cellules sentinelles placées dans les tissus qui sont le plus souvent envahi par des microbes. Après activation, les mastocytes dégranulent libérant de nombreuses molécules qui attirent d'autres cellules de l'immunité innée et provoquent la dilatation des vaisseaux sanguins alimentant la zone envahi.

Suite au déclenchement de la réponse locale, les premières cellules attirées sont les neutrophiles, la population cellulaire la plus importante en nombre parmi les globules blancs. Comme toutes les cellules sanguines, les neutrophiles proviennent des cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse. La courte durée de vie des neutrophiles, allant de 2 à 3 jours dans les tissus à seulement 6 heures dans la circulation, signifie qu'ils doivent être produits en continu. Le noyau lobé qui les caractérise permet leur diapédèse à travers la paroi endothéliale des vaisseaux sanguins dilatés. Dans le site d'infection les neutrophiles mettent en œuvre trois mécanismes effecteurs : d'abord la phagocytose, puis la sécrétion de fibres de la matrice extracellulaire au travers lesquelles les neutrophiles piègent les microbes empêchant ainsi leur réplication et enfin le mécanisme de dégranulation, consistant dans la libération de substances à action antimicrobienne à partir des granules cytoplasmiques. Il est important de souligner que les neutrophiles ne sont pas les seuls membres de la famille de granulocytes à participer à la réponse immunitaire, mais sont accompagnés par les basophiles et les éosinophiles qui ont un rôle tout aussi important.

Plusieurs heures après l'intervention des granulocytes les monocytes-macrophages arrivent au site inflammatoire, ce sont des cellules avec un grand noyau qui nécessitent une vasodilatation plus importante pour franchir la barrière endothéliale. Les monocytes macrophages proviennent également de précurseurs dans la moelle osseuse et circulent dans le sang sous forme de monocytes pendant un temps variant de 8 heures à 4 jours, puis migrent vers divers tissus où ils se différencient en macrophages et où ils sont capables de survivre pendant plusieurs mois. Les macrophages activés assurent la phagocytose des cellules mortes ou endommagées et des microbes contribuant ainsi à la régulation de la réponse inflammatoire. Enfin, ils sont également en mesure d'apprêter les antigènes et de les présenter aux cellules T permettant l'activation de la réponse immunitaire adaptative, même si cette fonction est principalement assurée par les cellules dendritiques appartenant aussi à la lignée des phagocytes mononuclés. L'une des

fonctions essentielles des macrophages activés est la sécrétion de cytokines telles que le TNF, les IFN et l'IL-12. Ces cytokines agissent en activant les lymphocytes T, les cellules NK et d'autres cellules immunitaires innées, mais également en modulant l'activité phagocytaire des macrophages par effet autocrine. En outre l'IL-12, conjointement avec le TNF, stimule également la production de grandes quantités d'IFN- γ par les cellules NK avec un effet consécutif sur le contrôle de l'infection.

Les cellules tueuses naturelles (ou natural killer ; NK), qui dérivent du progéniteur lymphoïde mais n'expriment pas de récepteur spécifique de l'antigène comme les lymphocytes T et B, participent également à la réponse immunitaire innée. Le terme « tueuses naturelles » leur a été attribué car elles sont capables de tuer les cellules cibles indépendamment de leur activation. L'interaction d'une cellule NK avec des cellules cibles détermine une réponse qui est le résultat de l'intégration de signaux générés par les récepteurs activateurs et inhibiteurs exprimés par les NK et qui peuvent être engagés simultanément par les ligands présents sur la cellule cible. En particulier, les récepteurs activateurs reconnaissent un groupe diversifié de ligands qui sont exprimés par les cellules endommagées ou infectées par des virus ou d'autres microorganismes intracellulaires ou par des cellules transformées. En revanche, les récepteurs inhibiteurs se lient aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I, qui sont normalement exprimées sur la plupart des cellules normales, non infectées. Ainsi, l'expression du CMH-I protège les cellules normales des fonctions effectrices des NK. Ces fonctions effectrices consistent en la lyse des cellules cibles, la sécrétion de cytokines (ex. : IFN- γ) et l'augmentation de l'activité microbicide des macrophages. En effet, les cellules NK, comme les lymphocytes T cytotoxiques (CTL), possèdent des granules contenant des protéines cytolytiques, comme la perforine et les granzymes. Cependant, cela n'implique pas une redondance de rôle entre les NK et les CTL puisque les premières interviennent lors de la phase innée de la réponse immunitaire avant la mise en place de la réponse lymphocytaire T spécifique des antigènes.

Les cellules NK ne sont pas les seules cellules de l'immunité innée à avoir une origine lymphoïde. En fait, des études récentes ont montré que les NK appartiennent à la grande famille des cellules lymphoïdes innées (innate lymphoid cells ; ILC), qui ont été caractérisées bien plus tardivement[3]. Les ILC jouent un rôle clé dans la réponse immunitaire innée contre les agents pathogènes dans différents sites et dans l'organisation des tissus lymphoïdes. Elles jouent aussi un rôle important pendant la vie foetale[4]. Ces cellules sont différentes des lymphocytes B et T en raison de

l'absence de réarrangement somatique conduisant à l'expression du récepteur spécifique de l'antigène. Cependant, d'une manière analogue aux lymphocytes T, elles sont classables en fonction de leur profil cytokinique et de l'expression des facteurs de transcription en plusieurs sous-types (ILC1, ILC2, ILC3)[5,6]. Ainsi, les ILC1, y compris les cellules NK, sont caractérisées par leur capacité à libérer l'IFN- γ et nécessitent l'expression des facteurs de transcription NFIL3, T-bet et Eomes. Les ILC2 produisent les cytokines de type 2 telles que l'IL-5 et IL-13 et expriment le facteur de transcription GATA-3. Enfin, le troisième groupe des ILC, les ILC3 se caractérisent par la production d'IL-17 et d'IL-22 et sont dépendantes de l'expression de ROR γ t pour leur développement et leur survie. Cette spécialisation permet la défense de l'hôte contre des agents pathogènes d'origines différentes[5,7].

Enfin, à l'interface entre les réponses immunitaires innée et adaptative se situe la famille des cellules dendritique (DC), une population hétérogène de cellules qui proviennent de précurseurs hématopoïétiques. Les cellules dendritiques, après reconnaissance de l'agent pathogène par interaction PAMP-PRR, grâce à leurs propriétés à migrer au cours de la maturation, représentent un lien majeur entre la périphérie et les organes lymphoïdes secondaires. La bonne coordination entre la maturation et la migration des cellules dendritiques est une étape clé dans la sensibilisation des lymphocytes. L'activation des cellules dendritiques est suivie en plus de leur maturation, par un changement radical dans le répertoire des récepteurs de chimiokines qu'elles expriment, ce qui permet leur migration de la périphérie vers les ganglions lymphatiques.

Puisque les DC ont un rôle critique dans l'initiation des réponses lymphocytaires T, il a été longtemps soupçonné que différentes populations de DC pourraient être spécialisées dans l'induction des différents types de réponses lymphocytaires adaptés aux pathogènes contre lesquels la réponse immunitaire est en train de se mettre en place ainsi qu'à l'état pathologique ou physiologique en cours, incluant la tolérance au soi.

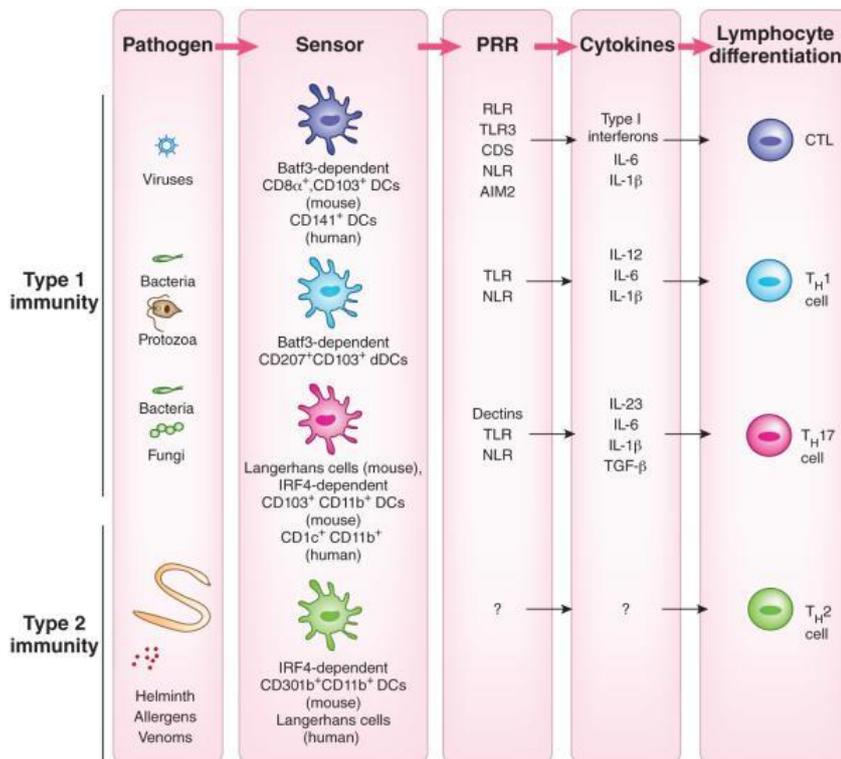
Alors que les DC partagent la capacité à capturer l'antigène, à l'apprêter afin de le présenter aux lymphocytes et à stimuler ces derniers, plusieurs sous-populations de DC se distinguent par leur localisation, migration et capacité à stimuler différentes réponses lymphocytaires T. La première distinction est celle entre les DC plasmacytoïdes (pDC) appelées ainsi à cause de leur ressemblance morphologique aux plasmocytes et les autres DC appelées DC classiques (cDC). Les pDC se trouvent principalement dans le sang et les tissus lymphoïdes et accèdent aux ganglions

lymphatiques par la circulation sanguine[8–10] . Au repos, les niveaux d'expression des molécules de CMH de classe II et des molécules de costimulation sont bas dans les pDC et l'expression de l'intégrine CD11c est aussi basse (souris) ou absente (homme). Les pDC murines expriment l'isoforme B220 de CD45 et les pDC humaines expriment CD123, CD303 et CD304. Les pDC expriment un nombre limité de PRR, essentiellement les TLR 7 et 9. La stimulation des pDC par les ligands de ces récepteurs, notamment en réponse aux virus, conduit à une production massive d'IFN- α . Cette capacité à produire des niveaux élevés d'IFN- α est une des caractéristiques principales des pDC. L'activation des pDC les amène également à apprêter et à présenter les antigènes aux lymphocytes T. Les cDC peuvent être divisées en deux populations principales : les « cDC résidentes » qui se trouvent au niveau des organes lymphoïdes primaires et secondaires (thymus, rate, ganglions lymphatiques, plaques de Peyer) et les « cDC migratoires » qui résident dans les tissus non lymphoïdes et dans la zone marginale de la rate, acquièrent les antigènes des tissus et du sang, respectivement, et ont la capacité de migrer vers les ganglions lymphatiques par les vaisseaux lymphatiques[8]. Chacune de ces populations est composée de sous-populations dont les marqueurs sont différents chez la souris et chez l'homme mais dont l'équivalence fonctionnelle a été établie grâce à l'étude de leur profil d'expression génique et de leurs fonctions. Chez la souris, les cDC résidentes sont composées d'une sous-population CD8 α^+ (CD11b^{-/low}) et d'une autre CD11b⁺ (cette population regroupe deux sous-populations proposées initialement comme étant distinctes, une CD4⁺ et une CD4⁻). Il a été proposé que l'équivalent des cDC CD8 α^+ chez l'homme expriment la lectine de type C DNGR-1/CLEC9A (C-type lectin domain family 9 member A), BDCA (Blood dendritic cell antigen)-3 et le récepteur de chimiokines XCR1. Certaines études proposent que la population humaine équivalente aux cDC résidentes CD11b⁺ expriment BDCA-1 et CLEC7A[11]. Les deux populations sont retrouvées à l'état immature dans les organes lymphoïdes et, après activation en présence de signaux de danger, ces cellules deviennent matures et restent dans les organes lymphoïdes. Les cDC migratoires peuvent également être divisées en deux sous-populations, selon l'expression d'intégrines : une CD103⁺CD11b⁻ (CD141⁺ chez l'homme) et une CD11b⁺ (CD1c⁺ chez l'homme)[8,11]. Des études fonctionnelles et d'expression génique ont révélé que les cDC migratoires CD103⁺ et les cDC résidentes CD8 α^+ représentent une lignée de cDC (cDC1) distincte par son origine et ses fonctions. Les cDC1 sont spécialisées dans la présentation croisée de l'antigène, la polarisation des lymphocytes T CD4 vers la voie T_H1 et la sécrétion d'interféron- λ en réponse à la stimulation via le récepteur TLR3. Ces fonctions soulignent leur rôle crucial dans la défense contre les pathogènes intracellulaires. De

plus, le développement des cDC1 dépend des facteurs de transcription IRF8, Id2 et Batf3. Les sous-populations de cDC résidentes $CD4^+$ ($CD11b^+$) et migratoires $CD11b^+$ représentent une lignée de cDC séparée (cDC2), spécialisée dans la présentation de l'antigène aux lymphocytes T $CD4^+$ et avec la capacité unique de favoriser la polarisation vers les réponses T_H2 ou T_H17 , ce qui souligne leur importance lors des réponses immunitaires aux pathogènes extracellulaires[9,12,13] (Fig. 2).

Dans la peau, il existe une population distincte de DC migratoires connues sous le nom de cellules de Langerhans et qui se localisent au niveau de l'épiderme[8,9]. Elles sont distinctes par leur origine (monocytes du foie fœtal), les niveaux intermédiaires d'expression du MHC de class II et de CD11C et par l'expression élevée de la lectine de type C CD207 ou langerin. Chez l'homme les cellules de Langerhans expriment CD1c. Les cellules de Langerhans migrent vers les ganglions lymphatiques drainant la peau où elles présentent les antigènes aux lymphocytes T CD4. Elles ont été impliquées dans la tolérance par induction de l'anergie des lymphocytes T et dans l'induction de réponses T_H17 lors d'infections fongiques[9]. Enfin, une sous-population supplémentaire de DC, connues sous le nom de DC inflammatoires, se différencient à partir des monocytes lors de l'inflammation[14]. Chez l'homme, comme mentionné ci-dessus, des populations équivalentes de cDC ont été décrites : les DC 141^+ s'approchent fonctionnellement des cDC murines $CD8\alpha^+/CD103^+$ et sont capables d'assurer la présentation croisée des antigènes et les cDC $CD1c^+$ qui pourraient représenter l'équivalent fonctionnel des DC murines $CD11b^+$ [6,9,15].

Une population de cDC unique à l'homme est caractérisée par l'expression de CD14 et elles sont retrouvées dans les ganglions lymphatiques et dans les tissus non lymphoïdes. Elles sont phénotypiquement proches des monocytes sanguins mais leurs niveaux d'expression du MHC de classe II sont plus élevés. Les cDC 14^+ de la peau expriment des niveaux bas de CD1c et l'expression de CD141 peut être induite dans cette population qui reste néanmoins dépourvue de la capacité de présentation croisée. En plus des cellules de Langerhans et des cDC $CD14^+$ [16], des cDC $CD1a^+$ sont retrouvées au niveau de la peau et les 3 populations migrent vers les ganglions lymphatiques drainant la peau[6]. En résumé, en fonction du type de pathogène et de sa localisation, les sous-populations de cellules dendritiques spécialisées permettront l'initiation de la réponse immunitaire adaptative appropriée grâce à leur localisation, leur capacité migratoire, leur profil d'expression de PRR, les cytokines qu'elles produisent et leur capacité à présenter l'antigène aux lymphocytes T $CD4$ et/ou $CD8$ (Fig. 2).

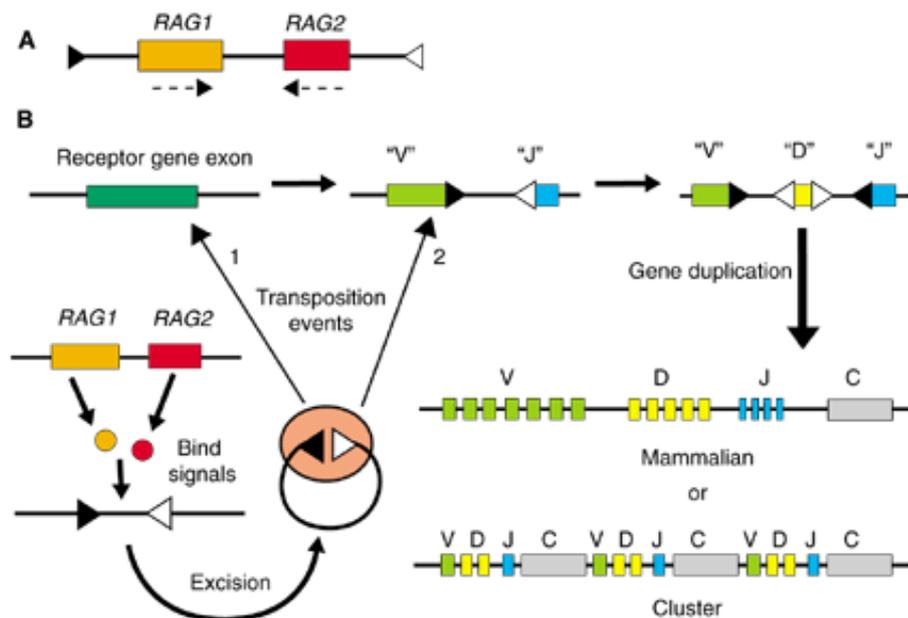


Iwasaki and Medzhitov, Nat. Immunol 2015

Figure 2. Les diverses classes de réponses de cellules T induites par les DC. Le développement et la fonction des DC *in vivo* nécessitent des facteurs de transcription qui sont critiques pour chaque étape de leur programme de différenciation. Les réponses de CTL sont induites par les DC Batf3 dépendantes CD8 α^+ et les DC CD103 $^+$ et la contrepartie humaine CD141 $^+$. L'immunité à médiation cellulaire T_H1 nécessite une stimulation, dépendante de GM-CSF, par le sous-groupe de DC CD207 $^+$ CD103 $^+$, une population mineure de DC dermiques (souris). Les réponses de T_H17 sont induites par des DC CD103 $^+$ CD11b $^+$ dépendant de l'IRF4 de la muqueuse ainsi que par des cellules de Langerhans de la peau, en fonction de l'emplacement du pathogène (souris). Les DC CD1c $^+$ humaines amorcent les réponses des cellules T_H17. Enfin, l'immunité à médiation cellulaire T_H2 nécessite des CD301b $^+$ CD11b $^+$ dépendant de l'IRF4 (souris). Ces DCs constituent la majorité de la population DC cutanée (dDC) et sont distinctes des DCs dermiques CD207 $^+$ CD103 $^+$. En revanche, les cellules de Langerhans humaines induisent la sécrétion de la cytokine T_H2 *ex vivo*.

I. 2 La réponse adaptative

La réponse immunitaire adaptative telle que nous la connaissons chez les mammifères est celle qui s'est développée il y a 500 millions d'années chez les vertébrés à mâchoires grâce à l'émergence du transposon RAG (recombination-activating gene)[17]. Les produits des gènes RAG-1 et RAG-2 permettent la recombinaison somatique des segments de gènes V (variable), J (joining) et, dans certains cas, D (diversity) formant ainsi les gènes codant pour les deux chaînes qui composent le récepteur spécifique de l'antigène dont les parties hypervariables, responsables de la reconnaissance spécifique, sont codées par les segments V(D)J ainsi obtenus(Fig. 3).



qemag.wordpress.com

Figure 3. Modèle pour l'origine des gènes des récepteurs d'antigènes. (A) Structure possible de l'élément transposable original intégré dans la lignée germinale d'un vertébré ancestral. Les flèches pointillées indiquent la direction de transcription des gènes RAG1 et RAG2. (B) Nature actuelle des gènes des immunoglobulines et du récepteur cellulaire de cellules T. Cette structure pourrait être le résultat de la transposition médiée par RAG d'un ou de deux éléments excisés dans un exon du gène initial (vert foncé), suivie par la division de l'exon en deux ou trois segments, chacun flanqué par un ou deux signaux de recombinaison (triangles noirs et blancs). Ces segments géniques représenteraient les précurseurs des segments actuels de gènes V, D et J. Différents modèles de duplication de gènes (à droite) se traduiraient dans les configurations «mammifères» ou «clusters» de segments de gènes caractéristiques du locus de la chaîne lourde des mammifères ou poissons cartilagineux, respectivement.

Ce mécanisme permet, à partir d'un matériel génomique limité, de générer une grande diversité au niveau des récepteurs. Les cellules immunitaires dans lesquelles ce mécanisme s'est développé sont les lignées lymphocytaires T et B toutes deux dérivant au niveau de la moelle osseuse du précurseur lymphoïde commun. La maturation des lymphocytes T (LT) ainsi que la recombinaison V(D)J des gènes codant pour les deux chaînes du récepteur des lymphocytes T (TCR, T cell receptor) ont lieu dans le thymus. Pour les lymphocytes B (LB), ce processus a lieu dans la moelle osseuse ou dans la bourse de Fabricius (chez les oiseaux) et conduit à la production de leur récepteur spécifique de l'antigène (BCR, B cell receptor) ou de leur immunoglobuline (Ig) spécifique. Etant donné le caractère arbitraire du processus de recombinaison V(D)J, il conduit à la production d'une proportion de récepteurs réactifs aux antigènes du soi. Les LT et les LB portant ce type de récepteurs auto-réactifs sont éliminés ou anergisés au cours de la maturation des lymphocytes par différents mécanismes de sélection. Au final, la recombinaison V(D)J permet la

production d'un nombre important de récepteurs différents, donc de lymphocytes avec une spécificité différente, et la réponse adaptative va reposer sur la capacité des cellules T ou B spécifiques d'un pathogène de subir une expansion clonale importante lors de la rencontre avec l'antigène. L'expansion clonale génère des populations cellulaires effectrices mais également une population, moins importante en nombre, de cellules dites mémoires qui persistent dans l'hôte et qui assurent la mémoire à long terme, la deuxième caractéristique importante de l'immunité adaptative. En effet, même si l'opposition fondamentale entre l'absence de mémoire de l'immunité innée et la mémoire assurée par l'immunité adaptative a été récemment nuancée par la mise en évidence de mécanismes de mémoire à court terme dans certaines cellules de l'immunité innée[18], il n'en reste pas moins que la mémoire à long terme est une spécificité de la réponse adaptative. Les cellules mémoires assurent les réponses secondaires, quantitativement et qualitativement supérieures aux réponses primaires, suite aux rencontres ultérieures de l'hôte avec le même pathogène.

Même si le processus génétique responsable de la production des récepteurs est partagé par les LT et les LB, le mode de reconnaissance de l'antigène et les fonctions effectrices de ces deux populations sont distinctes. Le BCR reconnaît l'antigène entier soit sous forme soluble, soit présenté à la surface de cellules présentatrices de l'antigène (APC) et la différenciation des LB qui s'ensuit aboutit à la production et à la sécrétion des anticorps spécifiques. Ainsi, les LB sont responsables de la réponse immunitaire humorale. Les LT, en revanche, ne sont pas capables de reconnaître l'antigène intact. Le TCR reconnaît des peptides issus de l'apprêtement de l'antigène par les APC présentés à la surface de ces dernières par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) conduisant à la différenciation des LT. Dans la phase effectrice, la reconnaissance des cibles par les LT est également médiée par la reconnaissance du complexe MHC/peptide par le TCR, rendant l'apprêtement de l'antigène nécessaire également à cette phase. La réponse immunitaire assurée par les LT est dite réponse à médiation cellulaire.

Un LB peut produire différents isotypes d'Ig (IgM, IgD, IgG, IgA et IgE) partageant tous la même spécificité (même parties variables et hypervariables des chaînes lourdes et légères) et différant dans la partie constante de la chaîne lourde. Les Ig peuvent être sécrétées ou associées à la membrane. Lorsqu'elles sont membranaires, les Ig sont associées aux sous-unités de signalisation $Ig\alpha$ et $Ig\beta$ et forment le BCR. Les LB se développent dans la moelle osseuse à partir du précurseur lymphoïde commun en passant par les stades pro-LB, exprimant les sous-unités $Ig\alpha$ et $Ig\beta$, pré-LB

exprimant un pré-BCR après recombinaison VDJ de la chaîne lourde et enfin LB immature, où la recombinaison VJ de la chaîne légère a eu lieu, exprimant un BCR IgM. Une partie des LB portant un BCR auto-réactif sera éliminée, subira une modification de leur récepteur (BCR editing) ou sera anergisée dans la moelle osseuse. La maturation post-médullaire des LB se poursuit au niveau de la rate avec les stades transitionnels au cours desquels une deuxième étape de sélection négative de LB auto-réactifs a lieu et un BCR IgD est exprimé en plus du BCR IgM. L'expression des IgM et des IgD se fait grâce à l'épissage alternatif de l'ARN codant pour la chaîne lourde. Ces deux étapes de maturation aboutissent au pool de LB naïfs matures composé des LB folliculaires conventionnels (80% des LB spléniques) qui peuvent migrer vers les ganglions lymphatiques et qui sont impliqués dans la réponse humorale dépendante des LT et des LB de la zone marginale qui assurent la réponse humorale thymo-indépendante. Lors de la rencontre avec l'antigène au cours d'une réponse immunitaire, les LB matures peuvent se différencier en plasmocytes produisant des IgM solubles. Ces plasmocytes génèrent une réponse humorale rapide mais de courte durée. Les LB peuvent également se différencier dans les centres germinatifs des organes lymphoïdes secondaires et dans ce cas ils vont subir au niveau du locus codant pour le BCR deux phénomènes importants : i) l'hypermutation somatique permettant la sélection de clones ayant une affinité améliorée pour l'antigène et ii) la commutation de classe (class switch) qui, par un mécanisme de recombinaison, permet le changement d'isotype de l'Ig vers une IgG, IgA ou IgE selon le site de l'affection et le type de pathogène. Cette différenciation conduit soit aux LB mémoires portant les IgG, IgA ou IgE de surface et assurant la mémoire à long terme soit aux plasmocytes sécrétant ces mêmes Ig et responsables donc des fonctions effectrices et dont une partie survit également à long terme et est responsable du maintien des titres d'anticorps permettant une protection prolongée. Dans les deux cas, l'IgD et l'IgM de surface ne sont plus exprimées.

La différenciation des lymphocytes B dépendants des T est aidée par une sous-population spécialisée de lymphocytes T CD4, les lymphocytes T CD4 auxiliaires folliculaires (T_{FH}). Au niveau des tissus lymphoïdes, après différenciation au cours de la réponse immunitaire, les T_{FH} se localisent dans la zone B, riche en CXCL13, grâce à l'expression du récepteur CXCR5 qui les caractérise[19]. Ces cellules sont aussi caractérisées par la production de l'IL-21 et par l'expression du represser de transcription BCL6. Il a été proposé que BCL6 réprime dans ces cellules l'expression des facteurs de transcription caractéristiques des autres sous-populations de lymphocytes T CD4 (T-bet/ T_{H1} ; GATA-3/ T_{H2} ; ROR γ t/ T_{H17})[20]. Ainsi, les T_{FH} qui se différencient dans le contexte d'une réponse immunitaire de type 1, 2 ou 3 vont exercer leur fonction

principale, à savoir l'aide au développement des plasmocytes et des LB mémoires, mais l'expression faible, mais existante, de T-bet, GATA-3 ou ROR γ t, respectivement, et des cytokines qu'ils contrôlent, orientera la commutation de classe vers l'isotype adapté à la réponse immunitaire en cours[20]. Les T_{FH} se différencient après reconnaissance de l'antigène présenté par les DC. Leur localisation dans les zones B, grâce à l'expression de CXCR5, leur permet de reconnaître l'antigène présenté par les LB spécifiques après sa liaison au BCR et son internalisation. L'expression d'ICOS et CD40L par les T_{FH} permet l'activation de LB grâce à leur interaction avec ICOSL et CD40, respectivement. L'interaction T_{FH}/LB peut avoir lieu au niveau folliculaire à l'extérieur des centres germinatifs où elle permet la différenciation des LB qui ont été préalablement sensibilisés (primed) en plasmocytes de courte durée de vie. Au niveau des centres germinatifs l'interaction T_{FH}/LB sensibilisé est essentielle à la différenciation des LB mémoires et des plasmocytes.

Le thymus, organe spécialisé dans la maturation et la sélection des LT, est constitué de lobes eux-mêmes divisés en plusieurs lobules constitués d'une zone corticale externe et une médullaire interne. Ces deux zones ont en commun la présence de cellules épithéliales et de fibroblastes et diffèrent au niveau d'autres populations cellulaires ainsi que par les caractéristiques de ces cellules. La zone corticale est densément peuplée par les thymocytes (LT immatures), alors que la zone médullaire est au contraire riche en macrophages, cellules dendritiques et LT matures. La maturation des thymocytes suit donc un gradient cortico-médullaire pour que les LT matures puissent ensuite être placés dans la circulation sanguine périphérique pour atteindre les organes lymphoïdes secondaires, lieu de rencontre avec les antigènes. Les zones corticale et médullaire diffèrent également par les caractéristiques des cellules qui les constituent et ces différences jouent un rôle dans la maturation des LT. Par exemple, la machinerie d'apprêtement de l'antigène dans les cellules épithéliales thymiques corticales (cTEC) est adaptée au processus de sélection positive. L'expression importante de molécules de costimulation dans la zone médullaire ainsi que l'expression ectopique de gènes codant pour des protéines tissulaires dans les cellules épithéliales thymiques médullaires (mTEC) vont quant à elles participer à l'étape de sélection négative.

Comme pour les LB, les recombinaisons V(D)J vont aboutir aux deux gènes codant les deux chaînes du TCR et leur expression permettra aux thymocytes d'interagir avec les autres populations cellulaires thymiques. L'expression d'un pré-TCR après la recombinaison de la chaîne β seulement permet aux thymocytes de recevoir des signaux de survie et pendant ce temps le réarrangement

de la chaîne α aura lieu. Les thymocytes qui vont entamer l'étape de sélection positive expriment un TCR fonctionnel associé aux chaînes du CD3 et sont double positifs (DP, $CD4^+/CD8^+$). La sélection positive a pour but de conserver les LT dont le récepteur est capable de reconnaître le MHC du soi, présent à la surface des cTEC, ce qui leur assurera en périphérie les signaux minimaux de stimulation dont leur survie dépend. L'étape de sélection négative permettra l'élimination (par apoptose) ou la neutralisation (induction d'anergie), parmi les thymocytes ayant passé la sélection positive, de ceux qui ont une affinité élevée pour les complexes MHC/peptides du soi et qui seraient ainsi auto-réactifs. Dans ce cas, les APC sont les DC de la zone cortico-médullaire ayant apprêté des antigènes du soi exprimés par les mTEC. Après cette étape, les thymocytes DP vont perdre l'expression d'un des co-récepteurs, CD4 ou CD8, et seront donc des LT $CD4^+$ ou des LT $CD8^+$ matures naïfs qui vont rejoindre, par la circulation sanguine et grâce à l'expression de certains récepteurs de chimiokines comme CCR7 et de molécules d'adhésion comme CD62L, les organes lymphoïdes secondaires. Contrairement aux gènes codant pour le récepteur des LB, ceux codant pour le récepteur des LT ne subiront pas de modifications somatiques.

Le TCR, formé des chaînes α et β , permet aux LT de reconnaître l'antigène constitué d'un peptide présenté par une molécule du MHC de classe I pour les LT CD8 et de classe II pour les LT CD4. Plusieurs régions du TCR participent à cette reconnaissance et les parties hypervariables (codées par les segments V(D)J) en déterminent la spécificité. L'interaction entre le TCR et le complexe MHC/peptide est consolidée par l'interaction entre les co-récepteurs CD4 et CD8 et les molécules de MHC de classe II et I, respectivement. Le TCR n'a cependant pas de fonction de transduction de signal. Cette fonction est réalisée par un complexe de trois protéines (ϵ , δ , γ) associées de manière non-covalente au TCR et connues sous le nom de CD3, et d'une autre protéine impliquée dans les processus de transduction du signal, la chaîne zêta (ζ). Le TCR, le CD3 et les chaînes ζ forment ce que l'on appelle le "complexe TCR", dans lequel la fonction de reconnaissance de l'antigène est réalisée par les chaînes α et β du TCR, tandis que la fonction de transduction de signal est déléguée aux protéines CD3 et ζ . En plus de la signalisation par le "complexe TCR", l'engagement des co-récepteurs CD4 et CD8 participe aux cascades de signalisation des LT. La signalisation par le complexe TCR et par les co-récepteurs intervient lors de la sélection thymique ainsi qu'en périphérie à toutes les étapes d'activation des LT matures (Fig. 4).

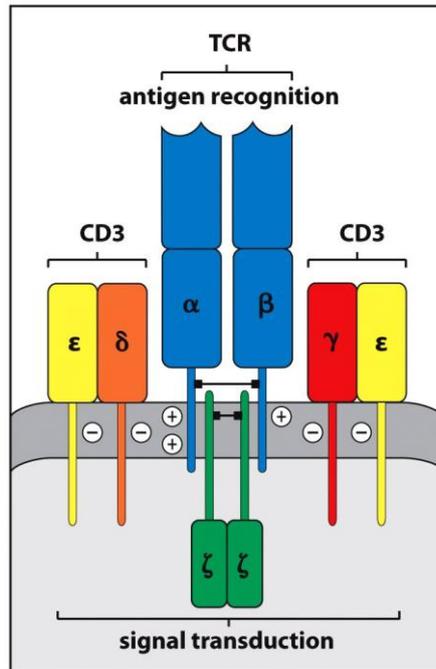


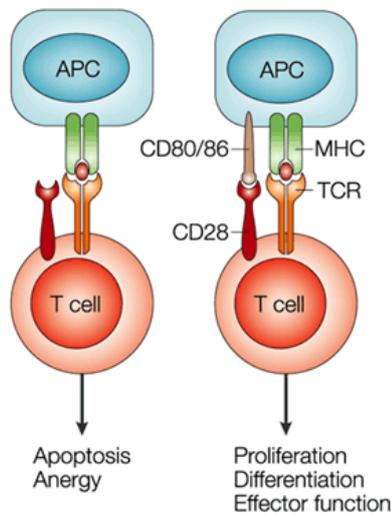
Figure 5.6 The Immune System, 3ed. (© Garland Science 2009)

Figure 4. Structure du récepteur de cellules T.

L'activation des LT naïfs lors de la première rencontre avec l'antigène dont ils sont spécifiques, qui a généralement lieu dans les ganglions lymphoïdes, conduit à l'expansion clonale et à la différenciation en LT effecteurs, dotés de différentes fonctions effectrices, ou mémoires, qui vont intervenir lors des rencontres ultérieures avec le même antigène. Les LT CD4 et CD8 qui se sont spécialisés, par la différence entre les molécules de MHC qui restreignent la reconnaissance (classe I et II) de l'antigène et par leurs fonctions effectrices distinctes, assurent des fonctions immunitaires distinctes et qui peuvent être complémentaires.

Les molécules de MHC de classe I sont exprimées dans toutes les cellules nucléées de l'hôte qui peuvent ainsi être reconnues par les LT CD8. Cette reconnaissance aura lieu lorsque ces cellules expriment des protéines du non soi, comme les protéines des agents pathogènes intracellulaires (virus, bactéries, parasites) et du soi modifié (antigènes des tumeurs). Ces protéines vont être apprêtées par la voie endogène de présentation de l'antigène et les complexe MHC classe I/peptides antigéniques seront présentés à la surface des cellules. Cependant, seuls les LT CD8 différenciés s'activeront en rencontrant ces cibles. En effet, l'activation des LT CD8 naïfs dépend des DC CD103⁺ qui, en plus de la signalisation par le complexe TCR et par le CD8, vont apporter les

signaux de co-stimulation (CD28/CD80/86 ; CD40L/CD40) indispensables à la différenciation de LT (Fig. 5).



Alegre M. L. *Nature Rev. Immunol.*, 2004

Figure 5. Reconnaissance du complexe CMH/peptide par les lymphocytes T. La liaison TCR-CMH/peptide envoie un signal d'activation au lymphocyte T. L'envoi d'un signal de co-stimulation par la cellule présentatrice de l'antigène est fondamentale pour l'activation fonctionnelle du lymphocyte, qui en absence de signal de co-stimulation subira peut faire face à anergie ou apoptose.

Les APC peuvent aussi être infectées par l'agent pathogène et dans ce cas l'antigène peut être apprêté par la voie endogène. Lorsque les APC ne sont pas directement infectées, elles doivent acquérir des antigènes exogènes (par endocytose, macropinocytose ou phagocytose), les apprêter et les présenter sur des molécules du CMH de classe I, par un mécanisme dit de présentation croisée. Cette voie permet aux antigènes de quitter les vésicules d'endocytose, de rejoindre le cytoplasme et d'être ainsi dégradés par le protéasome et de suivre par la suite la voie classique de présentation par les molécules de MHC de classe I. Bien que divers types d'APC peuvent présenter des antigènes modèles *in vitro*, la plupart des études indiquent que les cellules dendritiques (DC) sont les principales APC de présentation croisée *in vivo*[21]. Comme indiqué précédemment, les DC CD103⁺ et CD8α⁺ chez la souris[9] et CD141⁺ chez l'homme[9,22] semblent s'être spécialisées dans la présentation croisée. La capacité à présenter l'antigène aux lymphocytes T CD8 a été montrée pour les DC CD103⁺ murines qui migrent à partir des poumons[23,24] ou de la peau[25] vers les ganglions lymphatiques drainants.

La différenciation des LT CD8 permet, hors l'expansion clonale, l'acquisition des récepteurs de chimiokines qui les conduiront aux sites inflammatoires afin d'exercer leurs fonctions effectrices. La fonction effectrice principale des LT CD8 est la cytotoxicité, qui leur vaut le nom de LT cytotoxiques (CTL), et qui leur permet, par le relargage de vésicules contenant des protéines cytolytiques (ex. : perforine, granzymes)[26], d'induire la mort par apoptose des cellules exprimant l'antigène. Les CTL peuvent également produire et sécréter des cytokines effectrices (ex. : IFN- γ , TNF- α).

Les LT CD4 reconnaissent les peptides antigéniques présentés par les molécules du MHC de classe II dont l'expression constitutive est limitée aux APC professionnelles comme les DC, les LB, les monocytes, les macrophages, et les cellules épithéliales thymiques[27]. Leur expression peut être induite par les cytokines inflammatoires dans les APC non-professionnelles comme les fibroblastes, les cellules épithéliales ou les kératinocytes. Elles sont également exprimées, chez l'homme, dans les LT suite à leur activation. Certaines tumeurs, en particulier le mélanome, peuvent également exprimer les molécules de MHC de classe II sous le contrôle des cytokines inflammatoires. La présentation des antigènes par le MHC de classe II a donc lieu principalement dans les DC CD11b⁺ suite à leur internalisation par endocytose (médiée par des récepteurs), pinocytose ou phagocytose. L'antigène internalisé sera dégradé et les peptides issus de sa dégradation contrôlée se lieront aux molécules de MHC de classe II dans les endosomes (précoces et tardifs) et les complexes MHC/peptide seront transportés à la surface cellulaire. Les antigènes intracellulaires peuvent également accéder, grâce aux autophagosomes, aux voies de présentation de MHC de classe II et être ainsi présentés aux LT CD4. L'activation des LT CD4 a donc lieu principalement suite à la présentation de l'antigène par des APC professionnelles et est compatible avec le rôle central que jouent les LT CD4 comme cellules auxiliaires dans la différenciation des LT CD8 et dans la commutation de classe, l'hypermutation somatique et la différenciation des LB. Les LT CD4 jouent également des rôles effecteurs par la production de cytokines et de chimiokines qui peuvent agir sur le pathogène/la cible directement ou par l'intermédiaire du recrutement de cellules de l'immunité innée. Afin d'accomplir ces différentes fonctions suite à la rencontre avec l'antigène et en fonction des cytokines sécrétées par les APC conditionnées par le pathogène, les LT CD4 naïfs peuvent se différencier dans différentes sous-populations effectrices mémoires qui, par le profil des cytokines qu'elles produisent, vont orienter la réponse immunitaire adaptative et amplifier/orienter la réponse immunitaire innée les plus adaptées à l'élimination du pathogène. A cause de la complexité des sous-populations de LT CD4

et du fait que le travail expérimental présenté ici porte sur cette population cellulaire, nous consacrerons le prochain chapitre à la description des connaissances actuelles sur leur ontologie et leurs fonctions.

II. Rôle central des CD4 dans l'orientation de la réponse immunitaire adaptative

II. 1 Les lymphocytes T CD4 auxiliaires et régulateurs

Le contexte inflammatoire dans lequel est initiée la différenciation des LT CD4 naïfs et qui est lui-même déterminé par le pathogène/la situation pathologique va induire des sous-populations auxiliaires mémoires dotées des caractéristiques adaptées en terme de cytokines sécrétées et donc de fonctions effectrices et auxiliaires et en terme d'expression de récepteurs de chimiokines permettant la migration vers les sites d'inflammation pertinents. L'expression de ces molécules est régie par des facteurs de transcriptions qui sont considérés, pour certains, comme spécifiques de ces sous-populations et qui en orchestrent les fonctions. Ce fonctionnement a été appréhendé au cours des années 1980s et 1990s grâce aux études des deux sous-populations de LT CD4 auxiliaires T_H1 , caractérisées par la sécrétion de l'IFN- γ et l'expression du facteur de transcription T-bet, et T_H2 , qui produisent l'IL-4 et expriment le facteur de transcription GATA-3. Au cours des 15 années écoulées d'autres sous-populations de LT CD4, avec des fonctions spécialisées, ont été identifiées. Celles-ci incluent les T_H17 , les T_H9 , les T_H22 et les T_{FH} . De plus, les études récentes montrent que la spécialisation des T_H n'est pas figée et qu'au contraire un niveau de plasticité existe qui permet l'adaptation de ces populations à l'évolution de la situation pathologique.

En plus des cellules avec des fonctions auxiliaires, plusieurs sous-populations de LT CD4 ont des fonctions suppressives ou régulatrices et jouent des rôles importants dans le maintien de la tolérance, incluant la tolérance au microbiote, et dans le contrôle de l'amplitude des réponses immunitaires afin de préserver l'intégrité des tissus. Ces populations incluent les Treg caractérisés par l'expression du facteur de transcription FOXP3, les T_R1 caractérisés par la sécrétion de l'IL-10 et les T_H3 qui sécrètent le TGF- β . La plasticité observée entre les sous-populations T_H peut également toucher les populations régulatrices et amener aussi à la conversion de certaines populations régulatrices en populations auxiliaires pro-inflammatoires et vice-versa.

Ainsi les réponses T CD4, avec leur diversité, interviennent dans la réponse immunitaire aux pathogènes et aux tumeurs et dans le maintien de la tolérance au soi. Les réponses T CD4 peuvent

également faire partie d'une activation immunitaire elle même pathogénique comme c'est le cas dans les maladies auto-immunes et les allergies.

Dans les sous-chapitres suivants, nous aborderons les principales sous-populations auxiliaires et régulatrices, notamment les T_H17 et les Treg FOXP3⁺ sur lesquelles le travail expérimental a porté.

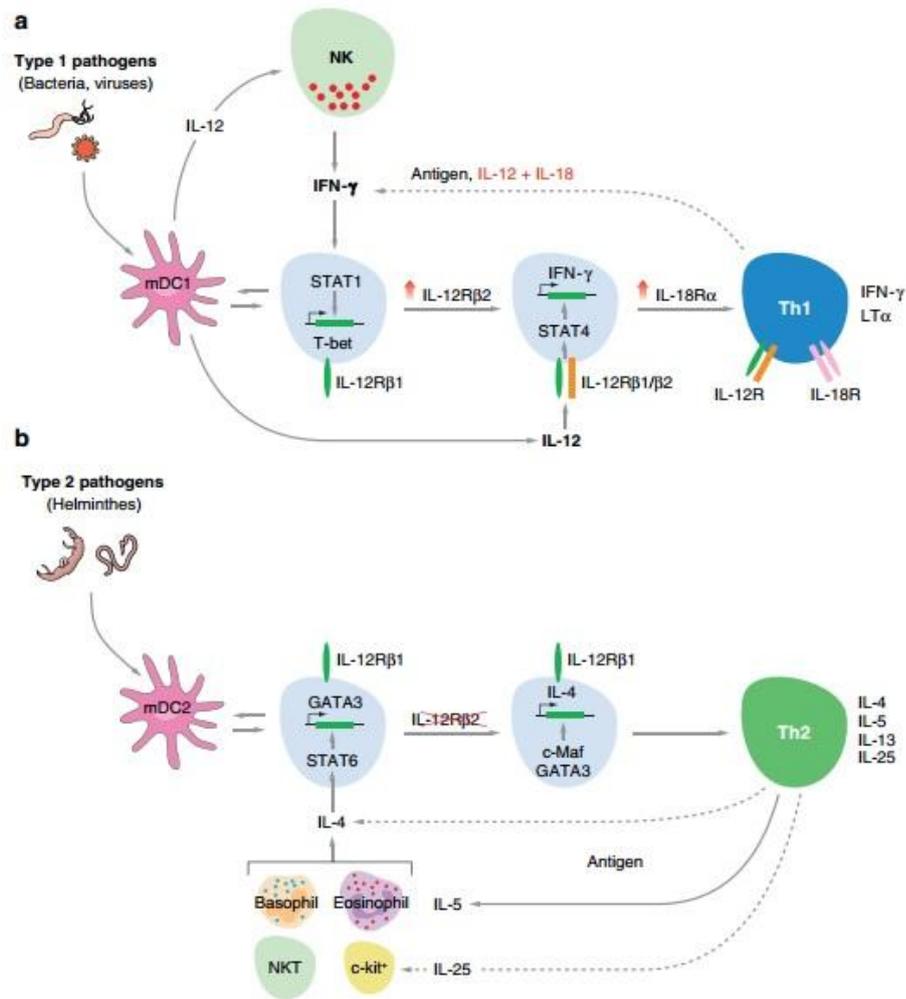
II. 2 Les sous-populations de lymphocytes T CD4 auxiliaires : Les lymphocytes T_H1/T_H2

Plusieurs preuves de l'hétérogénéité de la population des LT CD4 ont été accumulées jusqu'en 1978, quand *Tada et collègues*[7] ont utilisé les termes T_H1 et T_H2 pour désigner deux sous populations distinctes de cellules T CD4. Mais la démonstration définitive de cette première classification est arrivée seulement en 1986 grâce à Mosmann et Coffman[28] qui avaient exploité les nouvelles techniques telles que le clonage des cellules T et les essais de mesure de cytokines pour générer des populations clonales T_H murines et les caractériser en fonction de leur profil de production de cytokines. Notamment, dans l'étude menée par ces deux chercheurs, 22 clones différents ont été étudiés pour la production des cytokines telles que l'IL-2, l'IFN- γ et l'IL-4. Deux groupes de clones distincts ont ainsi été identifiés : les cellules de type 1 produisaient l'IL-2, l'IFN- γ , le GM-CSF et l'IL-3 en réponse à la stimulation par l'antigène ou par un mitogène; les cellules de type 2, en revanche, produisaient l'IL-3, l'IL-4 et un facteur de croissance des mastocytes (l'IL-5) en réponse à la stimulation. Ces deux sous-groupes ont été appelés, comme proposé par *Tada et al.*, cellules T_H1 et T_H2, respectivement.

Cependant, cette classification, qui avait été basée sur l'étude de clones murins cultivés *in vitro*, n'était pas si nette *in vivo*. En effet, un grand nombre des cellules produisaient des cytokines caractéristiques des deux sous-populations et ont ensuite été regroupées sous le nom de T_H0[29]. La consolidation du concept a donné lieu à d'intenses recherches sur les mécanismes d'induction, de développement et de régulation de ces deux sous-populations. Certaines des études initiales ont montré que, en fait, les cytokines produites par les T_H1 et les T_H2 pouvaient agir comme facteurs de croissance autocrine pour une poursuite de l'expansion de ces cellules, mais en même temps agir comme inhibiteurs de croissance pour le type cellulaire opposé, apportant ainsi un mécanisme de régulation réciproque de leurs activités[30]. Des études ultérieures ont montré que cette régulation réciproque intervient aussi au niveau de la différenciation de ces populations et au niveau du contrôle de leur capacité à produire des cytokines.

Les cytokines jouent un rôle central dans la différenciation des lignées T_H1 et T_H2 et cela par l'intermédiaire de l'induction ou l'augmentation de l'expression de facteurs de transcription et par la modulation de l'état de phosphorylation de différentes molécules STAT (signaling transducer and activator of transcription). La différenciation de LT CD4 naïfs en T_H2 a pu être démontrée *in vitro* et nécessite la présence d'IL-4 et d'IL-2 pendant la stimulation[31]. L'IL-4 par l'intermédiaire de STAT6[32], augmente l'expression du facteur de transcription qui régule l'activité des T_H2 , GATA-3, déjà exprimé à des niveaux faibles dans les LT CD4 naïfs[33]. Il est important de noter que la voie de différenciation T_H1 induit une diminution de l'expression basale de GATA-3 observée dans les cellules naïves[34]. L'expression de GATA-3 dans les T_H2 va réguler l'expression de l'IL-4, dans ce cas en coopération avec l'axe IL-2/STAT5 de l'IL-5 et de l'IL-13[35]. L'expression élevée de GATA-3 promeut également l'expansion des T_H2 en réponse aux signaux de croissance, comme ceux apportés par l'IL-2, par l'intermédiaire de molécules régulées par l'axe IL-4/STAT6 comme Gfi[36]. L'axe IL-2/STAT5 contribue également à l'expression de l'IL-4 dans les cellules T_H2 ainsi qu'à celle de l'IL-4R contribuant ainsi au maintien de la population. Finalement, GATA-3 contrôle le développement des T_H1 en induisant une baisse de l'expression de STAT4 et en réduisant ainsi la réponse des cellules à l'IL-12[37]. D'autres facteurs de transcription jouent également un rôle dans le développement ou les fonctions des T_H2 comme c-MAF, NFAT, IRF4, et JunB[38]. Une voie de différenciation des T_H2 *in vivo* indépendante de l'IL-4 dans les phases initiales a été décrite[39]. Cette voie dépend d'une signalisation faible par le TCR qui induit GATA-3[40]. Le fait que la cytokine principale produite par les T_H2 soit aussi celle qui induit leur différenciation a longtemps suscité le débat quant à la source initiale d'IL-4 dans ce processus. Différentes études ont suggéré que l'IL-4 peut provenir des basophiles[41], des cellules NKT[42] ou des LT CD4 eux-mêmes[43]. La différenciation des T_H1 a été aussi attribuée à la cytokine qu'ils produisent, l'IFN- γ , par exemple dans le modèle d'infection par *Leishmania major*[44]. Cependant, c'est avec la caractérisation de l'IL-12, décrite à l'époque comme une cytokine produite par les phagocytes et les LB et capable d'augmenter la cytotoxicité, la prolifération et la production de cytokines des cellules NK et des LT, que la différenciation des T_H1 commence à être mieux caractérisée[45]. L'IL-12 était capable d'induire *in vitro* la différenciation de cellules T_H1 même en présence d'Ac anti-IFN- γ . Par la suite il a été montré que la différenciation T_H1 est dépendante de l'IL-12 qui induit l'expression de T-bet par l'intermédiaire de STAT4 et qu'elle est amplifiée par l'IFN- γ qui induit également l'expression de T-bet à travers son action sur STAT1. T-bet, à son tour, induit l'expression de l'IFN- γ dans les T_H1 et induit l'expression de l'IL-12R β 2 augmentant ainsi la réponse des T_H1 à l'IL-12[46]. L'axe IL-

12/STAT4 joue également un rôle dans la survie et la croissance des T_H1 ainsi que dans l'expression de l'IFN- γ [46] (Fig.6).



Casey T. Weaver et al., *Annu Rev Immunol.* 2007

Figure 6. Modèle de différenciation des T_H1 et T_H2 . (a) La différenciation T_H1 est initiée par la signalisation coordonnée entre le TCR et les récepteurs de cytokines associées à STAT1. La signalisation STAT1 induit le facteur de transcription, T-bet (TBX-21), qui à son tour induit l'expression du gène qui code pour l'IFN- γ et régule positivement la chaîne inductible du récepteur de l'IL-12 (IL-12R β 2), dont l'expression permet la signalisation de l'IL-12 par STAT4. L'activation du récepteur de l'IL-12 en outre potentialise la production d'IFN- γ et induit l'expression de l'IL-18R α , conférant ainsi une réactivité à l'IL-18 par les cellules T_H1 [47]. Ainsi, l'IL-12, induite par les cellules immunitaires innées activées par la reconnaissance de l'agent pathogène, peut affecter le développement T_H1 par de multiples mécanismes; elle peut agir rapidement, en déterminant la production d'IFN- γ à partir de cellules NK, en conduisant la production d'IFN- γ dépendant de STAT4 en concert avec le TCR ou par la voie de signalisation de l'IL-18. (b) La différenciation des T_H2 est initiée par la signalisation TCR en concert avec la signalisation du récepteur IL-4 par STAT6. Les signaux qui proviennent du TCR et du récepteur de l'IL-4 agissent en coopération pour augmenter l'expression de GATA3, maître régulateur de la différenciation T_H2 . GATA3 auto-active sa propre expression et entraîne des modifications épigénétiques qui permettent l'expression de cytokines T_H2 (IL-4, IL-5 et IL-13), tout en supprimant les facteurs essentiels à la voie T_H1 , tels que STAT4 et la chaîne IL-12R β 2.

L'interaction directe, dans les phases initiales de la différenciation des T_H1 , entre une forme Tyrosine phosphorylée de T-bet et GATA-3 a été proposée comme un mécanisme de contrôle

négatif, par séquestration de GATA-3, de la différenciation T_H2 par le facteur de transcription de la lignée T_H1 [48].

Les fonctions des lignées T_H dépendent non seulement du type de cytokines qu'elles produisent, mais également de l'expression coordonnée d'un ensemble de récepteurs de chimiokines et d'autres récepteurs d'adressage (homing receptors) qui leur confèrent la capacité de migrer vers le site d'intérêt. Notamment, les T_H1 expriment préférentiellement les récepteurs CXCR3 et CCR5 qui leur permettent de migrer vers les sites exprimant les ligands de ces récepteurs (CXCL9, CXCL10 et CXCL11 pour CXCR3 et CCL3, CCL4 et CCL5 pour CCR5)[49]. Les cellules T_H2 expriment les récepteurs CCR4, à un degré moindre CCR3 et, pour certaines sous-populations de T_H2 , CRTH2[49]. L'expression des ligands de ces récepteurs peut être induite dans différents types cellulaires après exposition des tissus aux pathogènes et sous l'effet de cytokines (ex. : IL-1, TNF- α), y compris celles produites par les LT CD4 polarisés eux-mêmes (ex. : IFN- γ) ce qui permet d'entretenir leur recrutement aux sites d'intérêt.

Ces mêmes récepteurs sont également exprimés dans des populations de cellules de l'immunité innée permettant la colocalisation de ces populations qui peuvent jouer un rôle effecteur avec les populations T_H . Par exemple, l'expression élevée de CCR3 dans les basophiles et les éosinophiles permet leur migration avec les T_H2 aux sites de l'inflammation allergique où sont exprimés ses ligands eotaxin-1/CCL11, eotaxin-2/CCL24 et MCP-4/CCL13[50].

Les LT CD4 en se différenciant acquièrent donc la capacité de migrer aux sites appropriés de l'inflammation ainsi que la disposition à sécréter un ensemble de cytokines, ces deux propriétés leur permettant d'accomplir leurs fonctions, soit directement soit par la régulation d'autres types cellulaires. Les cellules T_H1 vont coordonner les réponses appropriées pour lutter contre les pathogènes intracellulaires (virus, bactéries, protozoaire)[51] et les cellules transformées[52]. Afin d'accomplir leurs fonctions physiologiques, les T_H1 orchestrent la réponse à médiation cellulaire notamment par l'IFN- γ , par l'activation des monocytes/macrophages[53] en fournissant l'aide au priming des LT CD8 cytotoxiques et au développement des LT CD8 mémoires[51]. Les cellules T_H1 peuvent également être directement responsables de la lyse des cellules cibles. Cependant, les réponses T_H1 incontrôlées sont également impliquées dans les maladies auto-immunes spécifiques d'organes. En revanche, l'immunité T_H2 est liée à la protection contre les parasites complexes tels que les helminthes[54], dont l'élimination dépend des basophiles, des mastocytes et des IgE (l'IL-4 étant la cytokine principale responsable du class switch vers l'isotype IgE dans les LB), et du

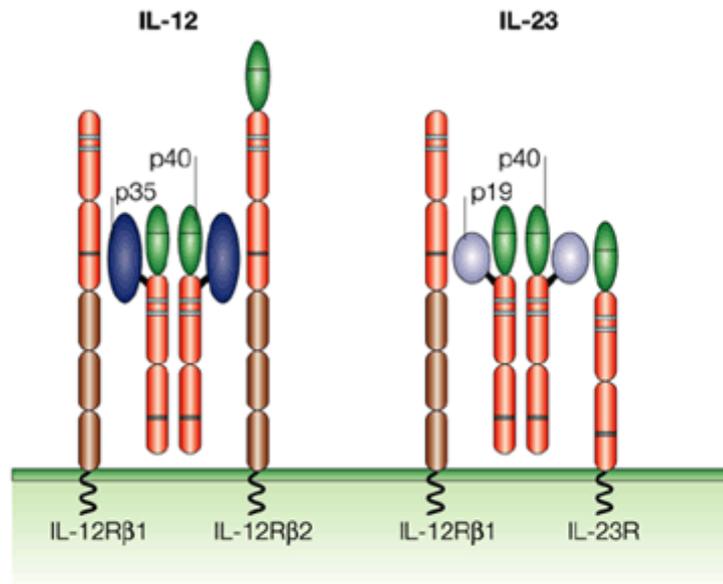
recrutement et activation des éosinophiles à travers les actions coordonnées des cytokines IL-4, IL-13, et IL-5. Les T_H2 sont aussi centraux dans la physiopathologie des allergies et de l'asthme. Par conséquent, T_H1 et T_H2 semblent avoir évolué pour coordonner leurs actions, afin de cibler plus efficacement des classes spécifiques d'agents pathogènes.

II. 3 Les lymphocytes T_H17

Malgré la découverte et la description des mécanismes d'élimination des différents agents pathogènes joués par les cellules T_H1 et T_H2 , la protection contre les bactéries extracellulaires et les champignons, ainsi que le recrutement des neutrophiles qui sont importants pour l'élimination de ces derniers, n'avaient pas encore été décrits. Avec la caractérisation d'une nouvelle population lymphocytaire auxiliaire, T_H17 , ce hiatus a été comblé et ainsi un modèle unifié de LT CD4 qui orchestre les monocytes/macrophages (T_H1), les mastocytes/basophiles/éosinophiles (T_H2) et les neutrophiles (T_H17) est maintenant établi.

II. 4. a. Identification des T_H17

La découverte de la lignée T_H17 est venue de modèles murins d'auto-immunité, notamment l'encéphalite auto-immune expérimentale (EAE) et l'arthrite induite par le collagène (CIA), qui avaient toujours été associés à des réponses T_H1 incontrôlées. Elle s'est basée en grande partie sur des études dans lesquelles le développement de ces maladies était aboli lorsque la sous-unité p40 de l'IL-12 était ciblée soit directement par des anticorps neutralisants soit indirectement dans des modèles murins génétiquement déficients pour celle-ci[55,56]. Cependant, le lien avec l'IL-12 a été questionné avec les travaux montrant qu'un nouveau membre de la famille de l'IL-12, l'IL-23, partage avec celle-ci la sous-unité p40[57]. En effet, l'IL-12 est un hétérodimère composé des sous unités p40 et p35, tandis que l'hétéro dimère IL-23 se compose de la chaîne IL-12p40 associée à l'IL-23p19 (Fig.7).



Trinchieri G., Nature Rev. Immunol., 2003

Figure 7. Composition de l'IL-12 et IL-23. La sous-unité p40 de l'IL-12 est associée non seulement à l'autre sous-unité de l'IL-12, p35, mais aussi à une autre molécule, p19, pour former une nouvelle cytokine hétérodimérique connue sous le nom d'IL-23. De plus, l'IL-23 se lie à un récepteur qui est formé par l'IL-12Rβ1 et une nouvelle deuxième chaîne, l'IL-23R.

Étant donné que les arguments expérimentaux clés reliant l'EAE et la CIA à une auto-immunité de type T_H1 étaient basés sur une protection de la maladie associée à des manipulations visant la sous-unité IL-12p40, il était devenu difficile de savoir si les effets protecteurs pouvaient véritablement être attribués à l'inhibition de l'activité de l'IL-12 ou s'ils impliquaient finalement l'IL-23. Ces données s'ajoutaient à celles obtenues dans un certain nombre d'études qui montraient une incompatibilité entre ces modèles de maladies auto-immunes et les cytokines T_H1. En effet, les souris déficientes en IFN-γ développent l'EAE et la CIA, de même que les souris déficientes en IFN-γR[58–61].

Grâce à des études ultérieures, ce paradoxe a été résolu en réexaminant la base immunopathologique de l'EAE et de la CIA utilisant des souris déficientes en IL-12, IL-23, ou les deux[62,63]. Le résultat était que le développement de la maladie était aboli dans les souris déficientes en IL-23, mais pas en IL-12. Ainsi, les souris déficientes pour la sous-unité IL-23p19 (absence d'IL-23 seulement), ou la sous-unité IL-12p40 (dépourvues à la fois d'IL-23 et d'IL-12) étaient résistantes à l'EAE et la CIA, alors que les souris IL-12p35 déficientes (défaut d'IL-12 seulement) restaient sensibles. Ainsi, il devenait clair que l'IL-23, et non l'IL-12, est liée à l'auto-immunité dans ces modèles murins.

De plus, des indices sur le possible rôle pathogénique de l'IL-23 provenaient d'études montrant que l'IL-23 était impliquée dans la production de la cytokine pro-inflammatoire IL-17 à partir de cellules CD4 effectrices et mémoires[64], qui, par la suite, ont été décrites comme une lignée de LT CD4 séparée, les T_H17.

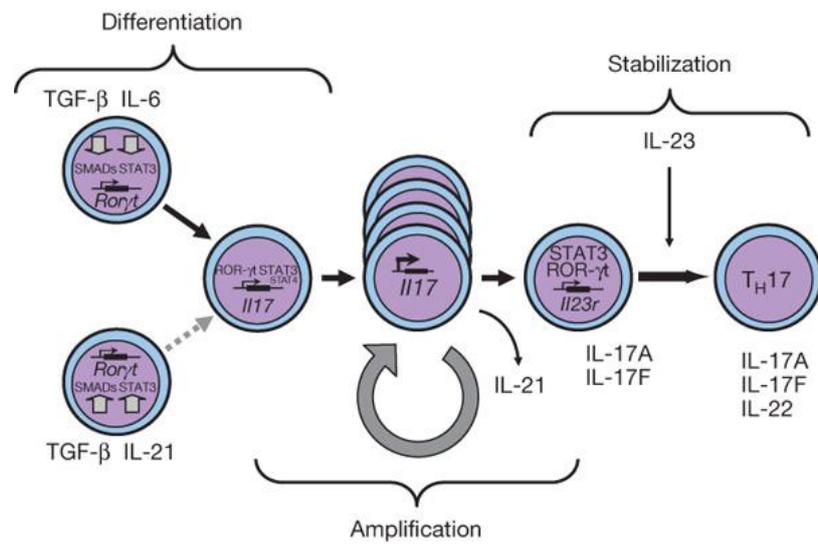
II. 4. b. Ontogénie des T_H17

L'IL-23, qui a permis l'identification des T_H17 comme sous-population distincte de LT CD4, a été jugée, au contraire, non indispensable pour leur différenciation. Toutefois, elle est fondamentale dans le développement et la survie de cette population et contribue à sa stabilisation et à ses propriétés inflammatoires[65]. Les cellules T_H17, qui sont définies par la production d'IL-17 et par l'expression du facteur de transcription ROR γ t (RAR-related Orphan Receptor gamma), déterminant moléculaire important pour leur différenciation et leurs fonctions[66], peuvent être générées *in vitro* à partir de LT CD4 naïfs en utilisant des cytokines spécifiques.

Notamment dans leur différenciation émerge un rôle central du TGF- β . Chez la souris, le TGF- β seul est essentiel à la différenciation des lymphocytes T régulateurs (Treg), mais, lorsqu'il est associé à l'IL-6, il oriente la différenciation vers la voie T_H17[67]. L'importance de l'IL-6 a été confirmée par des études qui ont montré qu'en inhibant l'expression de FOXP3 induite par le TGF- β , l'IL-6 altère la différenciation des cellules suppressives (Treg), conduisant à la génération de lymphocytes ROR γ t⁺ qui produisent l'IL-17.

Cependant, il a été montré que la déplétion des Treg dans les souris IL-6^{-/-} conduisait quand même au développement de l'EAE en raison d'une activité augmentée des T_H17 pathogéniques[68,69]. Cette dernière observation suggérait que les T_H17 pouvaient donc être générés même en absence d'IL-6. Ainsi, l'IL-21 a été identifiée comme cytokine pro-inflammatoire alternative aussi capable de supprimer l'induction de FOXP3 par le TGF- β [68,70]. L'IL-21, qui est produite en grande quantité par les T_H17, est capable par son activité autocrine d'amplifier la génération de ces cellules, notamment en absence d'IL-6[71]. Par ailleurs, une autre cytokine pro-inflammatoire, l'IL-1 β , a été aussi décrite comme un constituant important du milieu inflammatoire responsable de la différenciation des T_H17. En effet, cette cytokine est responsable de l'induction de l'IRF4 (Interferon Regulatory Factor 4), qui régule le mécanisme autocrine de l'IL-

21[72,73]. Au final, donc, la voie T_H17 une fois polarisée, est ensuite amplifiée et stabilisée par action de l'IL-21 et 23, chez la souris comme chez l'homme[74](Fig.8).



Bettelli E. et al., Nature, 2008

Figure 8. Etapes de la différenciation des T_H17. Différents facteurs contrôlent la différenciation initiale des cellules T_H17 à partir de cellules T naïves, l'amplification des précurseurs T_H17 et la stabilisation du phénotype des cellules effectrices T_H17. Alors que le TGF-β en même temps que l'IL-6 sont les facteurs de différenciation pour les cellules T_H17, l'IL-21, qui est produite par les cellules T_H17elles-mêmes, agit dans une boucle de rétroaction positive pour augmenter la fréquence des cellules T_H17. STAT3 est la molécule de signalisation essentielle pour la différenciation des cellules T_H17, car l'induction de l'IL-21 est tout à fait dépendante de STAT3 ; STAT3 est également critique dans les cascades de transduction du signal des récepteurs de l'IL-6, IL-21 et IL-23. En outre l'IL-23 stabilise les cellules T_H17 pour produire leurs cytokines effectrices IL-17A, IL-17F et IL-22.

Chez l'homme, cependant, l'association du TGF-β avec l'IL-6 n'est pas efficace dans l'induction de la différenciation de cellules T_H17. La première étude, qui avait pour but l'analyse de la différenciation des T_H17 humaines, a donné des résultats en contradiction avec les données murines, décrivant un effet inhibiteur du TGF-β associé à l'IL-2 sur la différenciation des cellules T_H17, montrant en revanche que l'IL-1β en association avec l'IL-6 était capable d'induire cette différenciation[75].

Le rôle du TGF-β a été clarifié dans des études ultérieures qui ont montré que des doses fortes inhibaient en effet la différenciation des T_H17 mais que des doses plus faibles étaient indispensables à leur différenciation[69,71,75]. La problématique concernant la compréhension du rôle du TGF-β est basée sur le fait qu'il est produit par différents types cellulaires et qu'il est physiologiquement présent dans le plasma, avec pour fonction de maintenir l'homéostasie des lymphocytes T[76]. Par conséquent, les études qui ont eu pour but de déterminer les conditions et

les cytokines nécessaires à la différenciation des T_H17 *in vitro* à partir de LT naïfs ont été réalisées de fait en présence de TGF-β qui était présent dans le sérum bovin ou humain utilisé pour enrichir le milieu de culture.

Des études récentes chez la souris, cependant, ont montré que la différenciation des T_H17 pouvait également avoir lieu en absence de TGF-β. En particulier, il y aurait deux voies possibles de différenciation: une incluant le TGF-β exogène qui, en combinaison avec l'IL-6 pourrait donner lieu à des T_H17 qui sécrètent l'IL-17 et l'IL-10; et une deuxième voie qui n'implique pas le TGF-β mais l'IL-6, l'IL-1β et l'IL-23 et qui conduit à la différenciation des cellules qui sécrètent l'IL-17 et l'IFN-γ, expriment T-bet et qui se sont révélées comme pathogéniques dans des modèles d'EAE[77]. De plus, des populations équivalentes, à savoir IL-17⁺/IL-10⁺ et IL-17⁺/IFN-γ⁺, ont été décrites chez l'homme comme étant spécifiques de *Staphylococcus aureus* et de *Candida albicans*, respectivement, avec un rôle prépondérant pour l'IL-1β dans la différenciation des cellules qui coproduisent l'IFN-γ[78]. En général, toutes ces découvertes nous indiquent qu'un environnement complexe composé de plusieurs cytokines, et non une cytokine spécifique, est essentiel pour la différenciation de ce type cellulaire.

II. 4. c. Rôle des T_H17 dans la défense immunitaire et dans les maladies auto-immunes

Les cellules T_H17 ont plusieurs actions biologiques mais parmi elles, la plus importante est la protection de l'organisme vis-à-vis des bactéries extracellulaires et des champignons. Leur champ d'action inclut principalement les épithéliums et les muqueuses. Ainsi, grâce à l'expression du récepteur de chimiokine CCR6[79,80], les T_H17 sont adressées vers les épithéliums affectés où l'IL-17 produite induit la production de protéines pro-inflammatoires, comme des cytokines (TNF-α, IL-6 et IL-1β), des chimiokines (CXCL1 et CXCL2), des protéines antimicrobiennes et des facteurs de croissance des leucocytes (G-CSF, GM-CSF), capables de recruter et/ou d'activer les polynucléaires neutrophiles et les macrophages. En conditions physiologiques, la voie T_H17 est active au niveau de la peau, des poumons et de l'intestin, constituant ainsi la première barrière contre les pathogènes extracellulaires. Des défauts dans la réponse T_H17 conduisent à des infections cutanées et pulmonaires récidivantes, comme les infections chroniques par *Candida albicans*, *Klebsiella* ou les staphylocoques. A ce propos, il a été montré que les souris IL-17R^{-/-}[81,82] et IL-23p19^{-/-}[83] sont hautement susceptibles aux infections par *Candida albicans*, *Klebsiella*

pneumoniae ou *Porphyromonas gingivalis*. De plus, chez l'homme, différentes formes de candidoses cutané-muqueuses chroniques héréditaires essentiellement à *Candida albicans*, qu'elles soient isolées ou associées à des manifestations auto-immunes ou à d'autres infections, ont été liées à des défauts dans la voie de l'IL-17 (ex. : défauts autosomique récessif de l'IL-17RA et autosomique dominant de l'IL-17F ainsi que des mutations de gain de fonction autosomique dominante de STAT1 conduisant à des défauts de différenciation des T_H17 IL-17)[84].

Diverses données expérimentales montrent une implication des cellules T_H17 aussi dans les maladies auto-immunes, non seulement dans des modèles animaux mais aussi chez l'homme. Dans ce dernier, cette cytokine a été trouvée dans le sérum et dans les organes de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde[85], de sclérose en plaques, de lupus érythémateux disséminé[86], ainsi que dans le liquide synovial des patients atteints d'arthrite de Lyme. De plus, une réponse T_H17 est impliquée dans la maladie de Crohn et dans la granulomatose de Wegener. Enfin, une étude récente a révélé une augmentation du système T_H17/IL-23 dans le syndrome Sjögren, avec une concentration élevée d'IL-17 et IL-23 dans le sérum, la salive et les glandes salivaires des patients[87].

II. 4. d. Mécanismes limitant la dangerosité des T_H17

Les cellules T_H17, en dépit de leur rôle pathogénique bien connu dans certains troubles inflammatoires, sont très peu fréquentes dans les sites inflammatoires[88]. Ce phénomène a conduit à la découverte de mécanismes ayant pour but de limiter la dangerosité de cette population importante pour la lutte contre les pathogènes mais dotée d'un potentiel inflammatoire puissant. Une première étude a montré comment ce phénomène est dû, au moins en partie, à la capacité limitée de ces cellules à proliférer, car elles présentent des anomalies dans la voie moléculaire qui permet la production d'IL-2 et, par conséquent, la prolifération cellulaire en réponse à la stimulation du TCR. En particulier, cela est dû à l'expression, dans les T_H17, de l'enzyme immuno-suppressive IL4I1 (IL-4 induced gene 1), une L-phénylalanine oxydase sécrétée. L'IL4I1 diminue l'expression de la chaîne CD3 ζ conduisant à des anomalies dans la voie moléculaire qui permet la production de l'IL-2 et la prolifération cellulaire suite à l'activation des cellules T[88]. Ce mécanisme a ensuite été approfondi par une étude qui a montré que l'expression élevée de l'IL4I1 maintient également des niveaux élevés de TOB1, un membre de la famille des protéines

antiprolifératives Tob/BTG (B-cell translocation gene), ce qui empêche la progression dans le cycle cellulaire après stimulation par le TCR[89].

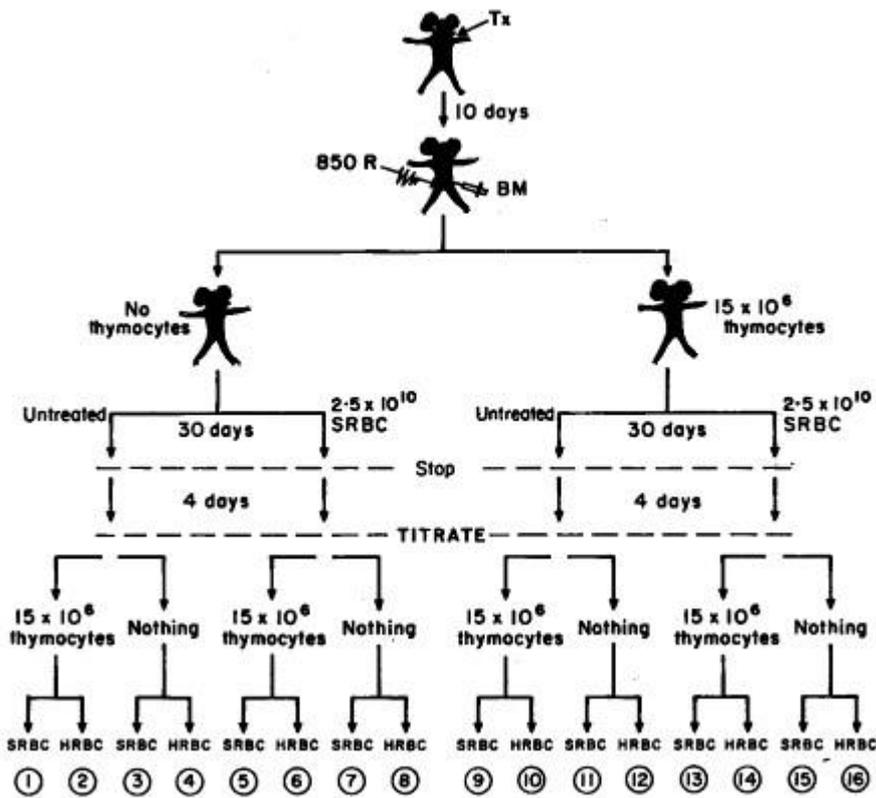
Un autre mécanisme régulateur impliqué dans la pathogénicité ou non des T_H17 a été proposé. Il est lié à l'expression de CD5L (CD5-like ou AIM/apoptosis inhibitor expressed by macrophages), un membre de la superfamille des récepteurs scavenger riches en cystéine. Parmi les T_H17, ce récepteur est principalement exprimé dans les cellules non pathogéniques et son expression baisse lorsque celles-ci sont exposées à l'IL-23[90], qui, comme décrit précédemment, leur confère un caractère pathogénique[77]. De plus, le manque de CD5L semble être lié au caractère pathogénique à travers la régulation du métabolisme des lipides. La modulation de la composition en acides gras des T_H17 qui expriment ou pas CD5L semble affecter la disponibilité de ligands de ROR γ t ainsi que sa liaison aux gènes cibles (*il17*, *il23r* et *il10*)[90].

II. 5. Les lymphocytes T régulateurs CD25⁺FOXP3⁺ (Treg)

La genèse du répertoire TCR étant aléatoire, elle résulte dans des LT auto-réactifs et des mécanismes de tolérance dite récessive existent dans le thymus et dans la périphérie afin d'éliminer ou d'anergiser de telles cellules. Cependant, des preuves expérimentales accumulées sur plusieurs décennies suggéraient que ces mécanismes ne pouvaient suffire à contenir l'auto-réactivité et que des cellules dotées de la capacité de contrôler en trans les cellules auto-réactives, donc des cellules qui assureraient une tolérance dominante, existent.

La production thymique de cellules pouvant exercer la tolérance immunitaire par la suppression d'autres cellules a été suggérée pour la première fois en 1969 dans une étude de Nishizuka et Sakakura[91]. Ils ont montré chez la souris qu'une thymectomie néonatale réalisée entre deux et quatre jours de vie conduit à l'apparition d'une inflammation surtout au niveau des ovaires des souris femelles, qui peut être contrôlée par la transplantation au septième jour après la naissance d'un thymus intact d'une souris adulte. Ce résultat avec ceux d'études ultérieures[92–94] montre qu'un sous-ensemble de cellules T générées dans le thymus des souris après trois jours de vie peut prévenir l'auto-immunité. Gershon et Kondo[95] ont proposé l'existence de cellules dérivées du thymus et qui assurent une fonction de tolérance. Ces deux chercheurs ont utilisé des souris adultes qui ont subi une thymectomie et qui ont été irradiées pour ensuite recevoir un transfert

de cellules de la moelle osseuse qui étaient associées ou non à un transfert de thymocytes. Des globules rouges de mouton (SRBC) ont été injectés après un certain délai, et seules les souris qui avaient reçu les thymocytes étaient capables de tolérer les globules rouges. L'interprétation de ces données les a amenés à proposer que l'induction de la tolérance était dépendante des cellules thymiques (Fig. 9).



R. K. Gershon and K. Kondo, *Immunology*, 1970

Figure 9. Approche expérimentale suivie par Gershon et Kondo.

La publication de l'article "cellules T suppressives" par Gershon et collègues en 1972 nomme pour la première fois une population de cellules T capables d'interférer avec les fonctions d'autres cellules T[96].

La difficulté de l'étude de cette population de cellules suppressives reposait dans l'absence d'un marqueur spécifique permettant de la définir et de la caractériser.

II. 5. a. Identification des Treg CD4⁺CD25⁺

Deux décennies plus tard en 1995, les efforts visant à trouver un marqueur spécifique des cellules suppressives ont été récompensés quand Sakaguchi et ses collègues ont montré que CD25 (la chaîne α du récepteur de l'IL-2) pouvait être un marqueur possible[97]. Leur travail démontre que le transfert de cellules T dépourvues de la fraction CD25⁺ produit en effet un ensemble de maladies auto-immunes chez les souris nues (dépourvues de thymus) receveuses, tandis que le transfert dans les mêmes souris de cellules CD25⁺ CD4⁺ inhibe, de façon dose-dépendante, le développement de l'auto-immunité. De plus les souris nues reconstituées avec la fraction CD25⁻ développent des réponses immunitaires plus fortes aux alloantigènes (greffe de peau) et xénoantigènes (immunisation avec des protéines) par rapport aux souris ayant reçu la fraction totale de LT. Les auteurs concluent que les cellules CD4⁺CD25⁺ contribuent au maintien de la tolérance en limitant les réponses immunitaires aux Ag du soi mais aussi aux Ag du non-soi par un mécanisme qui est cependant indépendant de la spécificité antigénique et proposent que des anomalies dans ce mécanisme de tolérance peuvent être à l'origine de certaines maladies auto-immunes. Cette étude a représenté un tournant dans la compréhension de la tolérance dominante et a permis, par l'identification d'un marqueur, la définition phénotypique des LT CD4 régulateurs (Treg) et leur caractérisation, qui se poursuit depuis. Par la suite il a été montré que ces cellules jouent un rôle dans la limitation de la réponse immunitaire anti-tumorale et dans le contrôle des allergies et qu'elles contribuent à la tolérance des greffons[98], du microbiote[99] et du fœtus[100]. En 2001 plusieurs publications décrivaient les Treg humains et montraient qu'ils étaient présents dans la circulation, les ganglions lymphatiques, le thymus et le sang du cordon ombilical[101]. La population représente environ 5% des LT CD4 dans la circulation.

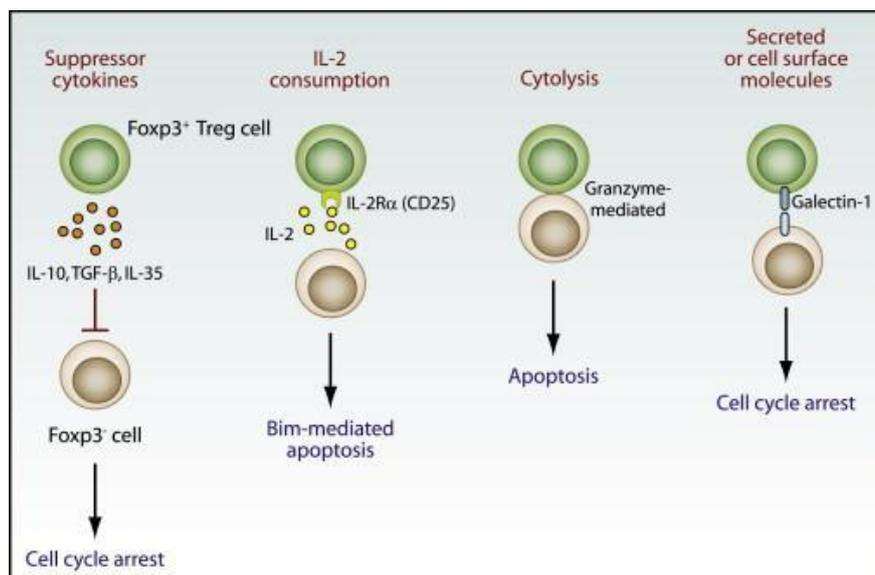
Les travaux réalisés chez la souris et chez l'homme durant les 20 années écoulées depuis la caractérisation phénotypique des Treg ont permis d'élucider la complexité de la population, ses mécanismes d'action, son ontogénie, ses rôles physiologiques dans la réponse immunitaire ainsi que sa participation à divers états pathologiques liés à l'immunité. Malgré leur complexité, les Treg ont certaines caractéristiques fondamentales communes, notamment l'expression de CD25 et du facteur de transcription FOXP3, l'anergie et la capacité à supprimer la prolifération des LT ainsi que certaines fonctions de LT et d'autres cellules de l'immunité (ex. : APC, NK, LB).

II. 5. b. Mécanismes de suppression

Un marqueur central des cellules Treg est le facteur de transcription FOXP3 (Forkhead Box P3), membre d'une famille de protéines caractérisées par leur domaine de liaison à l'ADN dit "Forkhead" sous forme d'homo- ou d'hétéro-dimères. FOXP3, est crucial pour le développement et les fonctions inhibitrices des cellules T régulatrices car il permet l'acquisition de la fonction suppressive et la stabilité phénotypique[102]. Il peut agir soit comme un répresseur soit comme un activateur de la transcription en fonction de ses interactions avec d'autres facteurs de transcription et avec des histones acétylases ou désacétylases.

Le gène codant pour Foxp3 a d'abord été identifié comme gène défectueux dans la souche de souris *Scurfy*[103]. Cette souche est caractérisée par une mutation récessive de ce gène liée à l'X, qui conduit à une hyper activation des LT et à la surproduction de cytokines pro inflammatoires[103]. Chez l'homme, les mutations du gène *FOXP3* ont été montrées comme étant la cause de la maladie génétique IPEX (Dérèglement Immunitaire, Polyendocrinopathie, Entéropathie, liés à l'X)[104,105]. Deux années après la mise en évidence du lien entre les mutations FOXP3 et les syndromes *Scurfy* et IPEX il a été montré que l'auto-immunité dans ces maladies résulte d'une perte des Treg et non d'un rôle intrinsèque de la protéine dans les LT CD25⁻ [102]. Cette étude a permis chez la souris de démontrer que FOXP3 est un régulateur central du développement et des fonctions des Treg. L'expression spécifique de FOXP3 dans les Treg humains a également été montrée[106]. Cependant, contrairement à la souris, une expression transitoire de FOXP3 dans les LT CD4⁺ humains après activation a été également décrite dans cette étude et dans d'autres[107,108] comme conduisant à l'acquisition de certaines propriétés suppressives transitoires[106] sans pour autant conduire à un phénotype régulateur stable[107,108]. Chez l'homme, même si l'expression de FOXP3 est essentiellement détectée dans les Treg, l'identification formelle des Treg repose sur l'état de méthylation de séquences précises dans le promoteur du gène FOXP3. En effet, il a été montré que l'expression stable de FOXP3 dans les Treg est régulée au niveau épigénétique[109] et est liée, chez l'homme et chez la souris, à un état de déméthylation du promoteur, qui reste par contre méthylé dans les LT CD4 humains non Treg activés et qui expriment FOXP3[110]. Cependant, une caractéristique phénotypique des Treg humains permet, en conjonction avec l'expression de CD25 et de FOXP3 leur identification non équivoque. Il s'agit de l'expression faible de CD127[111], la chaîne α du récepteur de l'IL-7, qui est, au contraire, exprimé à des niveaux élevés dans les LT CD4 conventionnels.

Les modèles *in vitro* ont identifié plusieurs molécules et mécanismes qui contribuent aux activités suppressives des cellules Treg. Une analyse détaillée de la fonction des cellules Treg est compliquée par le grand nombre de types cellulaires différents qui peuvent être directement influencés par les Treg. En fait, les Treg peuvent cibler les cellules répondeuses (mode d'action direct), les APC (mode d'action indirect), ou les deux[112]. La consommation de l'IL-2 semble être le principal mécanisme d'action suppressive directe, parmi ceux qui existent (Fig. 8). Les cellules régulatrices sont caractérisées par l'expression constitutive de CD25, qui est un composant du récepteur de haute affinité pour l'IL-2. Ainsi ces cellules, qui sont aussi anergiques et donc dépendantes de l'IL-2 exogène pour leur croissance, exercent la suppression par compétition pour l'IL-2 avec les lymphocytes cibles, privant ces derniers de la cytokine essentielle à leur prolifération et survie et les conduisant à une forme d'apoptose qui a été décrite comme pouvant dépendre du facteur pro-apoptotique Bim[113]. La cytolysse des cellules cibles par les voies granzymes et perforines a également été proposée comme un des mécanismes de suppression contact-dépendants et directs des Treg[114,115](Fig. 10).

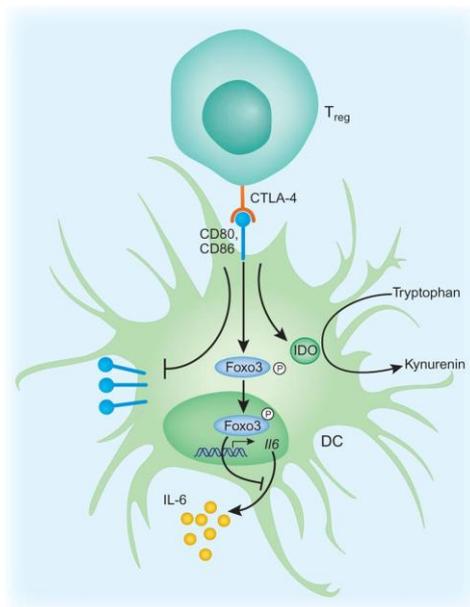


Shevac E. M., *Immunity*, 2009

Figure 10. Mécanismes directs de suppression. Les cellules Treg peuvent sécréter des cytokines suppressives qui peuvent inhiber directement la fonction des lymphocytes T répondeurs et des cellules myéloïdes. Les cellules Treg expriment hautement CD25, la chaîne α du récepteur de l'IL-2, et ont la capacité de rivaliser avec les cellules effectrices T pour l'IL-2 entraînant la privation de cette cytokine des cellules effectrices et l'apoptose médiée par Bim. Les cellules FOXP3⁺ Treg activées peuvent fonctionner comme des cellules cytotoxiques et tuer directement les cellules effectrices d'une manière similaire à des cellules CD8⁺ cytotoxiques. Les Treg activées peuvent exprimer des molécules connues (par exemple, la galectine-1) ou inconnues à leur surface cellulaire qui peuvent interagir avec des récepteurs sur les lymphocytes T effecteurs conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire. Tous ces mécanismes peuvent également être utilisés par les cellules Treg pour inhiber la fonction des cellules présentatrices d'antigènes ou d'autres cellules du système immunitaire inné.

La libération de cytokines suppressives est un autre mécanisme d'action des cellules T régulatrices qui produisent l'IL-10, le TGF- β et l'IL-35[116] pour inhiber les cellules cibles. Cependant chez l'homme, certaines études ont remis en question le rôle de l'IL-35[117,118].

L'inactivation catalytique de l'ATP extracellulaire par CD39 est un des modes de suppression indirects par les Treg. L'ATP extracellulaire, provenant des cellules endommagées, est un indicateur de mort cellulaire et de dommage tissulaire et a des fonctions pro-inflammatoires. CD39 est l'ecto-enzyme dominante dans le système immunitaire qui hydrolyse l'ATP ou l'ADP en AMP résultant, entre autres, dans une inhibition de la maturation de DC[119]. Les Treg peuvent également entraver les fonctions des APC par l'intermédiaire de CTLA4 (Cytotoxique Lymphocyte T antigène 4), qu'ils expriment, contrairement au LT conventionnels, de façon constitutive. CTLA4 réduit la capacité co-stimulatrice des APC en interagissant avec les molécules CD80 et CD86 exprimées sur ces dernières. Cette interaction entre en compétition avec la liaison de ces molécules à CD28 et réduit ainsi le signal de co-stimulation dans les LT. Un mécanisme de trans-endocytose a également été décrit comme conduisant à la baisse d'expression de CD80/86 à la surface des APC suite à leur interaction avec des cellules CTLA4⁺[120]. Il a également été suggéré que l'interaction CTLA4/CD80/86 conduit, par une signalisation dans les APC à travers CD80/86, à une augmentation du catabolisme du tryptophane par l'enzyme immunosuppressive IDO (indoléamine 2,3- dioxygénase)[121,122], générant des métabolites pro-apoptotiques qui entraînent l'inhibition des LT effecteurs (Fig. 11).



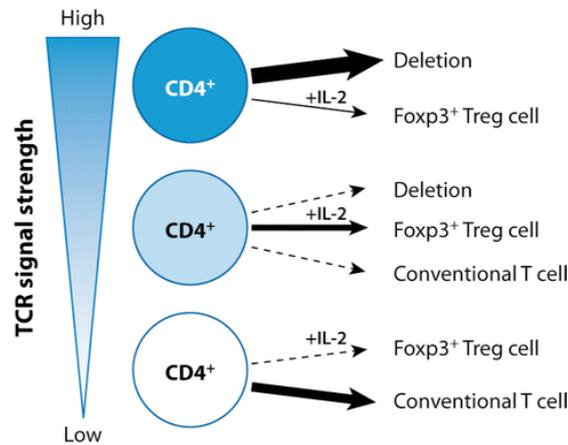
Kajsa Wing & Shimon Sakaguchi, Nature Immunol 2010

Figure 11. Interaction CTLA-4 et CD80/86 et induction d'IDO. CTLA-4 sur les cellules Treg peut déclencher la signalisation par CD80 et/ou CD86 sur les CPA. En plus de moduler directement ou indirectement l'expression de CD80 et de CD86, ces signaux peuvent activer l'indoleamine -2,3- dioxygénase (IDO), qui génère le médiateur immunosuppressif kynurénine.

II. 5. c. Treg naturels et induits : ontogénie, marqueurs et fonctions

Pour exercer de manière optimale leur fonction dans le maintien de la tolérance au «soi» et dans la limitation des réponses immunitaires excessives, les lymphocytes T régulateurs FOXP3⁺ comprennent au moins deux sous-populations[123–125]. La première comprend les Treg dit naturels (nTregs) qui se différencient dans le thymus au cours de la sélection des LT CD4⁺ et est supposée être enrichie en cellules spécifiques du «soi». La deuxième comprend les Treg dit induits (iTregs) qui sont générés dans la périphérie à partir de LT CD4⁺ conventionnels (CD25⁻). Notamment, on retrouve les Tregs induits dans certains sites, tels que l'intestin[126], où ils peuvent reconnaître des Ags dérivés des microorganismes commensaux.

Lors de la différenciation des Tregs naturels, l'interaction de leur TCR avec les complexes auto-antigènes/MHC des cellules du stroma thymique représente une étape clé. Dans le thymus, après la sélection positive, les thymocytes ayant une trop grande affinité pour les auto-antigènes subissent une étape de sélection négative et sont éliminés. C'est précisément à ce moment que des thymocytes évitent la sélection négative et s'engagent dans la voie Treg. Notamment l'intensité du signal TCR (avidité fonctionnelle) qui résulte de l'interaction des TCR des thymocytes CD4⁺ avec les complexes MHC/auto-antigènes des APC thymiques médullaires (surtout les mTEC[127]) mais aussi les DC thymiques ou d'origine périphérique), détermine le destin des thymocytes CD4⁺ et la différenciation des Tregs (Fig. 12). Lorsque ce signal est fort, la majorité des thymocytes CD4⁺ subissent une sélection négative (apoptose) tandis qu'une partie minoritaire peut survivre et devenir Treg; les thymocytes qui reçoivent des signaux d'intensité intermédiaire de leur TCR sont en mesure d'éviter la sélection négative et sont probablement la population qui contribue majoritairement au pool de Treg; enfin, la majorité des thymocytes recevant des signaux de faible intensité par le TCR sont sélectionnés et constituent la population de LT conventionnels. Ce processus de sélection conduit au pool de Treg qui ont une affinité pour les antigènes du soi plus élevée que celle des LT CD4⁺ conventionnels.



 Josefowicz SZ, et al. 2012.
Annu. Rev. Immunol. 30:531–64

Figure 12. L'intensité du signal TCR détermine le destin des thymocytes CD4⁺ et la différenciation des Treg. La force du signal TCR détermine le sort de thymocytes CD4⁺ et la différenciation des cellules T régulatrices. Les thymocytes CD4 positifs (SP) immatures reçoivent des signaux du TCR de force variée par l'intermédiaire d'interactions avec le complexe peptide-MHC sur les cellules présentatrices d'antigène. La force des signaux des TCR et leur durée déterminent le sort de thymocytes CD4 SP. Lors de la réception d'un signal fort du TCR, la plupart des thymocytes CD4 SP subissent la mort cellulaire programmée. Un certain nombre de thymocytes CD4 SP recevant des signaux TCR de force intermédiaire est en mesure d'échapper à la suppression et s'enrichit en cellules qui vont instruites à se différencier en cellules FOXP3⁺Treg.

Au niveau moléculaire, la signalisation forte par le TCR produit un pool de précurseurs de Treg qui sont encore FOXP3⁻ mais qui sont sensibles aux cytokines, surtout l'IL-2 mais un rôle pour l'IL-7 et l'IL-15 a été évoqué. Sous l'effet des cytokines, FOXP3 sera exprimé et va stabiliser le phénotype Treg[127,128]. CD28 a été décrit comme étant important dans le développement des précurseurs de Treg[129].

La différenciation des cellules Tregs naturelles dans le thymus est favorisée par l'affinité des interactions avec les complexes auto-antigènes/CMH, alors que la différenciation des Treg périphériques ou induits (iTreg) se produit probablement en réponse à des antigènes autres que les antigènes du soi, tels que les allergènes, les antigènes alimentaires et les commensaux. Le concept actuel de la différenciation des iTreg est basé sur une première étude qui a montré que la stimulation in vitro des LT CD4⁺ CD25⁻ naïfs en présence d'IL-2 et de TGF-β conduit à l'induction de l'expression de FOXP3 et donc à l'acquisition de la capacité suppressive[130]. Il a été également mis en évidence le fait que les iTreg peuvent être générés dans un environnement fortement tolérogène, tel que l'intestin, suite à l'activation de LT CD4⁺ conventionnels avec certaines APC. A ce propos Coombes et collègues ont montré qu'une population de DC intestinales, caractérisées par l'expression de CD103, conduit à l'induction de Treg FOXP3⁺, après reconnaissance de

l'antigène, qui est dépendante du TGF- β et de l'acide rétinoïque [131]. La génération de cellules iTreg a été aussi observée dans des contextes inflammatoires, dans divers modèles de maladies inflammatoires telles que l'asthme, l'arthrite, la colite, le diabète et l'EAE, et aussi dans l'allo transplantation afin d'inhiber les réponses effectrices excessives[132].

La spécialisation des iTreg et nTreg soutenant un rôle non redondant pour les deux populations est corroborée par les fonctions distinctes de 2 des 3 séquences d'ADN non-codant conservées (CNS) présentes dans le gène codant pour FOXP3. En effet, la CNS3 régule l'expression de FOXP3 lors de la différenciation des Treg dans le thymus et dans la périphérie. En revanche, la CNS1, qui lie le complexe TGF- β -NFAT, a été montré comme n'étant pas nécessaire pour le développement des nTreg et jouant un rôle majeur dans la différenciation périphérique des iTreg[133]. De façon intéressante, il a été montré que la CNS1 est apparue au cours de l'évolution chez les mammifères placentaires et il a été suggéré que cette évolution a pu être nécessaire pour permettre la tolérance aux allo-antigènes paternels et a été exploitée secondairement pour participer à la tolérance aux microorganismes commensaux[134].

Bien qu'il soit aujourd'hui admis que ces deux populations de Treg ont des fonctions physiologiques spécialisées, leurs spécificités antigéniques qui permettraient de mieux comprendre leurs rôles respectifs et de concevoir des stratégies thérapeutiques permettant de les manipuler, commencent seulement à être explorées. Des travaux qui ont été réalisés dans des souris transgéniques afin d'explorer le répertoire TCR des Treg intestinaux, acteurs principaux de la tolérance du microbiote, ont donné des résultats contrastant avec certains montrant un chevauchement important avec celui des Treg thymiques[135] et d'autres, au contraire, soutenant leur origine périphérique[126]. Plus récemment, un rôle direct du microbiote intestinal, et en particulier du butyrate, un acide gras à chaîne courte (SCFA: short chain fatty acid) produit par la fermentation de l'amidon par des bactéries intestinales, dans la différenciation colique des Treg a été mis en évidence[136,137]. En appui à cette hypothèse, il a été montré que l'induction de FOXP3 en présence du butyrate était dépendante de la CNS1[137] par acétylation de l'histone H3 au niveau de cet élément grâce à l'activité d'inhibiteur d'histone déacétylase (iHDAC) du butyrate[136]. Ces études ont cependant montré que le butyrate seul ne suffisait pas à induire la différenciation des iTreg dans les souris germ free (GF) ou traitées par des antibiotiques et la présence de bactéries, probablement comme source d'antigènes, était donc indispensable. En particulier les souches commensales de Clostridia ont été identifiées comme importantes dans

l'induction des Treg coliques, lorsqu'elles sont introduites dans des souris GF. Certaines de ces souches sont capables de produire du butyrate mais les mécanismes impliqués dans l'induction des Treg après colonisation et la spécificité des Treg induits n'ont pas été explorés. Alors que l'ensemble de ces études suggère fortement une implication primordiale du microbiote dans le développement des iTreg, la spécificité antigénique de ces derniers reste aujourd'hui inconnue chez l'homme et chez la souris.

Une des difficultés majeures dans l'étude des iTreg et nTreg est la quasi-identité phénotypique des 2 populations définies toutes 2 par l'expression de CD25 et de FOXP3 et, chez l'homme, par le niveau faible d'expression de CD127[111]. Chez la souris, le récepteur de NRP- 1 de surface (Neuropiline-1) est exprimé par les nTregs mais pas par les iTregs[138,139]. Cependant, des études ultérieures ont montré que ce récepteur chez l'homme est exprimé seulement faiblement, et aux mêmes niveaux que dans les cellules conventionnelles, empêchant ainsi son utilisation en tant que marqueur pour distinguer ces deux populations[140]. Cependant, Helios, un facteur de transcription de la famille Ikaros, a été proposé en 2010 comme un marqueur spécifique des nTreg[141]. Ce concept a été remis en question par des études montrant que les Treg induits pouvaient exprimer Helios[142] à des niveaux qui sont cependant inférieurs à ceux détectés ex vivo dans les Treg. Cependant, mon équipe d'accueil a montré que les Treg du cordon ombilical, supposés être d'origine thymique, étaient tous Helios⁺[143] et que les Treg Helios⁻ circulants mémoires chez l'homme, qu'elle a pu séparer grâce à la définition d'une combinaison de marqueurs de surface[144], expriment Aiolos, un membre de la famille Ikaros impliqué dans la différenciation des iTreg[145]. De plus, des proportions significatives des Treg mémoires Helios⁻ produisent des cytokines, notamment l'IL-10, l'IL-17 et l'IFN- γ , en réponse à la stimulation[144]. L'ensemble de ces travaux soutient l'hypothèse de l'expression spécifique d'Helios dans les nTreg.

II. 5. d. Treg humains naïfs et mémoires

Lors de l'identification de la population Treg, celle-ci a été décrite comme étant composée, dans la circulation, de cellules mémoires. En analysant les marqueurs de différenciation cellulaire exprimés par les Treg chez l'homme, notre laboratoire a montré en 2005 que la population de Treg humains est composée de cellules ayant un phénotype naïf (NTreg ; CD45RA⁺CCR7⁺CD62L⁺) et de cellules mémoires (MTreg ; CD45RA⁻CD56RO⁺CCR7^{+/-})[146]. En plus de la définition phénotypique indicatrice de leur statut de cellules naïves, les NTreg ont des télomères qui ont une longueur comparable à celle des télomères des LT CD4 naïfs CD25⁻ et ont également un contenu

de TREC (T cell receptor excision circles) comparable à celui de ces dernières[146]. Les NTreg, comme les MTreg, sont anergiques et suppresseurs mais ils ont une capacité plus importante à se diviser *in vitro* lorsqu'ils sont stimulés par le TCR en présence d'IL-2 exogène[146]. La population a été mise en évidence ultérieurement par d'autres laboratoires[147–149] et sa capacité à proliférer *in vitro* est exploitée afin de générer des populations Treg qui sont actuellement utilisées dans le cadre d'essais cliniques de transfert adoptif dans le but de contrôler la réaction du greffon contre l'hôte lors de la greffe[150]. Lors de l'identification des NTreg, notre laboratoire a proposé qu'ils correspondent à la population de Treg naturels (nTreg) sélectionnés dans le thymus et qui représentent un réservoir périphérique qui acquiert un phénotype mémoire au cours de son engagement dans différentes situations inflammatoires[146].

La capacité de cette population à se diviser *in vitro* a permis la mise en évidence de son auto-réactivité, c'est dire sa capacité, contrairement aux LT CD4 naïfs conventionnels, à se diviser en réponse à la stimulation par de DC autologues ce qui appuyait son origine thymique. De plus, la population NTreg représente la totalité des Treg dans le sang du cordon alors les MTreg représentent la quasi-totalité des Treg dans les sites de l'inflammation comme les tumeurs[151]. La disponibilité des Ac monoclonaux anti-Helios a permis l'évaluation de son expression dans les NTreg et a révélé que 30% parmi eux sont Helios⁻[152]. Les auteurs de cette étude, en prenant comme postulat l'origine forcément thymique des NTreg, ont interprété les données comme une remise en question de Helios en tant que marqueur des nTreg. Cependant, notre laboratoire a montré par la suite que les NTreg du sang du cordon sont composés exclusivement de cellules Helios⁺ ce qui suggère qu'à ce stade précoce après leur sélection dans le thymus les nTreg expriment Helios[143]. La question de l'origine, thymique ou périphérique, de la population NTreg Helios⁻ reste cependant ouverte et difficile à investiguer chez l'homme puisque les NTreg, qu'ils soient Helios⁺ ou Helios⁻, ne produisent pas de cytokines. La population MTreg, quant à elle, est composée de 30% de cellules Helios⁻ parmi lesquelles se trouvent, comme décrit dans le chapitre précédent, les iTreg capables de produire des cytokines (Fig. 13).

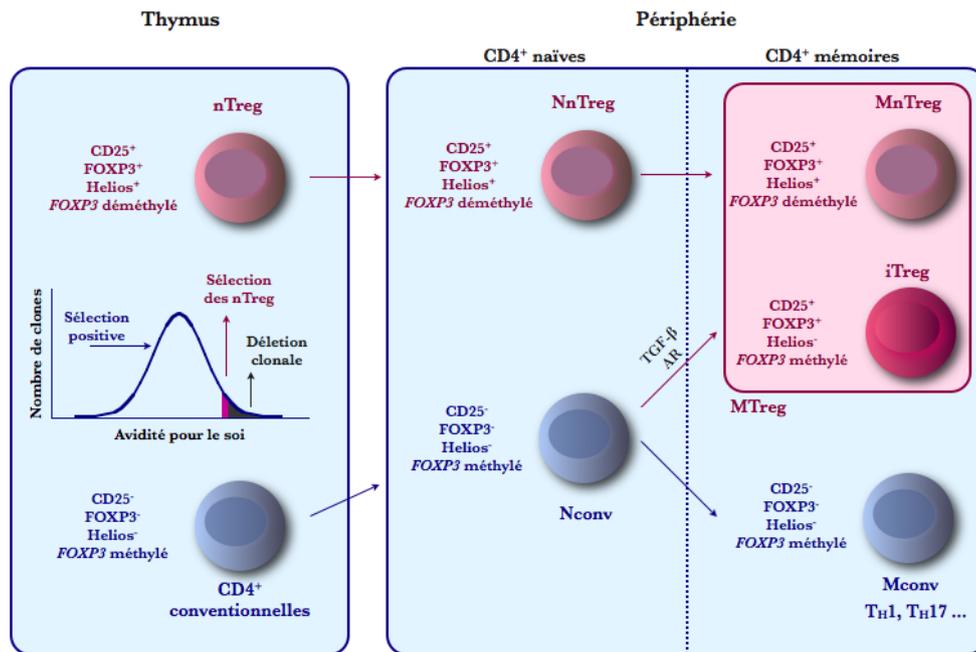


Figure 13. Tregs humains naïfs et mémoires. La population de Treg humains est composée de cellules ayant un phénotype naïf et de cellules mémoires. Les Treg naïfs (NTreg) pourraient correspondre à la population de Treg naturels (nTreg) sélectionnés dans le thymus et qui représentent un réservoir périphérique qui acquiert un phénotype mémoire au cours son engagement dans différentes situations inflammatoires. Les Treg mémoires (Mtreg) incluent les iTreg ou treg induits qui se développent à partir de cellules Naïves dans la périphérie.

II. 6. Plasticité des T_H17 : relations avec les Treg et les T_H1

II. 6. a. T_H17 et Treg

L'implication du TGF- β comme cytokine centrale dans les voies de différenciation des iTreg anti-inflammatoires et des T_H17 pro-inflammatoires, à partir de précurseurs naïfs, a suscité l'investigation des relations potentielles entre ces deux populations cellulaires. En effet, dès la mise en évidence de l'importance du TGF- β dans la différenciation des T_H17 murins un lien a été supposé avec les iTreg dans la différenciation desquels le rôle de cette cytokine était déjà apprécié[153]. Cette première étude montrait que le TGF- β seul induisait la différenciation des Treg et qu'en présence d'une cytokine inflammatoire, l'IL-6, le TGF- β n'induisait pas l'expression de FOXP3, cette combinaison conduisant au développement de cellules produisant l'IL-17. De plus, il a été montré que FOXP3 antagonise les fonctions de ROR γ t et que, réciproquement, STAT3 activé par les cytokines inflammatoires impliquées dans la différenciation des T_H17 , régule négativement l'expression de FOXP3[154,155]. Ces études proposaient une dichotomie et une réciprocité dans le développement de ces deux populations. Ce concept a été renforcé par des

études montrant que dans les tumeurs humaines et murines la fréquence des deux populations pouvait être régulée de façon réciproque par l'IL-2 qui favorise la croissance des Treg et limite celle des T_H17[156]. Sans pour autant questionner ces résultats, des études ultérieures ont enrichi notre vision des relations entre ces deux populations qui se sont avérées plus complexes, notamment avec la mise en évidence de populations de LT CD4⁺ exprimant à la fois FOXP3 et RORγt.

Une première étude a montré qu'une fraction des cellules RORγt⁺ chez la souris exprime FOXP3[157]. Les cellules exprimant les deux facteurs de transcription produisent de l'IL-10 ainsi que la chimiokine CCL20 et sont suppressives. Celles qui expriment uniquement RORγt produisent l'IL-17 et expriment CCR6. La fréquence relative des deux populations ne variait pas même au cours de l'inflammation mais les variations dans le milieu cytokinique influençaient réciproquement leur capacité à produire les cytokines IL-10 et IL-17. Du fait que CCL20 est un ligand de CCR6, exprimé dans les T_H17, les auteurs ont suggéré que sa production par les cellules RORγt⁺FOXP3⁺ pouvait servir à attirer spécifiquement les T_H17 afin d'inhiber leur activité. Chez l'homme, une population Treg FOXP3⁺RORγt⁺ a été mise en évidence par mon laboratoire d'accueil et par d'autres investigateurs[158,159]. Une proportion de ces cellules, contrairement à celles identifiées chez la souris, produit de l'IL-17 tout en exerçant des fonctions suppressives. Les Treg IL-17⁺ sont contenus dans la fraction Helios⁻ et correspond donc à des iTreg[141,144]. De plus, en conditions inflammatoires, avec un rôle central pour l'IL-1β, les Treg mémoires humains peuvent se convertir en cellules FOXP3⁻ qui produisent de l'IL-17[160,161]. Le lien étroit entre Treg et T_H17 a également été renforcé par une étude de notre laboratoire montrant que la différenciation des T_H17 humains *in vitro* était plus importante lorsque la population naïve de départ était composée de Treg plutôt que de LT CD4⁺CD25⁻ conventionnels[162].

Certaines maladies auto-immunes résultent d'un déséquilibre entre les proportions de Treg et de T_H17 et un débat a surgi autour du rôle potentiel de la plasticité des Treg dans l'apparition de la maladie. Les fonctions suppressives des Treg sont régulées par FOXP3 dont l'expression, chez l'homme et chez la souris, est régulée par l'IL-2 à travers STAT3 et STAT5[163,164]. Chez la souris il a été montré que les cellules FOXP3⁺ sont constitués d'une fraction majoritaire CD25^{high}, avec une expression stable de FOXP3, et une population CD25^{low}, moins importante en proportion, caractérisée par une expression instable de FOXP3 et qui peut se convertir en cellules T_H[165]. Plus récemment, dans un modèle murin d'arthrite, la conversion des cellules FOXP3⁺CD25^{low} en T_H17

sous l'influence de l'IL-6 produite par les fibroblastes synoviaux a été proposée comme ayant un rôle dans la maladie *in vivo*[166]. Ces cellules T_H17/exFOXP3 avaient une activité ostéoclastogénique plus importante que celle des T_H17 différenciés à partir de précurseurs naïfs. Le même groupe a mis en évidence une population de cellules FOXP3⁺IL-17⁺ dans le liquide synovial de patients ayant une polyarthrite rhumatoïde active et a suggéré que cette population pouvait jouer un rôle dans cette pathologie chez l'homme[166].

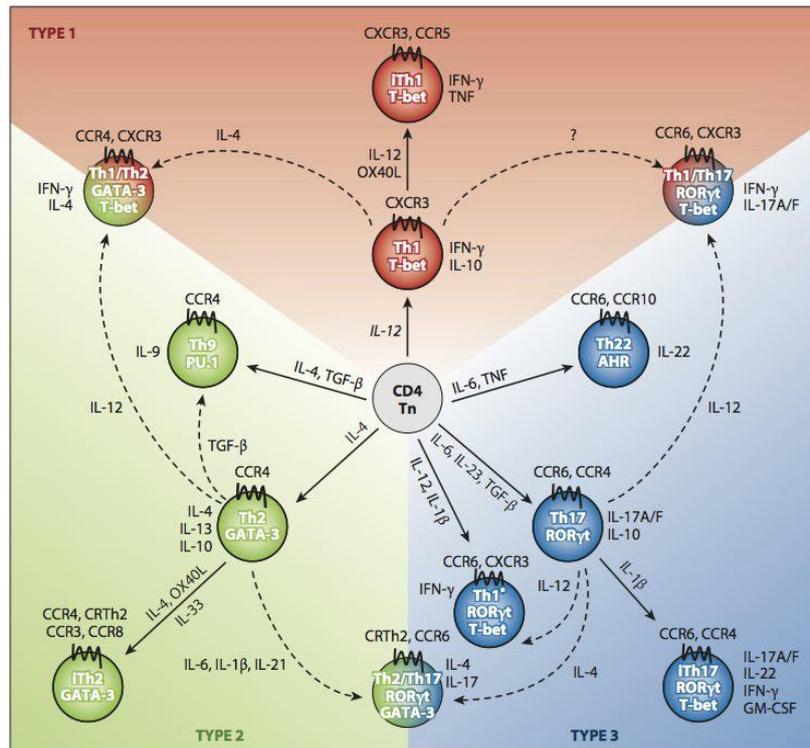
En plus de la régulation des voies T_H17 et Treg par les cytokines présentent au moment de la différenciation ou au cours des différentes situations inflammatoires, il a été montré que HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1), le facteur de transcription qui régule la réponse cellulaire à l'hypoxie avec un passage vers un métabolisme dominé par la glycolyse, pouvait réguler l'équilibre entre Treg et T_H17. Au niveau des T_H17, HIF-1 α augmente la transcription du gène *RORC* et, en coopération avec ROR γ t, active la transcription de l'IL-17. De plus, au niveau des Treg l'expression de HIF-1 α augmente la dégradation de la protéine FOXP3 en l'adressant vers le protéasome[167]. Suite à l'activation par l'antigène les besoins énergétiques des lymphocytes T augmentent et pourraient être assurés par une augmentation de la glycolyse. De façon intéressante, il a été montré que les conditions de différenciation des T_H17, mais pas celles de la différenciation des Treg, augmentent la glycolyse et que les T_H17 expriment HIF-1 α [168]. Dans ces deux études, il a été montré que l'altération de la balance T_H17/Treg en défaveur des T_H17 dans des souris déficientes en HIF-1 α conduit à une sévérité moindre de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale *in vivo*.

Dans le but d'explorer la possibilité d'exploiter la plasticité des T_H17 à des fins thérapeutiques, des investigateurs ont étudié les conditions qui pourraient conduire à leur conversion, en sens inverse, en cellules ayant des propriétés anti-inflammatoires. En utilisant un modèle murin de traçage cellulaire (ou fate-mapping) *in vivo*, ils ont montré qu'au début de la résolution de la réponse inflammatoire des cellules qui exprimaient précédemment l'IL-17 se convertissaient en cellules dotées d'une activité régulatrice et d'une signature transcriptionnelle en accord avec cette propriété nouvelle[169]. Cette « trans-différenciation » est dépendante du TGF- β et de l'Ahr (aryl hydrocarbon receptor). Les auteurs ont proposé que la plasticité dans ce cas peut contribuer à la résolution de l'inflammation et pourrait être exploitée pour concevoir des interventions thérapeutiques dans les maladies inflammatoires.

II. 6. b. T_H17 et T_H1

Une étude qui visait à mieux caractériser les cellules T_H17 chez l'homme a conduit à l'observation de la présence d'une sous-population de cellules qui coproduisent l'IL-17 et l'IFN- γ . Ces cellules étaient caractérisées par l'expression simultanée de CCR6 (typiquement exprimé par les T_H17) et de CXCR3 (typiquement exprimé par les T_H1) et étaient spécifiques de *Mycobacterium tuberculosis*. En revanche les cellules productrices d'IL-17, enrichies dans la fraction qui exprime CCR6 et CCR4 mais n'exprime pas CXCR3, proliféreraient en réponse à *Candida albicans*. Cette étude suggère que des contextes inflammatoires différents (*Mycobacterium tuberculosis* versus *Candida albicans*) peuvent conduire à des réponses T_H17 ayant des profils de production de cytokines et des capacités migratoires distincts[79]. Une autre série d'études a proposé une origine différente des cellules T_H17 qui produisent l'IFN- γ . Ces travaux ont montré que les deux populations de cellules, T_H17 et T_H17/T_H1 (coproductrices d'IFN- γ), étaient présentes à des proportions élevées dans les intestins de patients atteints de maladie de Crohn[170]. Des clones dérivés de ces deux populations exprimaient le récepteur de l'IL-12 et répondaient à IL-12 par une diminution de l'expression de ROR γ t et de l'IL-17 et par l'induction ou l'augmentation de production de l'IFN- γ . Ces résultats suggéraient donc une plasticité des T_H17 vers la voie T_H1 pouvant conduire à un phénotype pathogénique impliqué dans des maladies auto-immunes. Récemment, il a été montré que les cellules T_H17 mémoires humaines sont enrichies dans la fraction de LT CD4⁺CD161⁺[171,172]. Dans le fluide synovial des enfants atteints d'arthrite juvénile idiopathique, la proportion de cellules CD4⁺CD161⁺ ayant un profil T_H17/T_H1 ou T_H1, plutôt que T_H17, est plus élevée que dans le sang périphérique. La fréquence des cellules CD4⁺CD161⁺ avec un profil T_H17/T_H1 dans le fluide corrèle positivement avec les signes biologiques d'inflammation. De plus l'analyse des clonotypes des cellules CD161⁺ au niveau du fluide synovial a montré une similarité du répertoire V β du TCR entre les cellules T_H17 et T_H1 d'un même patient. Ces résultats suggéraient fortement que la conversion des T_H17 en T_H1 pouvait bien avoir lieu *in vivo*. Ces résultats étaient appuyés par le fait que les cellules T_H17 des fluides synoviaux se convertissaient rapidement *in vitro* en cellules T_H1 même en l'absence d'apport cytokinique exogène. Ces résultats appuient le rôle des cellules T_H17/T_H1 dans cette maladie auto-immune[173]. Une étude conduite par mon laboratoire d'accueil a montré comme la conversion des cellules primées comme T_H17 vers un profil T_H1 pouvait également avoir lieu *in vivo* lors des réponses immunitaires aux antigènes des tumeurs[174]. Dans cette étude une réponse mixte T_H17 et T_H1 contre l'antigène

MAGE-A3 a été détectée chez un patient atteint d'un cancer bronchique non à petites cellules. L'analyse de la spécificité fine de la réponse ainsi que du répertoire V β du TCR a montré qu'il y avait chez ce patient deux réponses initiées d'emblé comme T_H1 (CCR6⁻CXCR3⁺) et T_H17 (CCR6⁺CCR4⁺CXCR3⁻) et qui reconnaissaient des parties différentes de l'antigène. Cependant, les clonotypes T_H17 se retrouvaient, à un stade plus avancé de différenciation, dans la fraction CCR6⁺CXCR3⁺ et, dans ce cas, ces cellules spécifiques produisaient de l'IL-17 et de l'IFN- γ ou de l'IFN- γ uniquement. La question de l'origine des cellules T_H17/T_H1 (coproductrices d'IL-17 et d'IFN- γ) ainsi que des cellules T_H1 exprimant CCR6 en plus de CXCR3 (appelées T_H1*, ex-T_H17 ou T_H1-like selon les études) reste encore débattue dans la littérature[51,175]. Elle est probablement mixte dans certains cas primée en tant que telle en réponse à certaines infections et dans d'autres résultant de la conversion des T_H17 dans certaines conditions inflammatoires (Fig. 14).



Sallusto F., *Annu Rev Immunol.* 2016

Figure 14. Devenir et plasticité des cellules. Les lymphocytes T naïfs activés par le TCR et des signaux de co-stimulation sont exposés à différents indices de polarisation qui induisent l'expression de facteurs de transcription distincts de la lignée spécifiant et se traduisent par la génération de sous-ensembles de cellules T helper ayant des propriétés fonctionnelles distinctes, telles que la production de cytokines et l'expression de récepteurs de chimiokines.

Le caractère pathogénique de la plasticité des T_H17 a été également mis en évidence dans les maladies chroniques inflammatoires de l'intestin par une étude dans un modèle murin de colite où

la transition des cellules T_H17 à T_H17/T_H1 était nécessaire à l'apparition de la maladie et dépendait de l'expression de T-bet et dans une moindre mesure de STAT4[176]. Cette étude excluait cependant un rôle pour l'IFN- γ ou l'IL-12 dans cette transition. Les auteurs proposaient que cette voie réconcilie les données obtenues chez l'homme et chez la souris montrant à la fois un rôle majeur pour l'IL-23 et la signature T_H17 dans ces maladies qui restent cependant associées à l'accumulation dans les lésions inflammatoires, en plus des T_H17 , de cellules ayant une signature T_H1 . Chez la souris, les termes T_H17 pathogéniques et non-pathogéniques ont été associés respectivement aux cellules dérivées *in vitro* en présence d'IL-1 β , IL-6 et IL-23 et qui induisent une auto-immunité sévère lorsqu'elles sont transférées *in vivo* et à celles dérivées en présence de TGF- β et IL-6 qui n'induisent pas de maladie[77,177]. Plus récemment, en analysant le profil d'expression génique au niveau des cellules isolées (single-cell-RNA-Seq) obtenues des ganglions lymphoïdes drainant et du système nerveux central aux cours de la phase aiguë de l'encéphalomyélite expérimentale, des cellules ayant des profils T_H17 pathogéniques et non-pathogéniques ont été retrouvées[178]. Cette étude a permis d'identifier des voies de régulation et des facteurs qui pourraient permettre de mettre au point des stratégies thérapeutiques visant à cibler de façon différentielle l'une ou l'autre de ces populations.

Malgré l'implication claire des T_H17 dans les maladies autoimmunes et leurs modèles murins, les souris déficientes en IL-17, contrairement à celles déficientes en IL-23, ne sont pas résistantes à l'induction de l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE). Plusieurs études ont montré que la pathogénicité des lymphocytes T CD4 dans le modèle EAE est due à la production du GM-CSF qui est responsable à son tour du recrutement des cellules myéloïdes[179,180].

Ces études ont montré que la production de GM-CSF est induite par l'IL-23 et par ROR γ t. Ces résultats sont en accord avec les études citées ci-dessous et qui impliquent l'IL-23 dans le développement des T_H17 pathogéniques. Plus récemment, il a été montré que l'IL-1 est également impliquée dans la différenciation des cellules T_H17 GM-CSF⁺[181]. Le rôle du GM-CSF produit par les lymphocytes T CD4 dans la sclérose en plaques a récemment été suggéré par l'étude de clones de lymphocytes T mémoires obtenus de patients et qui montre une plus forte proportion de cellules qui produisent du GM-CSF, de l'IL-17 ou de l'IFN- γ chez les patients en comparaison aux donneurs sains[182]. Une autre étude explorant les populations lymphocytaires T CD4 chez l'homme a cependant montré que la production de GM-CSF semble liée à l'axe IL-12/T-bet/ T_H1 plutôt qu'à l'axe IL-23/ROR γ t/ T_H17 [183]. Dans cette même étude une population GM-CSF⁺ qui

n'exprime ni les facteurs de transcription ni les cytokines des T_H1 , T_H2 ou T_H17 a de plus été identifiée.

II.7. Les autres populations de LT CD4

II. 7. a. Les autres populations de LT CD4⁺ auxiliaires

Mis à part les principales populations de LT CD4 effecteurs, d'autres sous-populations effectrices sont importantes dans l'activité de l'immunité adaptative. Parmi celles-ci les T_H9 sont caractéristiques pour la production de l'IL-9. Les premières évidences concernant cette population sont apparues en cultivant des T_H2 complètement différenciées en présence de TGF- β ; après culture une population de cellules productrices d'IL- 9 était mise en évidence [184]. Une autre étude a ensuite montré que la même combinaison de cytokines peut générer des LT CD4 qui produisent l'IL-9 à partir de lymphocytes T naïfs et que la signalisation de l'IL- 4 conduit a la différenciation de cellules T_H9 en partie par la suppression de l'habilité du TGF- β dans l'induction du FOXP3[185]. De plus, il a été montré les T_H9 expriment de manière exclusive le facteur de transcription PU-1, ce qui suggère que ces cellules pourraient être considérées comme une sous-population distincte et unique[186].

Une autre sous-population de LT CD4⁺ produit IL-22 mais pas IL-17 ni IFN- γ [187,188]. Ces cellules, nommées T_H22 , seraient générées à partir de LT CD4⁺ après stimulation avec IL-6 et TNF, et en conséquence de leur expression de récepteurs des chimiokines comme CCR4, 6 et 10 pourraient jouer un rôle dans la défense immunitaire au niveau de la peau, des voies respiratoire et de l'intestin.

Les lymphocytes T auxiliaires folliculaires (T_{FH}) ont été trouvés dans la périphérie à l'intérieur des follicules de cellules B d'organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions lymphatiques, la rate et les plaques de Peyer, et sont identifiés par leur expression constitutive du récepteur de « homing » aux follicules des lymphocytes B CXCR5[19]. Lors de l'interaction cellulaire avec les cellules B folliculaires (Fo B), les cellules T_{FH} déclenchent la formation et le maintien des centres germinatifs à travers l'expression du ligand de CD40 (CD40L) et la sécrétion d'IL-21[189] et IL-4[190]. Dans les centres germinatifs, les cellules T_{FH} jouent un rôle critique dans la médiation de la

sélection et la survie des cellules B qui continuent à se différencier soit en cellules plasmiques spécifiques capables de produire des anticorps d'affinité élevée contre un antigène étranger, soit en cellules B à mémoire capables de réactivation immunitaire rapide, si le même antigène est à nouveau rencontré. Le facteur de transcription essentiel à la différenciation des T_{FH} qui a été mis en évidence est BCL-6[191].

II. 7. b. Les autres populations de LT $CD4^+$ suppressive

Comme pour les cellules effectrices, parmi les cellules régulatrices qui classiquement sont définies par l'expression de $FOXP3^+$, des sous-populations régulatrices de LT $CD4^+$ $FOXP3^-$ avec une activité suppressive, ont été identifiées. En particulier les lymphocytes T régulateurs de type 1 (T_r1) exercent leur activité suppressive à travers la sécrétion d'IL-10, TGF- β et l'expression de CTLA-4 ou la production de granzymes et perforines. En effet, il a été montré que ces cellules n'expriment pas FOXP3[192], et que dans le cadre du syndrome IPEX, les T_r1 étaient présents dans la périphérie des patients mais insuffisantes pour maintenir la tolérance au soi[193]. En outre, il a été montré que le facteur de transcription AhR (Aryl hydrocarbon Receptor), induite par l'IL-27, à son tour produite par les cellules dendritiques tolérogènes, agit en synergie avec c-Maf pour promouvoir le développement des cellules T_r1 [194].

Une autre sous-population caractérisée par de propriétés régulatrices est représentée par les T_H3 . Ces cellules se localisent au niveau des tissus lymphatiques associés aux muqueuses et produisent IL-4, IL-10 et TGF- β [195,196]. Le TGF- β stimule la production des IgA à partir des lymphocytes B et en même temps a une fonction suppressive vis-à-vis des T_H1 en inhibent les processus inflammatoires et auto-immunes médiés par ces dernières, suggèrent l'implication des T_H3 dans la tolérance orale.

Un autre type de population régulatrice, nommée iT_{35} (IL-35 dependent induced Treg) sécrète la cytokine immuno-régulatrice IL-35 et se développe suite à l'activation en présence d'IL-35[197].

Finalement, une population de Treg qui n'expriment pas FOXP3 mais qui exprime le facteur de transcription FoxA1 a été décrite et appelée FoxA1 $^+$ Treg[198]. Ces cellules se développent en réponse à l'inflammation incontrôlée dans le système nerveux. FoxA1 dans ces cellules induit l'expression de PD-L1 (programmed cell death ligand 1) qui a été impliqué dans leur capacité à induire la mort des lymphocytes T activés (PD-1 $^+$). Dans cette même étude il a été montré que le

développement de ces cellules est dépendant de l'IFN- β . Les patients atteints de sclérose en plaques et qui répondent favorablement au traitement par l'IFN- β semblent avoir des proportions augmentées de cellules circulantes FoxA1⁺ après traitement en comparaison aux patients non répondeurs ou aux prélèvements obtenus avant traitement.

III. Les enzymes immunosuppressives

Mis à part les 10 acides aminés qui peuvent être synthétisés *de novo* par les voies métaboliques de l'organisme, les autres acides aminés sont apportés par l'alimentation et pour cela sont nommés « essentiels ». Pour exercer leurs fonctions et proliférer, les cellules de mammifères acquièrent les acides aminés via le milieu extracellulaire. Par conséquent, la disponibilité des acides aminés, et surtout des acides aminés essentiels, à travers un approvisionnement constant, tout comme l'activité des enzymes qui les dégradent, sont d'une importance primordiale pour le fonctionnement de nos cellules, y compris les cellules de l'immunité.

Le catabolisme des acides aminés est assuré par différentes voies de dégradation, chacune caractérisée par une enzyme particulière et des activités immunosuppressives ont été mises en évidence pour quatre d'entre elles impliquées dans le métabolisme d'acides aminés essentiels ou semi-essentiels. Notamment, le catabolisme de l'acide aminé semi-essentiel arginine est caractérisé par l'activité des enzymes arginase I (Arg-I) et la synthétase inductible de l'oxyde nitrique (iNOS) tandis que les acides aminés essentiels tryptophane et phénylalanine sont catabolisés par l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO) et une phénylalanine oxidase codé par le gene 1 induit par l'IL-4 (*IL4I1*), respectivement. Par ailleurs d'autres acides aminés comme la cystine/cystéine, la glutamine et l'histidine et les enzymes impliquées dans leur dégradation pourraient également exercer un rôle immunosuppresseur.

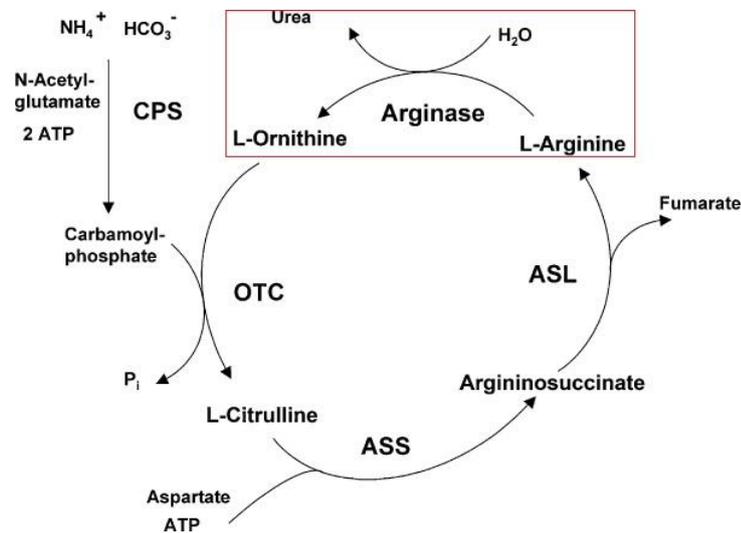
L'activité de ces enzymes donne lieu à un mécanisme immunosuppresseur commun par la privation d'acides aminés du milieu extracellulaire. Ce manque d'acides aminés et les perturbations dans la synthèse protéique qui s'en suivent jouent un rôle négatif sur l'immunité innée[199] et adaptative[200]. Notamment cet effet est la conséquence de l'action de la protéine kinase GCN2 (General Control Nonderepressible 2), qui contient un domaine kinase et un domaine allostérique qui répond à la présence des ARNt lorsqu'ils ne sont pas chargés avec des acides aminés. Ainsi, la carence d'un ou de plusieurs acides aminés ainsi active la kinase GCN2 qui conduit

à la phosphorylation de la cible eIF-2 α (facteur d'initiation eucaryote 2 alpha) qui à son tour bloque la traduction ribosomale d'un grand nombre d'ARNm et, de manière sélective, augmente la traduction de certains transcrits. En plus des signaux négatifs transmis par la privation en acides aminés, les catabolites résultant de leur dégradation par les différentes enzymes peuvent également jouer des rôles immunosuppresseurs, notamment par l'inhibition des fonctions des cellules T et par l'induction de leur apoptose[201]. L'importance de l'homéostasie des acides aminés a également été mise en évidence dans l'immunité intestinale épithéliale et l'homéostasie du microbiote intestinal. L'enzyme 2 de conversion de l'angiotensine I (ACE2 ; Angiotensine I Converting Enzyme 2) contrôle l'expression intestinale du transporteur d'acides aminés neutres (incluant le tryptophane) B0AT1. Dans un modèle de souris déficientes pour l'ACE2, le traitement par l'irritant intestinal DSS (dextran sodium sulphate) entraînait une colite sévère qui pouvait être inversée par l'administration de l'acide aminé essentiel tryptophane[202]. Un régime alimentaire sans protéines chez les souris WT (wildtype) pouvait également conduire à une colite sévère induite par le DSS comparable à celle des souris ACE2 mutantes. De plus, la transplantation du microbiote modifié des souris mutantes ACE2 dans des souris GF (germfree) transférait la propension de ces dernières à développer une colite sévère.

Dans les prochains paragraphes seront résumées les voies métaboliques des trois acides aminés dont le catabolisme est lié à l'immunosuppression ainsi que les principales conséquences de ces voies sur les cellules immunitaires.

III. 1. Métabolisme de l'arginine (Arg-I et iNOS)

L'arginase catalyse la dernière étape du cycle de l'urée, notamment la conversion de la L-arginine en L-ornithine et urée (Fig. 15).



Munder M., Br J Pharmacol. 2009

Figure 15. Réaction catalysée par l'arginase. L'arginase fait partie du cycle de l'urée. En particulier, elle catalyse la réaction qui conduit à la production de L-Ornithine accompagnée de formation d'urée à partir de L-Arginine et H_2O .

Chez les mammifères, l'arginase existe sous deux isoformes, arginase I et II avec une identité de séquence en acides aminés de 60%. Ces deux enzymes sont codées par deux gènes distincts et diffèrent par leur localisation cellulaire, leur distribution tissulaire et la régulation de leur expression. Arg-I, l'isoforme la mieux caractérisée, est localisée au niveau du cytosol et est exprimée dans le foie comme l'une des enzymes du cycle de l'urée qui détoxifie l'ammoniac chez les mammifères. Cette protéine est composée de 322 acides aminés chez l'homme dont le gène est localisé dans le chromosome 6q23[203]. Arg-II chez l'homme, qui est codée par un gène localisé sur le chromosome 14q24.1-24.3[204] et est exprimée sous forme d'une protéine mitochondriale dans une variété de tissus périphériques chez les mammifères, le plus souvent dans les reins, la prostate, l'intestin grêle et la glande mammaire pendant la lactation.

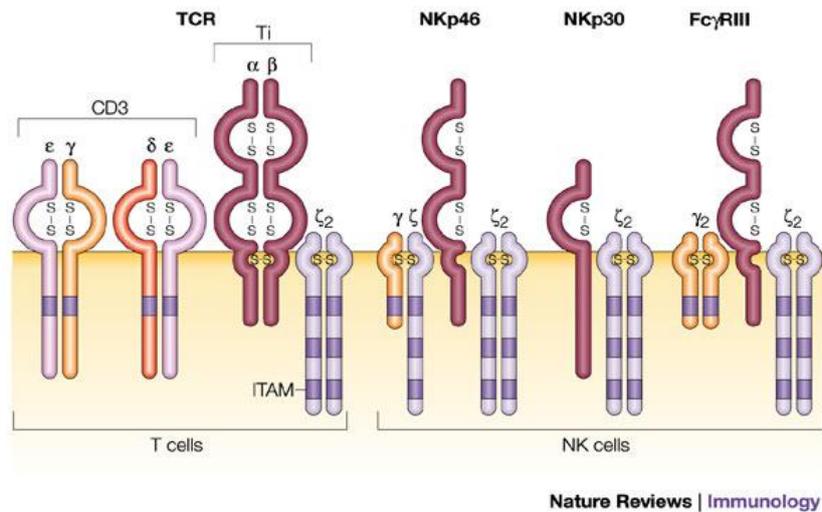
Une première évidence de l'effet de l'activité de l'arginase sur la réponse immunitaire chez la souris a été publiée en 1985, montrant que les macrophages activés peuvent être amenés à exprimer l'arginase provoquant l'épuisement de la L-arginine dans l'environnement extracellulaire[205]. Plus tard, chez l'homme, l'expression de Arg-I n'a pas été retrouvée dans les monocytes, les macrophages et les DC mais a été mise en évidence dans les polynucléaires

neutrophiles[206]. Des études ultérieures ont montré une régulation fine de l'expression de Arg-I. En effet chez la souris, les régions bordant la séquence codante du gène de l'Arg-I contiennent des éléments qui contrôlent la transcription en réponse à l'IL-4, à l'IL-13, à l'AMP cyclique, au TGF- β et au LPS. Le principal facteur de transcription de Arg-I murine est STAT6[207] situé en aval de la transduction du signal par les récepteurs de l'IL-4 et de l'IL-13, tandis que, chez l'homme, l'expression de Arg-I n'est pas modulée par ces cytokines T_H2[206].

L'arginine est également le substrat d'une autre famille d'enzymes, les NOS, qui dégradent la L-arginine en oxyde nitrique (NO) et L-citrulline. Cette famille inclut trois isoenzymes: NOS inducible (iNOS, type II NOS ou NOS2), NOS neuronale (nNOS, type I NOS ou NOS1), et NOS endothéliale (eNOS, type III NOS ou NOS3), toutes codées par des gènes distincts. Ces trois isoformes chez l'homme partagent environ 57% d'homologie[208] et diffèrent les unes des autres par leur régulation, leur localisation et leurs propriétés catalytiques. Concernant le profil d'expression, eNOS et nNOS sont exprimées de façon constitutive et synthétisent du NO en réponse à l'augmentation de Ca²⁺ intracellulaire[209]. Chez la souris, l'expression d'iNOS et la production de NO ont été décrites au niveau des éosinophiles, des macrophages, des neutrophiles, des DC et des cellules NK[210]. L'induction de son expression est contrôlée par des stimuli pro-inflammatoires comme le LPS bactérien et des cytokines comme l'IFN- γ , l'IL-1, le TNF α et les IFN de type I, par l'intermédiaire des facteurs de transcription NF κ B, AP1 (activator protein 1), IRF-1 (IFN regulatory factor 1) et STAT1[211]. Il a été également montré chez la souris que certains composants importants pour l'induction d'iNOS, comme l'IFN- γ et le LPS, peuvent avoir un effet synergique sur son expression dans le macrophages[212]. De plus, le NO lui-même exerce un effet sur sa transcription: en effet, une faible concentration de NO active le NF- κ B et régulent positivement l'expression d'iNOS, tandis que des concentrations élevées ont l'effet inverse, ce qui peut aider à prévenir la surproduction de NO[213]. Plusieurs études chez l'homme ont montré que l'induction de l'expression de la protéine iNOS fonctionnellement active est bien plus sélective et variable.

L'importance des enzymes immunosuppressives est due à leur capacité à influencer le système immunitaire lors des réponses immunitaires physiologiques et pathologiques. Parmi leurs effets sur le système immunitaire, l'utilisation de la L-arginine extracellulaire et l'épuisement de cet acide aminé qui s'en suit provoque une perte de la chaîne ζ du CD3 associé au TCR conduisant à une capacité réduite des cellules T à répondre à la stimulation antigénique que ce soit par la prolifération ou par la production de cytokines[214,215]. La chaîne ζ est une protéine

transmembranaire indispensable pour la transduction du signal et la prolifération des cellules T, en tant que partie du complexe TCR, des cellules NK, dans le cadre des récepteurs activateurs NKp46, NKp30 et des récepteurs du fragment Fc des IgG (Fig. 16). Elle est souvent régulée à la baisse dans plusieurs pathologies corrélées à une altération de la fonction des cellules T comme les infections chroniques, l'auto-immunité et le cancer[216].



Michal Baniyash, Nature Reviews, 2004

Figure 16. Structure de la chaîne ζ dans les cellules T et les cellules NK. Dans les cellules T, la chaîne zêta est un homodimère qui fait partie du complexe multimérique TCR. Dans les cellules tueuses naturelles (NK), la chaîne zêta forme un homodimère ou un hétérodimère avec la chaîne gamma du récepteur des IgE. Celui-ci s'associe aux récepteurs activateurs NKp46 et NKp30, ainsi qu'avec le récepteur Fc à faible affinité pour les IgG (FcγRIII ou CD16), qui medie la cytotoxicité. La chaîne zêta contient trois ITAM (immunorécepteurs avec motifs d'activation à base de tyrosine), qui subissent la phosphorylation de la tyrosine et ainsi jouent un rôle important dans le processus d'activation des cellules T et les cellules NK.

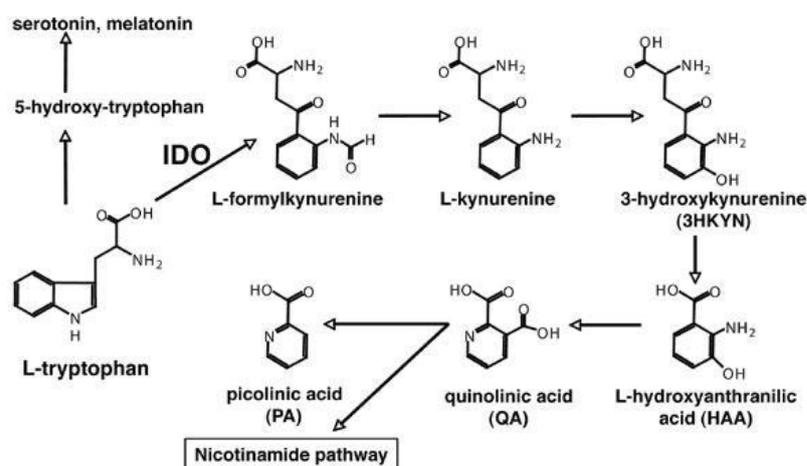
Le blocage de la prolifération des lymphocytes T dans un contexte de faible concentration en arginine est probablement dû non seulement à la régulation à la baisse de la chaîne ζ du CD3, mais aussi à un effet direct sur le cycle cellulaire avec un arrêt en phase G0-G1 qui dépend de l'incapacité des cellules T à réguler à la hausse la cycline D3[217]. L'étude de l'implication des enzymes immunosuppressives dans les différentes pathologies est à la fois pertinente pour la compréhension de ces situations mais également pour le ciblage thérapeutique potentiel des ces voies. Au cours des dernières années, les arginases ont été mises en évidence pour leur implication dans diverses pathologies comme les maladies infectieuses (ex. : VIH), les maladies vasculaires, les dysfonctions des cellules du système immunitaire ou le cancer[218–220]. Dans le cadre des tumeurs, une étude a montré une forte activité d'Arg-I dans les cellules myéloïdes

infiltrant la tumeur chez des patients atteints de différents types de cancer incluant les cancers du poumon, du colon, de l'estomac et du sein[221]. Plusieurs études ont décrit une augmentation d'Arg-II dans différents types de tumeur et en particulier une étude sur le cancer des poumons à petites cellules a montré qu'Arg-II était exprimée par les cellules tumorales des patients mais sans influence sur la suppression des cellules immunitaires et sur la progression tumorale.

Des travaux ont mis en évidence la présence d'iNOS et de NO dans plusieurs tumeurs humaines, soit au niveau des cellules tumorales soit au niveau des cellules d'origine myéloïde[222,223]. Dans le cas du carcinome de la prostate, par exemple, l'activité d'iNOS a été décrite comme étant augmentée[224], ce qui pourrait permettre son utilisation comme marqueur pour l'identification de ce type de cancer. Les mécanismes par lesquels l'exposition à une forte concentration de NO pourrait faciliter l'échappement tumoral comprendraient l'augmentation de la sous-unité catalytique des protéines kinases dépendantes de l'ADN (DNA-PKcs) requises pour réparer les cassures double brin de l'ADN ce qui protège les cellules tumorales des dommages de l'ADN comme ceux induits par certaines chimio- et radio-thérapies[225]. L'exposition des tumeurs au NO pourrait aussi favoriser la néo-angiogenèse, notamment en induisant la surexpression du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF)[226] et le développement tumoral en inhibant les lymphocytes T anti-tumoraux. Ce dernier mécanisme a été décrit dans une étude réalisée chez des souris présentant un carcinome mammaire, dans lesquelles une perte d'expression des facteurs de transcription STAT5a/b dans les lymphocytes B et T a été mise en évidence suite à la libération continue de NO par les MDSC[227].

III. 2. Métabolisme du tryptophane (IDO)

Le tryptophane est un des 9 acides aminés essentiels et un des 22 acides aminés protéinogènes. Il est aussi le précurseur métabolique de la sérotonine et de la mélatonine ainsi que celui de la voie métabolique qui conduit à la production d'une variété de métabolites appelés collectivement les kynurénines. Chez l'homme, il est le substrat de trois enzymes qui sont la tryptophane 2,3 dioxygénase (TDO), l'indoléamine 2,3 dioxygénase 1 (IDO1) et 2 (IDO2) qui agissent en clivant la double liaison en position 2,3 de l'hétérocycle indole du tryptophane et qui sont caractérisées par des mécanismes d'action et des profils d'expression distincts. En particulier, ces trois enzymes sont impliquées dans la première étape de la dégradation du tryptophane, qui est aussi l'étape limitante de la réaction qui conduit à la formation de la formylkynurénine (Fig. 17).



Hayashi et al., PNAS, 2007

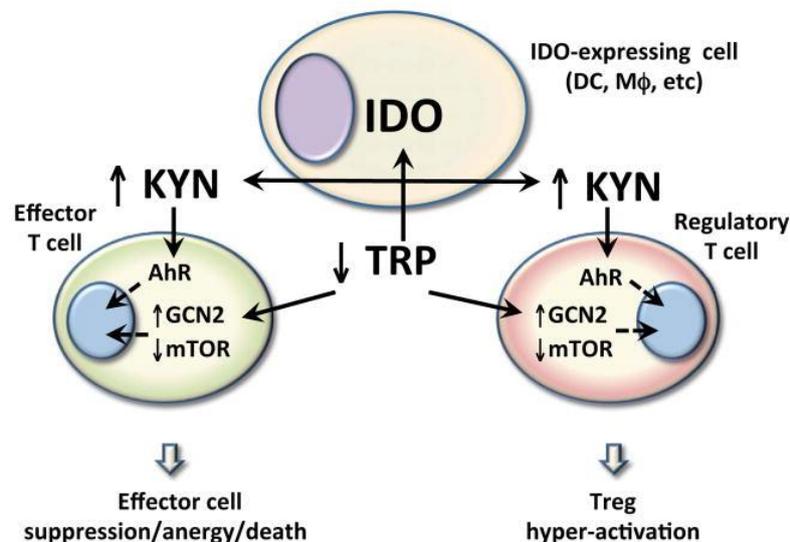
Figure 17. Catabolisme du tryptophane. Cascade des réactions du catabolisme du tryptophane.

Parmi ces enzymes, TDO, isolée en premier par *Kotake et Masayama* en 1936 et appelée pendant des années tryptophane pyrrolase, a été trouvée comme étant exprimée exclusivement dans le foie, surtout après administration de tryptophane[228]. Quelques années plus tard, en 1963, *Hayaishi et collègues* ont isolé une autre enzyme, IDO, responsable de la même réaction mais qui, au contraire de TDO, n'était pas exprimée exclusivement dans le foie mais de manière plus large au niveau de plusieurs organes et tissus et, à des niveaux importants, dans les poumons et le placenta[229]. Contrairement à TDO qui est induite par le tryptophane, IDO est induite en réponse au LPS, à l'IFN- γ et au TNF[230–232]. L'expression d'IDO a été mise en évidence au niveau du placenta à l'interface materno-fœtale[233] et en dehors du placenta, son expression a été rapportée chez la souris dans le thymus, les ganglions, les poumons, la rate mais aussi au niveau de l'iléon distal, du colon et de l'épididyme[234].

Récemment chez l'homme, le gène paralogue d'*IDO1* *IDO2*, a été identifié. En effet, les protéines IDO1 et IDO2 sont codées par des gènes adjacents, localisés dans le chromosome 8 chez l'homme et la souris, ce qui suggère que ces deux gènes sont le résultat d'une duplication génique. Chez les vertébrés inférieurs comme le poisson zèbre et la grenouille il existe des protéines similaires à IDO2 et des recherches génomiques ont révélé l'existence d'une protéine unique semblable à IDO2 des mammifères. Ceci suggère que le gène IDO ancestral est similaire à IDO2 et que chez les mammifères une duplication génique a ensuite donné lieu à IDO1[235]. En effet IDO2 possède des

motifs ITIM (Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs) incomplets et donc inactifs. Lors de la duplication d'un gène, une des copies acquiert de nouvelles fonctions. IDO pourrait donc avoir évolué avec l'acquisition d'un motif ITIM complet donnant à la protéine, en plus de son activité enzymatique, une fonction de transduction du signal. En effet, l'interaction de l'ITIM phosphorylé d'IDO, en conditions inflammatoires, avec SOCS3 (Suppressor Of Cytokine Signaling 3) induite par l'IL-6 conduit à la dégradation d'IDO par le protéasome et a été proposée comme un mécanisme d'arrêt de la tolérance médiée par l'IL-6. En présence de TGF- β en revanche, la signalisation par IDO permet l'instauration d'un phénotype régulateur au niveau des cellules qui l'expriment[236].

Différents types d'APC (DC, macrophages et cellules B) peuvent exprimer IDO même si l'expression semble limitée à certains types d'APC caractérisées par une régulation positive rapide d'IDO en réponse à des stimuli inflammatoires. L'activité immunosuppressive d'IDO est exercée par différents mécanismes qui peuvent être dépendants ou non de la production de la kynurénine (Fig. 18).

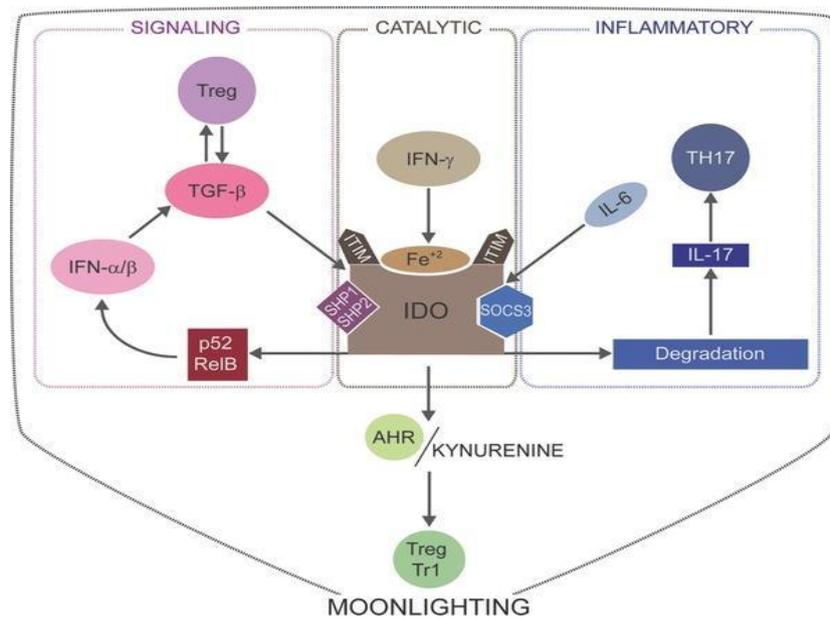


David H. Munn, Andrew L. Mellor, *Trends Immunol.* 2012

Figure 18. Mécanismes de l'activité immunosuppressive de IDO. La libération de la kynurénine et la consommation du tryptophane par des cellules exprimant IDO génèrent des signaux via AhR et des capteurs d'acides aminés (GCN2, mTOR), respectivement, qui ont des effets profonds sur les cellules T et les réponses Treg aux signaux inflammatoires et antigéniques. L'activité de IDO améliore également la différenciation Treg à partir T CD4 naïfs via ces voies métaboliques.

La kynurénine est le ligand naturel d'AhR (Aryl Hydrocarbon Receptor). Ce dernier est un facteur de transcription activé par le ligand qui a un effet immunosuppresseur car il conduit, une fois

activé, à la différenciation des cellules FOXP3 Treg[237], à la suppression des réponses antitumorales[238] et à la réduction de l'immunogénicité des cellules dendritiques[238]. L'activité d'IDO, qui conduit aussi à l'utilisation rapide du tryptophane présent localement, active la protéine kinase GCN2 et de façon concomitante, inhibe la voie de mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) qui conduisent ensemble au maintien d'un milieu immunosuppresseur. De plus, comme indiqué ci-dessous, grâce à l'acquisition des motifs ITIM fonctionnels, IDO peut agir comme protéine de transduction du signal (Fig. 19).



Fallarino F. et al., *Eur. J. Immunol.*, 2012

Figure 19. IDO comme protéine de transduction du signal. La fonction IDO est déterminée par des cytokines. L'IFN- γ engendre une intense activité catalytique de IDO, entraînant la consommation du tryptophane et la production de kynurénines, pouvant favoriser l'expansion de cellules Treg. Les Treg induites utilisent le TGF- β pour maintenir un environnement régulateur dépendant de IDO, IDO fonctionnant comme une molécule de signalisation. Les deux mécanismes sont interrompus par l'IL-6, qui entraîne la dégradation de IDO comme un stimulus inflammatoire. En effet, en cas d'inflammation, les ITIM sont phosphorylés au niveau de l'enzyme et interagissent avec la protéine SOCS3 qui conduit à la dégradation protéasomale de l'enzyme.

En effet, en cas d'inflammation, les ITIM sont phosphorylés au niveau de l'enzyme et interagissent avec la protéine SOCS3 qui conduit à la dégradation protéasomale de l'enzyme[239]. Notamment en présence de la cytokine pro-inflammatoire IL-6, chez la souris et l'homme, IDO se dégrade ; ce phénomène peut être expliqué à travers un mécanisme d'interruption de la tolérance dans les fortes réponses aux signaux de danger. En revanche, dans un milieu fortement tolérogène dominé par le TGF- β , la phosphorylation d'IDO active une série d'effecteurs qui maintiennent la production de TGF- β et donc un milieu immunosuppresseur.

L'expression de IDO a été montrée au niveau des sites tumoraux, où elle est exprimée par les cellules tumorales mais également par les DC infiltrant la tumeur, au niveau du stroma péri-tumoral et des ganglions drainants[240,241]. IDO est exprimée à des niveaux variables dans de nombreux types de cancer. Une étude a montré l'expression d'une protéine IDO active dans 100% des carcinomes colorectaux, pancréatiques et cervicaux et dans 60% des cas de mésothéliomes étudiés[242,243]. De façon intéressante, le rôle des Treg a été évoqué dans la fonction pro-tumorale d'IDO. Chez l'homme, l'examen de 25 cas de mélanomes métastatiques a révélé une forte corrélation entre une diminution de la survie, un niveau élevé d'expression d'IDO et le nombre de Treg[242]. De telles corrélations ont également été retrouvées dans les adénocarcinomes pancréatiques[244], les carcinomes de l'utérus[245] et les leucémies myéloïdes. Dans des modèles animaux de croissance tumorale, l'utilisation d'inhibiteurs d'IDO comme l'1-MT afin d'augmenter l'efficacité de vaccins anti-tumoraux corrèle avec la perte de l'activité suppressive des lymphocytes Treg et la conversion dépendante de l'IL-6 de ces lymphocytes en T_H17 dans les ganglions drainant la tumeur[246].

III. 3. Métabolisme de la phénylalanine (IL4I1)

L'enzyme immunosuppressive IL4I1 appartient à la famille des oxydases des L-acides aminés (L-Amino Acid Oxidases, LAAO). Cette famille catalyse la désamination oxydative stéréospécifique d'un acide aminé L en présence d'oxygène qui, via un intermédiaire imino-acide, aboutit à l' α -keto-acide correspondant, l'ammoniac et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Fig. 20).

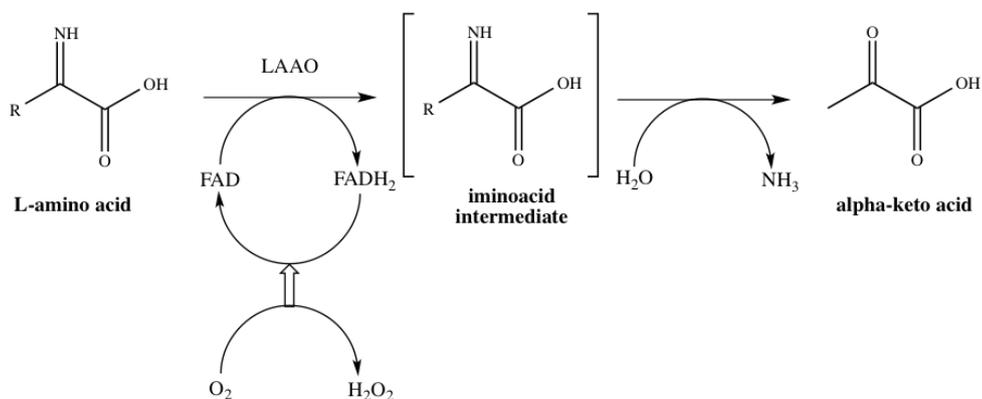
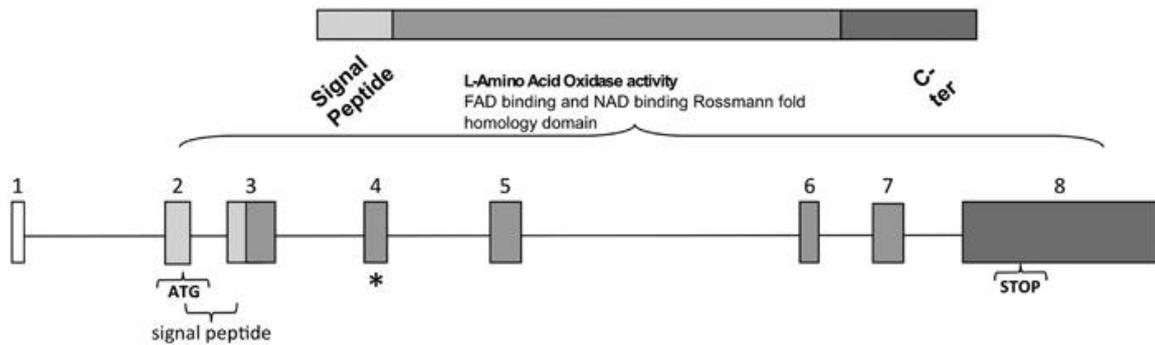


Figure 20. Modèle réactionnel des oxydases sur les L amino-acides. Dans une première étape, l'enzyme réduit le FAD en FADH₂. Celui-ci est ensuite régénéré par oxydation en FAD avec réduction de l'O₂ en H₂O₂. La déamination oxydative du L-aa, conduit à la formation d'un imino acide intermédiaire dont l'hydrolyse conduira à la formation de l'alpha-keto acide correspondant.

Les LAAO sont largement présentes chez les bactéries, les champignons, les algues et, également, les mammifères. Leur présence a été décrite dans les venins d'insectes et de serpents où elles peuvent représenter jusqu'à 30% des protéines totales[247]. Les LAAO du venin participent à l'inhibition de l'agrégation plaquettaire[248] et à l'induction de l'apoptose des cellules endothéliales et vasculaires humaines. Par l'effet toxique du H₂O₂, elles peuvent également induire l'apoptose de lignées tumorales humaines ou murines *in vitro*. Des protéines présentant une activité LAAO ont également été décrites chez les poissons. Notamment le maquereau espagnol (*Scomber japonicus*), suite à l'infection par le nématode *Anisakis*, exprime la protéine AIP (Apoptosis-Inducing Protein), une LAAO spécifique de la L-lysine, qui joue un rôle dans le contrôle de la prolifération du parasite[249]. Plus récemment, une LAAO avec un rôle antibactérien pour la prévention de l'infection de la glande mammaire[250] a été mise en évidence dans le lait des souris à partir du 18^{ème} jour de gestation. Cette protéine présente environ 53% d'homologie avec l'apoxine-I, une LAAO du venin de serpent[251]. La recherche de protéines homologues à une LAAO de venin de serpent en 1998 a montré que la protéine connue ayant la plus grande homologie (37% d'identité) était en fait la protéine murine Fig1 exprimée dans les cellules B et induite par l'IL-4[252].

Le gène *IL4I1* a été initialement découvert chez la souris parmi les gènes qui sont induits de façon précoce par l'IL-4 dans les lymphocytes B[253] et appelé *Fig1*. Il a par la suite été mis en évidence chez l'homme[254]. Chez l'homme, le gène codant pour l'IL4I1 est constitué de 8 exons (Fig. 21), dont le deuxième comprend le codon d'initiation de la traduction. Il est localisé dans le chromosome 19 chez l'homme (locus 19q13.-q13.4) et dans le chromosome 7 chez la souris (locus H46) dans une zone de susceptibilité au lupus érythémateux systémique[253,254]. Une étude récente a mis en évidence un polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP, Single-Nucleotide Polymorphism) au niveau du quatrième exon, qui contient le domaine fondamental pour l'activité enzymatique (NAD binding Rossmann fold homology domain) qui conduit à une augmentation de l'activité de l'IL4I1[255].



V. Molinier-Frenkel et al., *Genes and Immunity* (2016)

Figure 21. Structure du gène humain IL4I1. Représentation schématique de la structure du gène humain IL4I1 (en bas) avec la protéine correspondante (en haut). Les boîtes représentent les exons et les domaines protéiques correspondants. L'astérisque indique l'exon dans lequel se trouve un SNP qui conduit à une augmentation de l'activité de l'IL4I1.

L'épissage alternatif de l'ARNm transcrit à partir de ce gène produit deux isoformes: une isoforme courte, ou l'isoforme 1, de 567 acides aminés et une isoforme plus longue, l'isoforme 2, de 589 acides aminés qui se distinguent par leur portion N-terminale. De plus, l'isoforme 2 utilise le promoteur d'un autre gène, NUP62 (qui code pour une protéine faisant partie de la famille des nucléoporines) et contient les deux premiers exons de celui-ci. L'expression de l'isoforme 2 est restreinte aux cellules de Sertoli dans les testicules, aux cellules de Purkinje et aux cellules de l'hippocampe dans le cerveau et aux cellules mitrales dans le bulbe olfactif[254,256]. Elle est également exprimée au niveau de la tête des spermatozoïdes avec un rôle supposé dans l'interaction spermatozoïde/ovocyte[237–239]. L'expression de l'isoforme 1 de l'IL4I1 est principalement retrouvée dans les organes lymphoïdes (rate et thymus) ainsi que dans le placenta et les poumons et est la seule isoforme à être biochimiquement caractérisée. L'isoforme 1 est la seule à avoir été décrite comme jouant un rôle dans le système immunitaire, elle fait l'objet de la première partie de mon travail expérimental et le terme IL4I1 dans le reste du manuscrit se réfèrera toujours à cette isoforme.

L'IL4I1 est constituée d'un peptide signal situé dans la partie N-terminale (acides aminés 1 à 21) lui permettant d'être sécrétée, d'un large domaine central fortement homologue à un domaine LAAO et d'une partie C-terminale[253,254,257]. La protéine IL4I1 murine (mIL4I1) est significativement plus longue que la protéine humaine (hIL4I1) ; elles sont en effet constituées de 630 et de 567 acides aminés, respectivement. Au niveau de l'homologie de séquence, elles présentent 79% d'identité dans leur partie N-terminale mais diffèrent au niveau de la région C-terminale avec seulement 11% d'homologie. Cependant, l'activité enzymatique de l'IL4I1 semble comparable dans les deux espèces[253,254,257].

L'activité enzymatique LAAO de l'IL4I1 est spécifique des acides aminés aromatiques avec une préférence pour l'acide aminé essentiel phénylalanine. Son activité conduit à la désamination de la phénylalanine en phénylpyruvate et produit, comme c'est le cas pour toutes les LAAO, de l'ammoniac (NH_3) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ainsi, en plus d'engendrer des composés toxiques, l'activité de l'IL4I1 prive le milieu extracellulaire d'un acide aminé essentiel.

L'intérêt pour l'IL4I1 a été suscité par la première étude décrivant son expression dans le lymphome B primitif du médiastin[258]. Les mêmes auteurs ont mieux caractérisé son activité dans une étude ultérieure[257]. Ils ont montré que les protéines IL4I1 murine et humaine étaient sécrétées après transfection de cellules HEK 293 et que la protéine humaine était également sécrétée par une lignée de lymphome B médiastinal qui l'exprimait naturellement. Ils ont également démontré sa préférence pour la L-phénylalanine comme substrat. De façon importante, grâce à des marquages immunohistochimiques, ils ont démontré que la protéine était exprimée dans les macrophages et les cellules myéloïdes inflammatoires des centres germinatifs des ganglions lymphatiques. *In vitro*, ils ont observé que l'activité enzymatique de l'IL4I1 était plus forte dans les DC matures ce qui les a amenés à émettre l'hypothèse que l'enzyme pouvait influencer l'interaction DC/LT. Cette hypothèse a été étayée *in vitro* où la co-culture de cellules HEK 293 transfectées IL4I1⁺ avec des LT, CD4 et CD8, inhibait la prolifération de ces derniers et cela même lorsque les deux populations étaient séparées sur des « transwells ». Cet effet dû à l' H_2O_2 , était plus important au niveau des populations de LT mémoires et était associé à une baisse transitoire de l'expression de la chaîne ζ du complexe CD3/TCR[257]. En effet, des études plus anciennes avaient montré le rôle du stress oxydatif et notamment de la production d' H_2O_2 par les macrophages dérivés des tumeurs ou par les granulocytes dans l'inhibition des réponses T et NK par la modulation de l'expression de la chaîne ζ [259–261]. Cet effet est observé après une exposition courte à l' H_2O_2 et une exposition plus longue (6 à 8 heures) peut également conduire à l'apoptose des LT, notamment les LT CD8 mémoires[262]. Plus spécifiquement par rapport aux produits de l'activité enzymatique de l'IL4I1, l'hypothèse que l'effet observé sur les LT était dû à l' H_2O_2 plutôt qu'au phénylpyruvate est appuyé par le fait que les doses efficaces pour l' H_2O_2 sont de l'ordre du micro-molaire alors qu'elles sont de l'ordre du milli-molaire pour le phénylpyruvate[257].

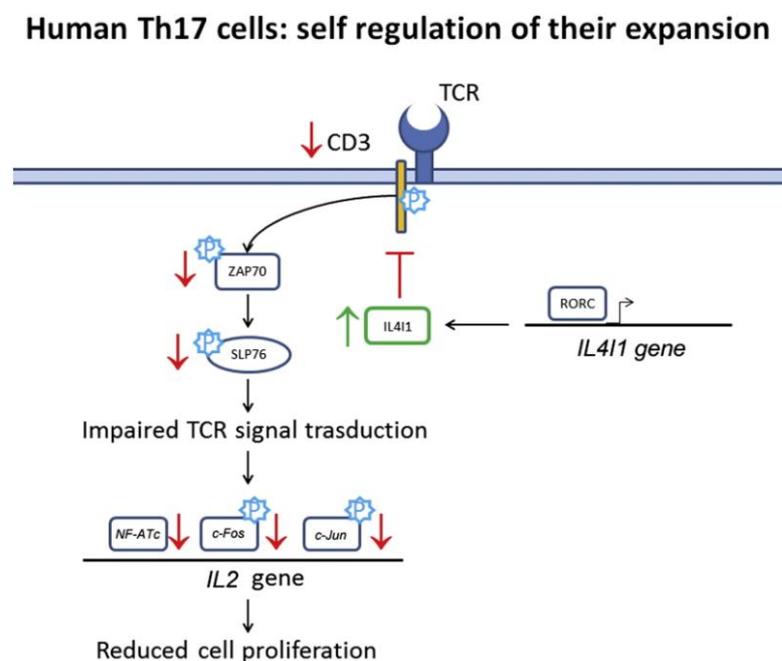
En plus de l'effet de l' H_2O_2 , l'appauvrissement de l'environnement cellulaire en acides aminés essentiels a été impliqué dans l'induction de nombreux mécanismes immunosuppresseurs incluant l'arrêt de prolifération des lymphocytes T et l'induction de lymphocytes T régulateurs. La réponse

cellulaire à la privation en acides aminés peut entraîner l'augmentation intracellulaire d'ARNt non chargés qui peuvent se fixer à la protéine kinase GCN2 et ainsi l'activer induisant l'arrêt du cycle cellulaire[263,264]. De plus, la consommation d'acides aminés essentiels est déterminante dans l'expansion de cellules suppressives. En effet l'élimination de certains acides aminés essentiels du milieu extracellulaire (dont la phénylalanine) conduit à l'inhibition de la voie mTOR qui, dans les cellules T effectrices, peut induire l'expression du facteur de transcription FOXP3[265]. Concernant spécifiquement l'IL4I1, une étude récente a montré que son activité conduit à la différenciation de cellules FOXP3 Treg à partir de lymphocytes naïfs chez l'homme et chez la souris, *in vitro*[266].

Après la caractérisation de l'enzyme, plusieurs études ont investigué ses rôles physiologiques qui ont pu être démontrés à la fois dans les tumeurs mais également et de façon intéressante dans le développement physiologique des LT T_H17.

Dans le cadre de l'expression de l'IL4I1 dans les tumeurs, une grande quantité d'ARNm a été retrouvé dans les lymphomes B primitifs du médiastin comme indiqué précédemment. Il est intéressant de noter que cette expression a été liée à l'activation constitutive de STAT6 dans cette tumeur et non à une activation de STAT6 sous l'effet d'une signalisation par l'IL-4[267]. L'enzyme est également exprimée par d'autres lymphomes notamment les lymphomes folliculaires, les lymphomes de Hodgkin et les lymphomes à petits lymphocytes, tous dérivés du centre germinatif[268]. L'expression dans les cellules tumorales des tumeurs solides a été détectée dans de rares cas de méthéliomes[268]. Cependant, dans les tumeurs hématologiques et solides l'IL4I1 est fortement exprimée au niveau des TAM (Tumor Associated Macrophages)[268]. L'expression de l'IL4I1 dans les cellules tumorales et sa présence dans l'infiltrat inflammatoire ne semblaient donc pas liées et cela a été confirmé dans une étude qui a montré, au contraire, que lorsque l'enzyme était exprimée dans les cellules tumorales des lymphomes Hodgkiniens elle était absente de l'infiltrat et inversement, les TAM étaient IL4I1⁺ dans les cas où la tumeur était négative[268]. Alors que la protéine est enzymatiquement active, son expression dans les lymphomes folliculaire a été liée à une meilleure survie des patients. Dans ce cas, l'importance des T_{FH} pour la survie de la tumeur a été évoquée pour expliquer cette corrélation favorable[268]. Son expression dans le microenvironnement des tumeurs solides a cependant été liée à un mauvais pronostic compatible avec son activité inhibitrice des LT[269,270].

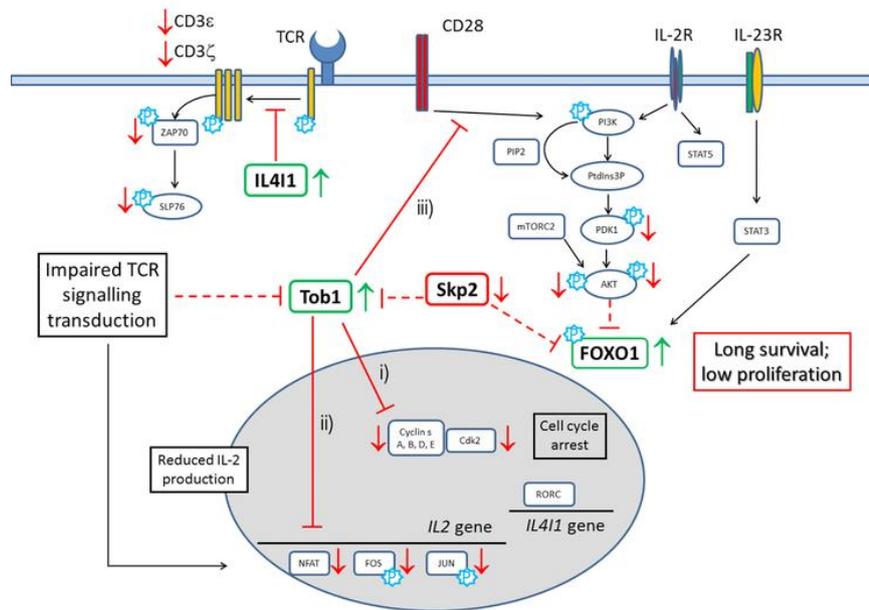
Dans le cadre de maladies inflammatoires chez l'homme, l'IL411 a été décrite comme impliquée pour endiguer le potentiel pathologique des cellules T_H17 que nous savons être fondamentales dans la pathogénèse des maladies inflammatoires chroniques. En effet, d'après l'observation de la rareté de cellules T_H17 dans les sites inflammatoires, une étude en particulier a démontré que les cellules T_H17 humaines présentent une faible capacité à proliférer et à produire du facteur de croissance des cellules T, l'interleukine-2 (IL-2) en réponse à la stimulation avec CD3 combiné à CD28. Cela était dû à l'expression régulée à la hausse du mARN de l'IL411. En effet, la réaction catalysée par cette enzyme conduit à la production de sous-produits comme le peroxyde d'hydrogène qui a un effet négatif sur l'expression de la chaîne ζ du CD3 avec de conséquentes anomalies dans la voie moléculaire qui permet la production de l'IL-2 et ainsi la prolifération cellulaire[88] (Fig. 22). Il a aussi été montré que cette surexpression de l' mARN de l'IL411, est strictement dépendante de l'activité du facteur de transcription spécifique de cellules T_H17, RORC. Ce dernier est également responsable de la régulation positive dans les cellules T_H17 de CD28 dont la stimulation permet la production d'IL-17A même en l'absence du signal principal du TCR.



Santarasci V. et al., Immunity, 2012

Figure 22. Autorégulation des cellules T_H17. La régulation positive de IL411 dans les cellules T_H17, qui est sous contrôle RORC, réduit l'expression de la chaîne ζ CD3 du TCR, ce qui conduit à une réduction de la phosphorylation de ZAP70 et SLP76 et à une altération de la signalisation de la voie qui est nécessaire pour l'activation du promoteur IL-2 (notamment par une activité réduite de Jun, Fos et NFAT).

De plus, il a été mis en évidence que l'IL41 maintient également des niveaux élevés de TOB1, un membre du Tb / BTG (gène de translocation des lymphocytes B) de la famille de la protéine anti-proliférative, ce qui empêche la progression du cycle cellulaire médiée par la stimulation du TCR[89] (Fig. 23).



Santarasci V. et al, Eur J Immunol, 2014

Figure 23. Mécanismes d'action des IL41 et TOB1. La régulation positive de IL41 dans les cellules T_H17 , qui est sous contrôle RORC, réduit l'expression de la chaînes ζ CD3 du TCR, ce qui conduit à une réduction de la phosphorylation de ZAP70 et SLP76 et à un' altération de la signalisation par la voie qui est nécessaire pour l'activation du promoteur IL-2 (en notamment par une activité réduite de Jun, Fos et NFAT). La signalisation réduite du TCR permet une expression élevée de TOB1 qui, à son tour, inhibe la prolifération cellulaire par au moins trois mécanismes différents: (i) le blocage du début du cycle cellulaire en ciblant les cyclines A, B, D et E et Cdk2; (ii) la réduction de la production d'IL-2 par interférence avec l'activation du promoteur du gène IL-2; (iii) l'inhibition de la voie classique de la signalisation de co-stimulation CD28. Une expression élevée TOB1 est également favorisée par les niveaux réduits de Skp2 trouvés dans les cellules T_H17 , ce qui, d'autre part, peut permettre l'effet inhibiteur de FOXO1 sur la prolifération et la survie cellulaire.

IV. Le microbiote

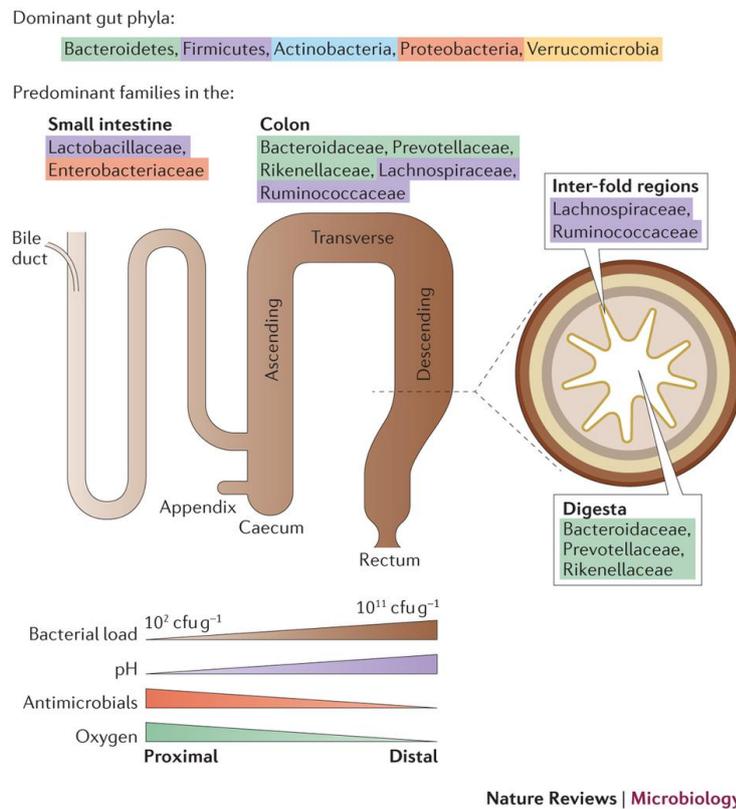
Tous les animaux supérieurs sont associés à une communauté microbienne qui est principalement composée de bactéries mais qui comprend également archées, virus, champignons et protozoaires. Les microorganismes couvrent pratiquement toutes les surfaces de la muqueuse de l'hôte, mais la plupart résident dans le tractus gastro-intestinal.

La colonisation des nouveaux-nés arrive au moment du passage à travers le canal de naissance par des microorganismes environnementaux (par exemple, du vagin ou de la peau de la mère) et pendant l'allaitement par des microorganismes présents dans le lait[271]. En raison de

l'environnement oxydant du tractus gastro-intestinal des nouveaux-nés, les colonisateurs primaires sont les bactéries anaérobies facultatives, tolérantes à l'oxygène, telles que des protéobactéries, pour ajuster les conditions d'environnement en diminuant la concentration d'oxygène et ainsi permettre la colonisation successive par des microorganismes anaérobies tels que les membres des genres *Bacteroides*, *Actinobacteria* et *Firmicutes*. Au cours de la première année de vie, la composition du microbiote intestinal est simple et varie considérablement entre les individus et au fil du temps ; les signatures microbiennes se stabilisent et commencent à ressembler à « l'état adulte » lorsque l'enfant atteint 1-2 ans[272].

Le microbiote intestinal « normal » est dominé par les bactéries anaérobies, qui sont de 100 à 1000 fois plus nombreuses que les bactéries aérobies et anaérobies facultatives[273]. Les études de métagénomique du microbiote intestinal réalisées chez 124 individus européens ont permis d'identifier 1000 à 1150 espèces bactériennes prévalentes dans la cohorte avec au moins 160 espèces par individu dont une partie est partagée par plusieurs individus[274]. Les phyla les plus abondants dans l'intestin humain sont *Firmicutes* et *Bacteriodetes*, mais d'autres espèces présentes sont des membres des phyla *Proteobacteria*, *Verrumicrobia*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* et *Cyanobacteria*[274,275].

Les microorganismes du tractus gastro-intestinal sont distribués selon un gradient de propagation qui va de l'extrémité proximale à l'extrémité distale de l'intestin avec un enrichissement croissant (Ex. : 10^1 et 10^{12} cellules microbiennes/gramme de contenu dans l'estomac et le colon, respectivement)[276]. Ce gradient est influencé par les acides gastriques et biliaires, aux effets bactéricides, qui limitent la croissance des bactéries dans la partie proximale. De plus, dans ce même axe de distribution la diversité bactérienne augmente avec la densité croissante[272]. La localisation des espèces dans le tube digestif est également corrélée à la présence de certains types de nutriments. En effet, le petit intestin est riche en mono- et disaccharides ainsi qu'en acides aminés ce qui permet la croissance, notamment, des bactéries du genre *Lactobacillus*. Dans le colon, les sucres ayant été absorbés par les entérocytes, les sources d'énergie restantes (fibres végétales, mucines) ne sont plus les mêmes et les populations bactériennes présentes sont différentes, ces dernières (*Bacteroides* et *Clostridiales*) étant capables de dégrader ces composés. La colonisation microbienne varie également selon l'axe tissu-lumen avec peu de microbes adhérents au tissu ou au mucus et un nombre plus important présent dans le lumen[272]. (Fig. 24)



G.P. Donaldson et al., Nature Reviews 2015

Figure 24. Biogéographie intestinale du microbiote bactérien. Les phyla bactériennes dominantes dans l'intestin sont Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobactéries, Proteobacteria et Verrucomicrobia. Les familles bactériennes dominantes de l'intestin grêle et du côlon reflètent des différences physiologiques sur la longueur de l'intestin. Par exemple, un gradient d'oxygène, de peptides antimicrobiens (y compris les acides biliaries sécrétés par les voies biliaires) et de pH limite la densité des bactéries dans l'intestin grêle, tandis que le côlon transporte des charges bactériennes élevées. Dans l'intestin grêle, les familles Lactobacillaceae et entérobactéries dominent, alors que le côlon est caractérisé par la présence d'espèces des familles Bacteroidaceae, Prevotellaceae, Rikenellaceae, Lachnospiraceae et Ruminococcaceae. Une coupe transversale du côlon montre le digesta, qui est dominé par Bacteroidaceae, Prevotellaceae et Rikenellaceae, et les régions inter-plier du lumen, qui sont dominées par Lachnospiraceae et Ruminococcaceae.

Dans l'intestin adulte le nombre de bactéries a été estimé à environ 10^{14} cellules, représentant ainsi une population dix fois supérieure à celle des cellules humaines dans le corps[277]. Récemment cependant, ces nombres ont été révisés et un ratio de 1:1 a été proposé[278]. L'ensemble des génomes microbiens combinés (connu sous le nom de microbiome) contient plus de 5 millions de gènes, dépassant ainsi le génome de l'hôte de deux ordres de grandeur. Cette grande diversité génétique offre une gamme variée d'activités biochimiques et métaboliques pour

compléter la physiologie de l'hôte de sorte que le microbiote intestinal peut donc être considéré comme un organe supplémentaire. La présence de ces bactéries influence plusieurs aspects de la biologie de l'hôte. Par exemple elles facilitent le métabolisme des polysaccharides non digestibles, ils produisent des vitamines essentielles, sont nécessaires au développement et à la différenciation de l'épithélium intestinal de l'hôte et de son système immunitaire, et confèrent une protection contre l'invasion par des pathogènes opportunistes[279]. Le microbiote bénéficie également de cette association qui peut être considérée mutualiste, étant donné que l'intestin des mammifères est un environnement riche en nutriments qui est maintenu à une température constante.

Cependant, il s'agit également d'un habitat dynamique qui subit des changements constants et rapides dans ses paramètres physiologiques en raison de variations dans, par exemple, l'alimentation de l'hôte, son mode de vie, son hygiène ou l'utilisation d'antibiotiques, lesquels affectent la composition microbienne de l'intestin. Ainsi, contrairement au génome de l'hôte, le microbiome peut changer rapidement en raison de modifications de la composition de la communauté microbienne ou des génomes microbiens individuels, résultant dans des transcriptomes, protéomes et profils métaboliques modifiés. En conséquence, la mise en place et la préservation des interactions bénéfiques entre l'hôte et ses microorganismes intestinaux associés sont des exigences clés pour la physiologie de l'hôte ainsi que pour son état de santé. Le système immunitaire de l'hôte joue un rôle actif et central dans le maintien de cette homéostasie bénéfique avec des mécanismes de tolérance du microbiote permettant en même temps d'éviter une inflammation chronique qui serait néfaste à l'hôte.

IV.1. Impact sur la physiologie de l'hôte et implication dans les états pathologiques

Le microbiote influence un large éventail de processus essentiels à la physiologie de l'hôte tels que le développement des organes et la morphogénèse, la prolifération cellulaire, la masse osseuse, l'adiposité et même le comportement. Chez *Drosophila melanogaster*, il a été montré qu'au delà de leur influence sur le développement des tissus immunitaires, les microorganismes affectent le développement et la morphogénèse des autres organes et structures du corps[280]. Chez l'homme et chez d'autres mammifères des études ont montré un effet considérable de la flore microbienne intestinale sur le développement du tractus gastro-intestinal[281]. De façon intéressante, des travaux récents ont montré l'implication du microbiote intestinal aussi bien dans

la promotion de la morphogenèse des voies gastro-intestinales que dans le remodelage du système vasculaire intestinal[282,283].

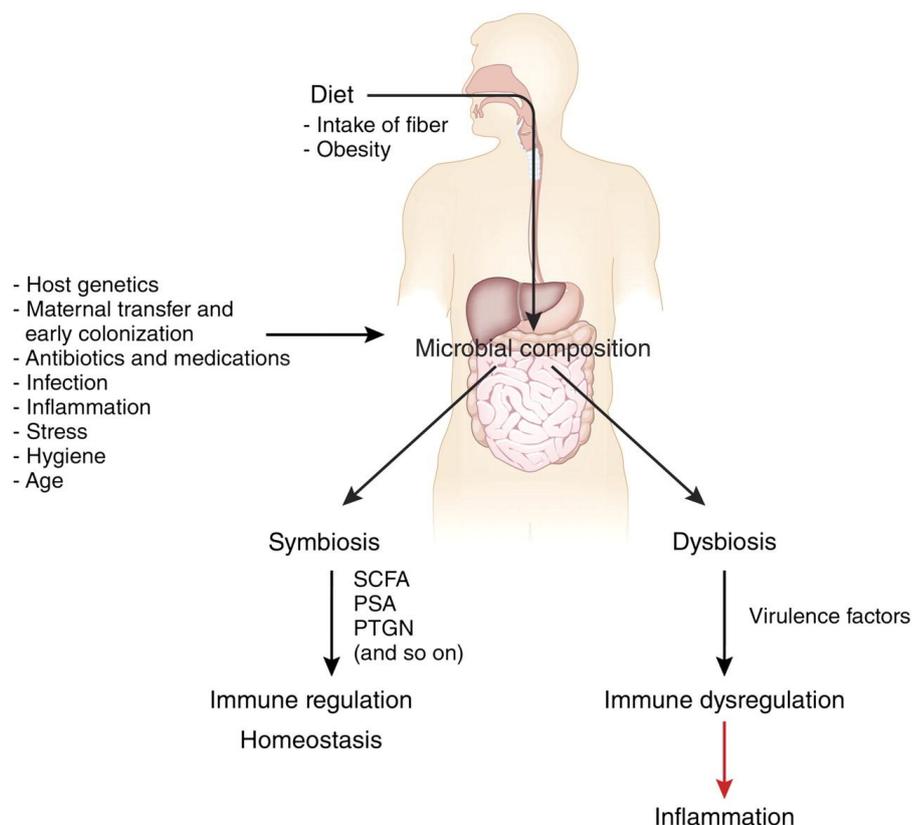
Comme déjà mentionné ci-dessus, la grande diversité génétique du microbiote apporte une gamme variée d'activités biochimiques et métaboliques, agissant comme un «organe métabolique» qui interagit avec l'hôte et remplit des fonctions essentielles pour compléter la physiologie de l'hôte et contribuer à maintenir son état de santé[284]. Les fonctions métaboliques du microbiote intestinal permettent l'utilisation de nombreuses sources énergétiques complexes, et ses activités biochimiques participent à la production des vitamines, à la synthèse d'acides aminés et à la biotransformation des acides biliaires[285–287]. Des études effectuées sur les profils métaboliques chez l'homme et la souris ont montré que l'absorption, le stockage et le métabolisme des lipides alimentaires peuvent être spécifiquement modulés par le microbiote[288].

De même, la production des SCFAs (Shorty Chain Fatty Acids) est une "fonction du microbiote" très importante. Les SCFAs, principalement l'acétate, le propionate et le butyrate ont une influence positive sur la prolifération des cellules épithéliales de l'intestin et sur leur différenciation[289]. Le butyrate est utilisé en tant que substrat énergétique par les colonocytes. Il peut aussi renforcer la barrière de défense du côlon en induisant la sécrétion de mucine, des facteurs en trèfle (trefoil factors), et des peptides antimicrobiens. En outre, le butyrate exerce de multiples effets, tels que l'inhibition du cycle cellulaire, l'induction de la mort cellulaire programmée et la différenciation cellulaire, dans une variété de types cellulaires[290,291]. Récemment, il a été également montré que le butyrate est capable de modifier la réponse des cellules dendritiques à des antigènes bactériens avec, selon le modèle expérimental, une régulation à la hausse de la production de l'IL-23 et en conséquence de la voie T_H17[292] ou une modification du profil cytokinique favorisant le développement des Treg et des cellules T productrices d'IL-10[293]. Des données récentes montrent que les SCFAs sont essentiels au développement des Treg par un effet épigénétique direct sur l'expression de FOXP3[136].

Dans l'ensemble, ces résultats mettent en lumière la relation entre le microbiote et son hôte et fournissent les bases pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques capables de promouvoir ou de rétablir l'homéostasie et la santé intestinale et, au delà, la santé de l'hôte[294–296].

En effet, un corollaire à la participation du microbiote dans des processus physiologiques est son implication, lorsqu'il est perturbé, dans des états pathologiques. Lors d'une perturbation dans

l'équilibre de l'écosystème microbien on parle de dysbiose, une condition qui a été liée à des états pathologiques humains importants, comme les maladies auto-immunes et les troubles inflammatoires, telles que les allergies et les maladies inflammatoires de l'intestin, ainsi que les cancers et l'obésité. Parmi les hypothèses nombreuses sur l'origine des dysbioses, le mode de vie semble avoir une influence forte. Dans les pays occidentaux, où les maladies chroniques affectent plus de 50% de la population adulte, l'alimentation basée sur la consommation élevée de viande rouge, de graisses animales et de sucre, ainsi que l'utilisation thérapeutique des antibiotiques et un mode de vie sédentaire, peuvent jouer un rôle central dans l'élaboration de la microflore de l'intestin humain. Il a en effet été démontré que le régime alimentaire occidental induit une dysbiose et contribue à l'endotoxémie, très probablement causée par une altération dans la perméabilité intestinale et dans la fonction de barrière pour lesquels le microbiote est essentiel [294–296]. Une étude récente a révélé qu'à l'inverse, le régime d'inspiration méditerranéenne semble avoir un avantage chez les patients atteints de la maladie de Crohn[297,298] (Fig. 25).



Johnson C.L and Versalovic J., *Pediatric*. 2012

Figure 25. Les facteurs qui ont une influence sur le microbiote intestinal.

Une hypothèse émergente est que la dysbiose intestinale peut être impliquée dans la pathogenèse des maladies inflammatoires de l'intestin (IBD, Inflammatory Bowel Disease) qui incluent la maladie de Crohn (CD, Chron's disease) et la colite ulcéreuse (CU). Les IBDs sont des troubles à médiation immunitaire qui proviennent d'une dégradation de la symbiose normale entre le système immunitaire de la muqueuse et le microbiote commensal. Ceci conduit à une réactivité contre des antigènes aberrants intraluminaux, à une dérégulation de l'immunité innée et adaptative et à des lésions tissulaires subséquentes. Plusieurs facteurs pourraient contribuer à la perte de tolérance envers une partie du microbiote indigène chez les patients atteints d'IBD, y compris une susceptibilité génétique[299], des défauts dans la fonction de la barrière muqueuse[300] et un déséquilibre dans la composition du microbiote intestinal[301].

Un déséquilibre dans l'homéostasie cellulaire microbienne peut aussi jouer un rôle crucial dans l'initiation et la progression du cancer en modulant notamment le métabolisme de l'hôte et les réponses inflammatoires[301]. Dans la littérature de nombreux travaux réalisés chez des souris axéniques ont appuyé le rôle de la flore intestinale dans la carcinogénèse[302].

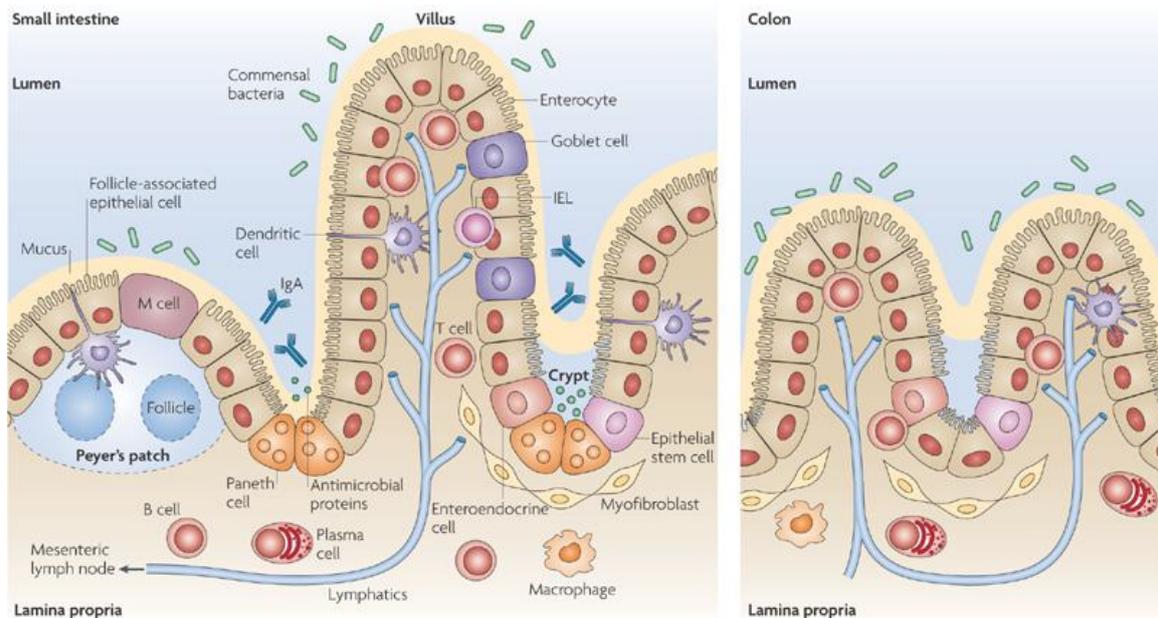
L'un des principaux exemples où le microbiote intestinal semble jouer un rôle dans le soutien de la progression tumorale est le cancer colorectal (CRC)[303]. Notamment il a été montré que les patients souffrant d'un cancer colorectal ont un microbiote caractérisé par une diminution de l'abondance des producteurs de butyrate et une augmentation des pathogènes opportunistes tels que *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides fragilis* et *Streptococcus gallolyticus* ainsi que le genre *Prevotella*[304]. Cet enrichissement est associé à une signature IL-17 pro-inflammatoire augmentée chez les malades. Les cancers colorectaux peuvent se développer des suites de colites inflammatoires et sont soutenus par les médiateurs de l'inflammation (IL-23, TNF, IL-17, ROS)[305]. Cela donne à penser que certains groupes de bactéries promeuvent tandis que d'autres protègent du cancer du côlon. Par conséquent, la manipulation sélective de la flore intestinale pourrait fournir de nouvelles voies pour empêcher la carcinogénèse[306]. De façon intéressante, il a été montré que la dysbiose intestinale peut aussi affecter la carcinogénèse ainsi que l'évolution des tumeurs éloignées du tube digestif et ceci dans des modèles murins et chez l'homme, possiblement par des mécanismes liés à l'inflammation, à l'immunité et au métabolisme[307].

Plusieurs études ont en effet suggéré que le microbiote intestinal avait un rôle dans l'incidence et la progression des cancers mammaires et des carcinomes hépatocellulaires[308]. Certaines études proposent que cet effet pro-tumoral pourrait découler d'une compromission de l'intégrité de la

barrière intestinale causée par l'inflammation associée à la dysbiose résultant dans la distribution systémique des bactéries et des métabolites ou toxines bactériens.

IV.2. Le microbiote et le système immunitaire : immunité innée, Treg et T_H17

La muqueuse intestinale est constituée de plusieurs couches protectrices qui empêchent la translocation des pathogènes ainsi que celle des microbes indigènes. En particulier, au niveau de l'épithélium intestinal, le mucus composé de glycoprotéines et mucines synthétisées et sécrétées par les cellules caliciformes, crée une barrière stricte qui empêche la mise en contact direct des cellules épithéliales avec les grandes particules, dont la plupart bactéries[309]. De plus, l'épithélium intestinal est renforcé par des jonctions serrées et des jonctions adhésives sous-jacentes, qui jouent un rôle essentiel dans la prévention de l'invasion par des microbes[310]. L'épithélium du petit intestin contient les cellules de Paneth qui contribuent à l'immunité innée en sécrétant un répertoire diversifié de protéines antimicrobiennes et, sous l'épithélium, la lamina propria (LP) contient les DCs qui étendent leurs dendrites entre les cellules épithéliales pour surveiller en permanence le lumen intestinal et activer les lymphocytes de la LP[311,312]. En effet le bon fonctionnement de la barrière épithéliale et l'homéostasie hôte-commensaux dépendent de l'inflammation constitutive et physiologique induite par les microbes commensaux reconnus par les récepteurs PRR (Fig. 26).



Nature Reviews | Immunology

Maria T. Abreu, Nature Reviews 2010

Figure 26. Le barrière épithéliale. La couche de cellules épithéliales intestinales (IEC) fournit une barrière physique qui sépare les bactéries commensales dans le lumen intestinale de la lamina propria sous-jacente. Les cellules souches épithéliales prolifèrent en produisant des cellules filles qui se différencient en entérocytes des villosités ou coliques, qui absorbent les nutriments (intestin grêle) et l'eau (côlon). De plus, les cellules souches IEC se différencient en cellules qui sécrètent des hormones intestinales et en cellules de Paneth à la base des cryptes intestinales. Sous les IEC, la lamina propria est constituée de cellules stromales (les myofibroblastes), de cellules B (en particulier les cellules productrices d'IgA du plasma), de lymphocytes T, macrophages et cellules dendritiques. Certains sous-ensembles de cellules T et les cellules dendritiques se localisent entre les IEC.

IV.2. a. Activation des PRR

Le rôle des TLR dans la fonction de barrière intestinale a été proposé par une étude qui a montré que des souris conservées dans des conditions SPF (Specific Pathogen Free) traitées avec des antibiotiques à large spectre, devenaient sensibles à l'inflammation intestinale induite par le DSS (Dextran Sulfate Sodium), un composé doté d'une toxicité directe vis à vis de l'épithélium colique[300]. Ceci est, au moins en partie, dû à la réduction de la signalisation constitutive par les TLRs en réponse à la flore microbienne qui, dans ce système expérimental, est éliminée ou réduite par le traitement antibiotique. L'administration orale de lipopolysaccharide (LPS, un ligand de TLR4) ou d'acide lipotéichoïque (LTA, un ligand TLR2) protège les animaux traités par antibiotiques des conséquences des lésions coliques induites par le DSS[300] (Fig. 27).

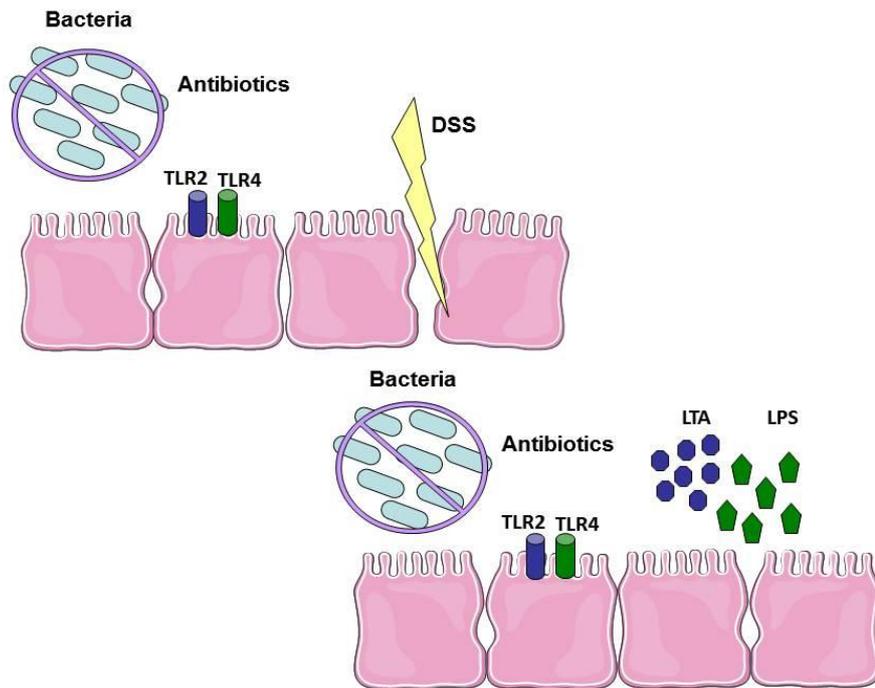


Figure 27. Rôle des TLR dans la fonction de la barriere intestinale.

En appui à cette hypothèse, il a été montré que les souris dépourvues de TLR2, -4, -9 ou de Myd88, la protéine adaptatrice commune à la majorité des TLR, sont particulièrement sensibles aux colites[300,313]. Les TLR jouent de multiples rôles dans l'inflammation et l'immunité intestinales. Ils induisent la production de protéines antimicrobiennes, comme les lectines de type C, par les cellules intra-épithéliales (IECs) ainsi que la production constitutive des IgA. A ce propos, il a été montré que les souris GF et les souris déficientes en signalisation TLR ont des quantités faibles d'IgA dans le lumen.

Les TLR jouent de multiples rôles dans la production des IgA dans l'intestin. La stimulation des TLR par le LPS peut se substituer à la voie CD40/CD40L et agir directement sur les lymphocytes B avec le TGF- β pour amorcer la commutation de classe vers l'isotype IgA de façon indépendante des lymphocytes T[314]. Les ligands microbiens peuvent également participer à la commutation de class indépendante des cellules T par l'induction d'iNOS dans les CDs intestinales. La voie iNOS ainsi activée augmente la production par les CDs d'APRIL (A Proliferation-Inducing Ligand) et de BAFF (B-cell-Activating Factor of the Tumour Necrosis Factor (TNF) Family) qui participent, après liaison à leurs récepteurs sur les lymphocytes B, à la commutation de classe IgA[315]. Un autre mécanisme impliqué dans la production d'IgA intestinales est dépendant de TLR5. En effet, la

stimulation de TLR5 par la flagelline induit la production d'acide rétinoïque spécifiquement par les CD^s CD11b^{high}CD11c^{high} de la LP de l'intestin grêle, mais pas par exemple par les CD^s spléniques. L'acide rétinoïque favorise la différenciation des lymphocytes B naïfs en plasmocytes producteurs d'IgA[316].

Il est important de noter que la production d'IgA par la voie dépendante des lymphocytes T a également été décrite dans l'intestin notamment contre des bactéries capables de s'attacher à l'épithélium comme les bactéries filamenteuses segmentées[317]. Contrairement au cas des IgA produites de façon indépendante des lymphocytes T, les lymphocytes B dépendant des lymphocytes T ont une durée de vie plus longue, peuvent migrer vers les centres germinatifs et y subir l'hyper-mutation somatique et produisent des IgA de haute affinité[318].

Parmi les PRRs, certains membres de la famille NLR (NOD-like receptors), notamment les protéines NOD (Nucleotid-binding Oligomerization Domain) 1 et NOD2 jouent un rôle important dans la réponse au microbiote. Les motifs du peptidoglycane (PGN) reconnus par NOD2 sont exprimés par les bactéries à Gram positif et négatif alors que ceux reconnus par NOD1 sont préférentiellement présents dans les bactéries à Gram négatif[319]. L'activation des protéines NOD est impliquée dans la production des cytokines pro-inflammatoires après activation de NF- κ B. NOD2 est exprimé dans les monocytes et les cellules de Paneth et est nécessaire pour l'expression des protéines antimicrobiennes dans les cellules de Paneth[320]. Contrairement à l'expression cellulaire restreinte de NOD2, NOD1 est exprimé de façon plus générale, y compris dans les IEC. Par conséquent, il a été proposé que NOD1 et NOD2 jouent des rôles différents dans le système immunitaire intestinal.

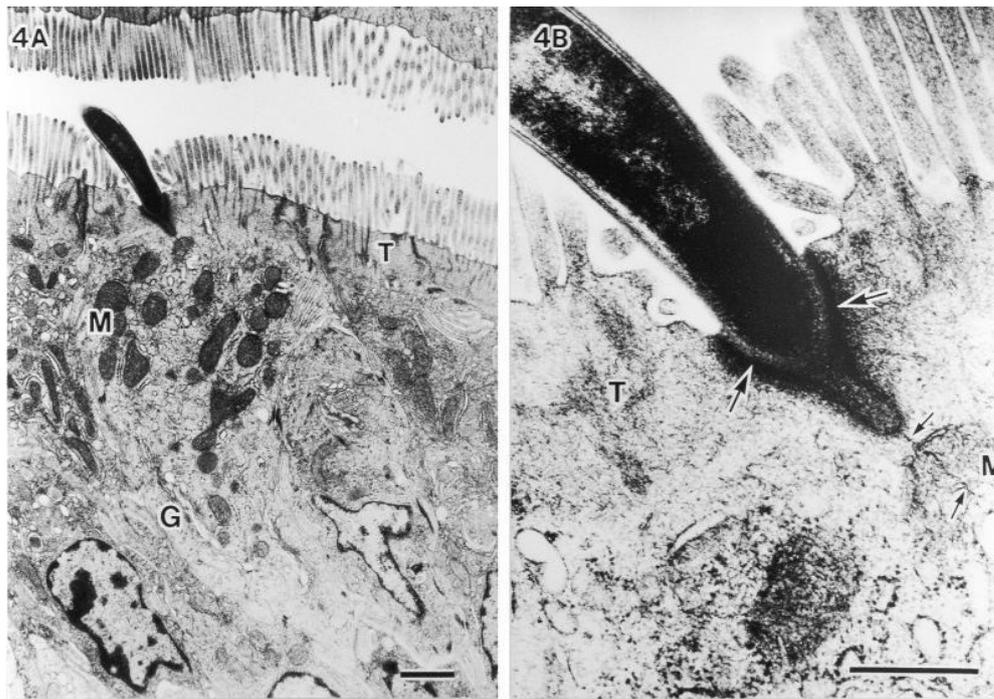
IV.2. b T_H17 et microbiote

En conditions physiologiques les cellules T_H17 sont présentes en grand nombre dans la LP (lamina propria) intestinale de souris, en particulier dans l'intestin grêle[321,322]. En revanche, dans les sites extra-intestinaux, seul un faible pourcentage de cellules CD4⁺ TCR $\alpha\beta$ expriment normalement l'IL-17[322]. En appui de cette évidence, il a été montré que chez les souris GF ou traités avec des

antibiotiques, le pourcentage de cellules T_H17 dans la LP est nettement réduit[321,322] suggérant que le développement des cellules T_H17 dépend de la stimulation constitutive par la flore microbienne intestinale. Notamment, les souris déficientes pour TLR9 ont un nombre diminué de cellules T_H17 de la LP[323]. De plus, la différenciation *in vitro* de cellules T_H17 intestinale est améliorée par l'addition de la flagelline, un ligand de TLR5[315] et de l'inflammasome NLRC4[324,325]. Egalement, les IEC apoptotiques infectées par des bactéries fournissent des ligands de TLR qui déclenchent la production d'IL-6 et TGF-β par les CDs, résultant dans la promotion de la différenciation T_H17[326]. En plus des effets liés à l'expression de PAMPs, l'adénosine extracellulaire 5'-triphosphate (ATP) dérivé de la flore microbienne peut induire des cellules T_H17[321]. En effet, en activant les récepteurs purinergiques P2X (et P2Y) exprimés sur les cellules CD70^{high}CD11c⁺ de la LP, l'ATP induit l'expression de l'IL-6, de l'IL-23p19 et des intégrines αV et β8 activatrices de TGF-β, favorisant ainsi la différenciation des T_H17[321].

De plus, certains membres du microbiote jouent des rôles particulièrement importants dans le développement des T_H17 intestinales. Notamment, l'observation que les souris élevées en conditions SPF mais provenant de sources (animaleries) distinctes avaient des différences marquées dans la fréquence de T_H17 dans la LP[322] a conduit à l'identification des bactéries filamenteuses segmentées (SFB) comme membres du microbiote indigène responsable en grande partie de l'accumulation intestinale de cellules T_H17[327]. Le rôle de ces bactéries dans le développement des T_H17 a été simultanément identifié par une étude systématique dans laquelle l'incapacité de mélanges complexes de bactéries à mimer l'induction des T_H17 intestinale obtenue par un microbiote complet a conduit les auteurs à conclure que cette fonction était dévolue à un nombre restreint de membres du microbiote et à attribuer ainsi ce rôle aux SFB[328]. De plus, cette étude a montré que la colonisation par les SFB peut également influencer l'accumulation de cellules productrices d'IFN-γ dans la LP[329].

La différenciation des T_H17 médiée par SFB se produit par un mécanisme indépendant des TLRs, de NOD, ou de la signalisation de l'ATP. Notamment, il a été proposé que la fixation de la SFB dans l'épithélium induit des changements morphologiques dans les IEC tels que l'accumulation d'actine autour du site de fixation[330,331] (Fig. 28).



K.Yamauchi, J.Snel *Infect. Immun.*, 2000

Figure 28. Altérations structurales fines de cellules épithéliales iléales attachées par SFB. (A) Agrégat des mitochondries (M) et organes de Golgi bien développés (G) (bar, 1 μm; grossissement, × 9000). (B) Grossissement supérieur de la surface cytoplasmique de l'hôte dense aux électrons autour du segment crampon de bactéries (grandes flèches) et des membranes SFB (petites flèches) se prolongeant plus profondément vers les mitochondries (M) (bar, 0,5 μm; grossissement × 45000) .

Aussi, la colonisation par SFB induit l'expression des gènes associés à l'inflammation, tels que ceux codant pour la protéine amyloïde sérique A (SAA), les protéines du CMH de classe II, la 2 fucosyltransférase (FUT2), et les défensines dans les IEC[327,332,333]. L'ajout de SAA recombinante aux co-cultures de cellules naïves T CD4⁺ et CD de la LP induit la différenciation des cellules T_H17 *in vitro*. Par conséquent, un modèle plausible est que l'attachement de SFB induit une cascade inflammatoire, qui comprend la production de SAA qui agit sur les DCs de la LP pour stimuler la différenciation des cellules T_H17.

La colonisation par SFB et l'induction consécutive de cellules T_H17 a une fonction de protection de la muqueuse intestinale contre les bactéries pathogènes, telles que *C. rodentium*[327]. Mais les paramètres qui déterminent si les cellules T_H17 intestinales jouent un rôle bénéfique ou nuisible pour l'hôte ne sont pas pleinement compris. L'IL-23 et l'IL-1β sont des candidats importants possibles pour déterminer le destin des T_H17 vers des fonctions plutôt pathogéniques ou protectrices. De façon intéressante, les cellules T_H17 proinflammatoires peuvent être redirigées et contrôlées dans le petit intestin[334]. Au cours de la réponse immunitaire qui induit de préférence la différenciation des cellules T_H17 dans le duodénum il y a expression de CCL20. Cette dernière recrute au duodénum les cellules T_H17 qui expriment CCR6, où elles sont éliminées ou

reprogrammées pour acquérir des propriétés immunosuppressives et régulatrices, y compris l'expression d'IL-10 (ce point a été discuté de façon plus approfondie précédemment dans le paragraphe II.4.a. T_H17 et Treg).

La spécificité antigénique des cellules T_H17 intestinales reste pour le moment également non complètement élucidée (nous reviendrons sur ce point dans le chapitre consacré aux SFB). Considérant que les cellules T_H17 induites par SFB peuvent contribuer à l'arthrite auto-immune dans le modèle de souris K/BxN[335] et à la résistance de l'hôte à des bactéries pathogéniques comme *C. rodentium*, les cellules T_H17 présentes dans l'intestin pourraient avoir un large répertoire de TCR et ne pas être spécifique à un seul microbe. Alternativement, les T_H17 spécifiques de SFB ou d'autres bactéries intestinales pourraient jouer un rôle auxiliaire ou adjuvant dans le développement d'autres effecteurs de l'immunité, comme les anticorps, dont la spécificité influencera le rôle protecteur ou pathogénique de la réponse. Dans des modèles de souris transgéniques exprimant un seul TCR il a été montré que les cellules T_H17 intestinales peuvent être générées en absence de l'antigène dont le TCR est spécifique[336]. Des plus, il a été montré qu'une population de cellules T_H17 pouvaient se développer dans le thymus et, par analogie au Treg naturels, elles ont été appelées T_H17 naturelles (nT_H17)[337]. De façon intéressante, ces cellules expriment les intégrines $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha 4\beta 7$ et le récepteur de chimiokines CCR6 suggérant qu'elles migrent préférentiellement vers les muqueuses, en particulier la muqueuse intestinale. Ces cellules ont un répertoire TCR biaisé (utilisation préférentielle du TCR V β 3) et sont potentiellement auto-reactives[337].

IV. 2. c. Treg FOXP3⁺ et microbiote

Les lymphocytes FOXP3⁺ Treg proviennent de deux sources: les Treg naturels (nTreg) qui se développent dans le thymus et les Treg induits (iTreg) qui ont un développement post-thymique dans la périphérie. Les Treg sont présents pratiquement dans tous les organes et leur fréquence est typiquement d'environ 5-10% des cellules T CD4⁺ totales. En revanche, la fréquence des Treg FOXP3⁺ dans la LP est significativement plus élevée, particulièrement dans la LP du côlon (> 30%)[338], où au même la quantité de microorganismes commensaux est la plus élevée. En effet, l'intestin représente un défi majeur pour le système immunitaire qui doit être capable de contrôler les microorganismes pathogéniques tout en assurant une tolérance vis à vis des antigènes alimentaires et, de façon importante, vis à vis du microbiote. Comme nous l'avons évoqué dans le chapitre « II.3.c. Treg naturels et induits : ontogénie, marqueurs et fonctions » (P.

42), l'origine des Treg intestinaux reste débattue[126]. Cependant, *in vivo*, la différenciation périphérique des cellules T CD4⁺ FOXP3⁻ naïves en Tregs FOXP3⁺ peut être observée expérimentalement dans la LP intestinale et le GALT (Gut Associated Lymphoid Tissue) après exposition par voie orale à un antigène et grâce à l'environnement intestinal riche en TGF-β et en acide rétinoïque[131,339,340]. De façon intéressante, les Treg Helios⁻, donc en principe iTreg comme discuté précédemment, sont particulièrement abondants dans la LP intestinale[126,338,341], suggérant que l'intestin est un site majeur de développement des Treg dans la périphérie. Une série d'études indépendantes permet d'appuyer le rôle majeur du microbiote dans le développement des iTreg intestinaux, notamment coliques. Les Lactobacilles et les Bifidobactéries ont été impliqués dans l'induction de Treg chez la souris mais les effets directs de ces souches probiotiques sur l'induction des Treg ne sont pas bien établis. L'effet observé pourrait découler de leur influence sur l'écologie microbienne dans l'intestin, plutôt que d'un rôle direct dans l'induction des Treg.

Le commensal *B. fragilis* humain, en revanche, facilite la maturation fonctionnelle des cellules Treg chez la souris[342] et la monocolonisation avec *B. fragilis* stimule la production d'IL-10 dans les cellules Treg du côlon, mais l'effet sur le nombre de Treg reste marginal. L'induction de l'IL-10 dans les cellules Treg par *B. fragilis* a été attribuée au polysaccharide A (PSA), un polysaccharide de surface unique de *B. fragilis*. En particulier, la PSA se lie à TLR2 sur les T CD4⁺ pour induire la production d'IL-10[342] qui conduit, à son tour, à la suppression des réponses cellulaires T_H17. *B. fragilis* est cependant un commensal humain plutôt que murin et donc ses effets chez la souris pourraient ne pas refléter les fonctions de ce commensal évolutivement sélectionné. Des études plus récentes ont démontré que, parmi les bactéries formant le microbiote indigène de la souris, les bactéries sporulantes, en particulier celles des groupes XIVa et IV du genre *Clostridium*, sont des inductrices de cellules Treg colique[338]. En effet, les *Clostridium* spp. colonisent préférentiellement le caecum et le côlon, forment une couche épaisse et favorisent la production des métalloprotéinases matricielles (MMP) par les IECs. Les MMP sont impliquées dans la conversion du TGF-β de la forme latente à la forme active[343]. Par ailleurs, la colonisation par les *Clostridia* augmente l'expression d'IDO, qui a également été impliquée dans l'induction de cellules Treg[344]. Comme chez les souris avec un microbiote normal, les cellules Treg dans le côlon des souris colonisées par les *Clostridia* se composent d'un grand nombre de cellules Helios⁻[338]. De plus, un grand sous-ensemble de Treg induits par les *Clostridia* exprime des niveaux élevés d'IL-10 et de CTLA-4. Par conséquent, les *Clostridia* pourraient affecter non seulement le développement

des Treg coliques mais également leur fonctionnalité. Il est intéressant de noter que certaines souches de Clostridia impliquées dans l'induction des Treg produisent du butyrate dont le rôle direct dans la différenciation des Treg coliques a été mis en évidence comme nous l'avons discuté dans le chapitre « II.3.c. Treg naturels et induits: ontogénie, marqueurs et fonctions ».

Une étude récente de notre laboratoire a suggéré que le butyrate pourrait jouer également un rôle dans la phase effectrice de la réponse régulatrice. En effet, la production d'IL-10 par les lymphocytes T double producteurs d'IL-10 et d'IL-17, dont la fréquence est élevée dans l'intestin[157], est favorisée lorsque les cellules sont stimulées en présence de butyrate et cela qu'elles soient FOXP3⁺ ou FOXP3⁻[345].

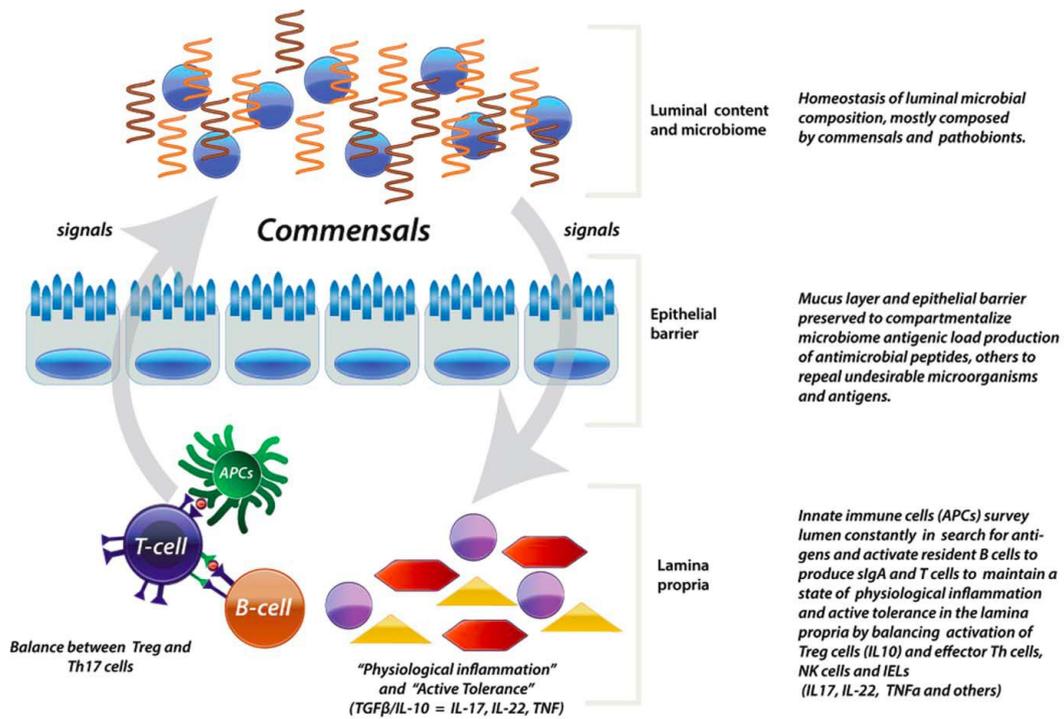
IV.3. Rôle du microbiota dans la pathogenèse des maladies autoimmunes

Plus de 80 pathologies humaines regroupées sous la dénomination de maladies autoimmunes (MAI) sont définies par une rupture de la tolérance au soi et par le développement d'une réponse immunitaire adaptative, humorale et/ou cellulaire, contre les antigènes du soi. Même si les autoantigènes reconnus ne sont pas systématiquement identifiés et même si les dommages tissulaires observés dans ces maladies ne sont pas toujours directement causés par les effecteurs de l'immunité adaptative mais plutôt de l'inflammation chronique qui s'en suit, l'autoimmunité peut être transférée par les anticorps autoréactifs, durant la grossesse par exemple et dans des modèles murins, ou par les lymphocytes T autoréactifs dans des modèles murins. La recherche dans ce domaine s'est longtemps focalisée, et continue de l'être, sur les mécanismes qui sous-tendent la rupture de la tolérance au soi. En dehors des MAI monogéniques rares liées à des mutations qui abolissent les fonctions de gènes essentiels impliqués dans la tolérance comme FOXP3 (syndrome IPEX, Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked) ou AIRE (APS-1, Autoimmune polyendocrine syndrome type 1), la majorité des MAI sont multifactorielles. Des signatures géniques, le plus souvent liées à la réponse immunitaire, commencent à émerger grâce au développement des techniques de séquençage de l'ADN et de l'ARN à large échelle. Il s'agit cependant de signatures globales qui ne sont pas forcément liées à une augmentation importante du risque relatif de développement de la maladie. Plusieurs MAI sont également associées à certains allèles HLA comme HLA-B27 dans la spondylarthrite (AS, ankylosing spondylitis) et le rhumatisme psoriasique (PsA, psoriatic arthritis) et HLA-DR4 dans la polyarthrite rhumatoïde (RA, rheumatoid arthritis) qui sont associés à une augmentation du risque

relatif de développer la maladie. Les prédispositions génétiques n'étant pas systématiquement liées au développement de la maladie, le rôle de l'environnement dans le déclenchement de la maladie s'est imposé comme facteur additionnel. L'implication de facteurs environnementaux au sens large est soutenue par la prévalence plus importante des MAI dans les pays développés. Le lien possible entre immunité antimicrobienne et MAI a été suggéré depuis de nombreuses années et a été envisagé sous différents aspects[346]. Les infections par des pathogènes ont été proposées comme événements déclencheurs possibles et cela soit par une rupture de la tolérance aux autoantigènes présentés dans le contexte inflammatoire de l'infection soit par l'induction de réponses adaptatives contre des épitopes du pathogène qui reconnaissent aussi les antigènes du soi à cause d'un mimétisme moléculaire entre les deux catégories d'antigènes. Le rôle de l'immunité antimicrobienne a été également évoqué afin d'expliquer les différences dans la prévalence de ces maladies entre les pays développés et ceux en voie de développement. Dans ce cas, un fonctionnement moins optimal du système immunitaire à cause d'une exposition moins importante aux pathogènes dans les pays développés a été proposé comme facteur potentiel du déclenchement des MAI. Les développements récents des techniques à haut débit de séquençage de l'ADN qui ont permis le séquençage du microbiome humain ainsi que la compréhension croissante du rôle du microbiote, notamment intestinal, dans l'homéostasie de la réponse immunitaire (Fig. 29) ont suscité un nombre, qui ne cessent de croître, d'études qui investiguent le lien potentiel entre microbiote et MAI. Le rôle du microbiote est investigué dans des modèles murins et chez l'homme dans des MAI de l'intestin, dans d'autres MAI à distance de l'intestin comme les diabète de type 1 (T1D) et dans des MAI systémiques comme la RA, l'AS et les maladies liées à cette dernière[347–349].

Plusieurs maladies autoimmunes ont une incidence plus élevée chez la femme ; pour certaines de ces maladies >85% des patients sont des femmes[350]. Alors que le sexe peut influencer la réponse immunitaire par différents mécanismes impliquant directement l'action des hormones sexuelles sur des populations cellulaires de l'immunité, plus récemment il a été proposé que les hormones peuvent influencer le développement des maladies autoimmunes par l'intermédiaire de leur effet sur le microbiote[350]. Par exemple, dans le modèle de développement spontané de T1D NOD (nonobese diabetic), la tendance supérieure des souris femelles à développer la maladie est réduite lorsque ces souris sont axéniques[351]. De plus, dans ce même travail une différence dans la composition du microbiote entre les souris mâles et femelles a été mise en évidence et cette différence a pu être réduite par castration. Chez l'homme l'influence des hormones sur la

composition du microbiote a été suggérée par des études chez des jumeaux monozygotes[352]. Le degré de proximité dans la composition du microbiote entre les jumeaux durant l'enfance était le même qu'ils soient du même sexe ou pas. A la puberté, le degré de proximité était plus important entre les jumeaux du même sexe qu'entre ceux de sexes opposés.



J. U. Scher et al., *Arthritis & Rheumatology* 2016

Figure 29. Homéostasie du microbiote intestinal dans l'état physiologique.

Les maladies inflammatoires de l'intestin (IBD, inflammatory bowel diseases) incluent la maladie de Crohn (CD, Crohn's disease) et la colite ulcéreuse (UC, ulcerative colitis), qui touchent ensemble plus de 3,6 millions personnes[353]. Le lien entre ces maladies et la flore intestinale est étudié depuis de nombreuses années, probablement à cause de leur localisation dans un organe en proximité directe du microbiote. Dans ces maladies, des anticorps sériques spécifiques de différents microbes ont été mis en évidence[354]. Cependant, les études divergent quant à l'interprétation du rôle des perturbations de l'immunité au microbiote observées dans les IBD. Certaines études proposent que celles-ci sont une conséquence de l'inflammation chronique dans ces maladies et d'autres, au contraire, proposent que ces perturbations ainsi que la rupture de la barrière épithéliale participent à l'enclenchement de la maladie[355]. Les études récentes de métagénomique montrent un déséquilibre structurel, ou dysbiose, qui se produit et une tendance

générale à la réduction de la biodiversité, en particulier une diminution de la représentation de plusieurs taxons dans le phylum *Firmicutes*, et une augmentation des *Gammaproteobacteria*[356,357]. Certaines bactéries peuvent au contraire être enrichies, comme une souche de *E. coli* particulièrement adhérente et invasive, qui a été isolée de l'iléon des patients atteints de CD[358] et qui est aussi retrouvée chez les patients souffrant d'UC[359].

Un deuxième groupe de bactéries adhérentes et invasives est constitué par les *Fusobacteria*. *Fusobacterium* spp. a été trouvé abondant dans la muqueuse colique des patients atteints d'UC par rapport aux individus contrôles[360,361]. Dans le diabète de type 1, une MAI spécifique d'organe mais dont la cible, le pancréas, n'est pas directement en lien avec le microbiote, plusieurs études réalisées chez l'homme ont suggéré une association entre le microbiote intestinal et le risque de développer la maladie[362]. En particulier, il a été montré que les enfants affectés de T1D ont une faible représentativité en bactéries productrices de butyrate[363]. De plus, les enfants avec une propension au diabète ont un déséquilibre, avec une augmentation des *Bacteroidetes* et une réduction des *Firmicutes*, qui s'installe au fil du temps dans la petite enfance. Cette composition du microbiote est opposée à celle observée dans les sujets contrôles[363–365]. Cependant, il ne semble pas qu'il ait une seule espèce de la communauté microbienne intestinale qui puisse être identifiée comme agent causal de la maladie. Au contraire, chez les individus génétiquement prédisposés, des preuves émergentes indiquent qu'une dysbiose dans le microbiote intestinal et l'interruption de la colonisation microbienne tôt dans la vie, même dès la naissance ou dans la période néonatale, serait associée à l'émergence et à la progression du T1D. En appui à cette hypothèse, les bébés nés par césarienne ont un risque accru de développer un T1D[366,367]. La spéculation est que l'accouchement par césarienne est associé à un manque d'exposition à un certain type de microbiote résultant en un risque d'autoimmunité future chez les individus génétiquement prédisposés.

Le microbiote a également été incriminé dans la physiopathologie de MAI systémiques comme les spondylarthropathies et la polyarthrite rhumatoïde[349]. La spondylarthrite ankylosante (AS) et le rhumatisme psoriasique (PsA) ont des manifestations cliniques hétérogènes rendant le diagnostic difficile, ont HLA-B27 comme facteur génétique de prédisposition et sont parmi les MAI où les T_H17 et leur cytokine pro-inflammatoire principale, l'IL-17, jouent un rôle important. Ces deux maladies peuvent aussi apparaître en association avec l'IBD. Le rôle du microbiote dans ces maladies a été proposé dans des modèles expérimentaux chez l'animal. Dans les modèles de rats

transgéniques qui expriment HLA-B27 et la β 2-microglobuline humaine une maladie équivalente à l'AS se développe spontanément[368]. Cependant, le maintien de ces mêmes animaux en conditions GF abolie le développement de la maladie[369]. La colonisation de ces animaux par différentes espèces de *Bacteroides* suffit à enclencher la maladie[370]. Une étude particulièrement intéressante a montré que l'expression d'HLA-B27 chez le rat altère la composition du microbiote, avec une augmentation des espèces *Prevotella* et une diminution de *Rikenellaceae* et *Akkermansia*, même avant l'apparition des signes de la maladie. Cette étude suggère donc que le facteur génétique prédisposant à la maladie altère la composition du microbiote[371].

À ce jour, il y a eu peu d'études exhaustives du lien entre le microbiome et ces maladies chez l'homme. *Klebsiella pneumoniae*, *Bacteroides vulgatus*, et les bactéries réductrices de sulfate (SRB, sulfate reducing bacteria), par exemple *Desulfovibrio desulfuricans*, ont été impliquées dans la pathogenèse de l'AS et de la rectocolite hémorragique. Les SRB sont retrouvées en plus grand nombre dans les matières fécales de patients atteints d'AS[372] et dans les côlons des patients atteints d'IBD[373], et il a été postulé que le sulfure d'hydrogène produit par les SRB initie des lésions de la muqueuse résultant dans une augmentation de la perméabilité de l'intestin[372,373].

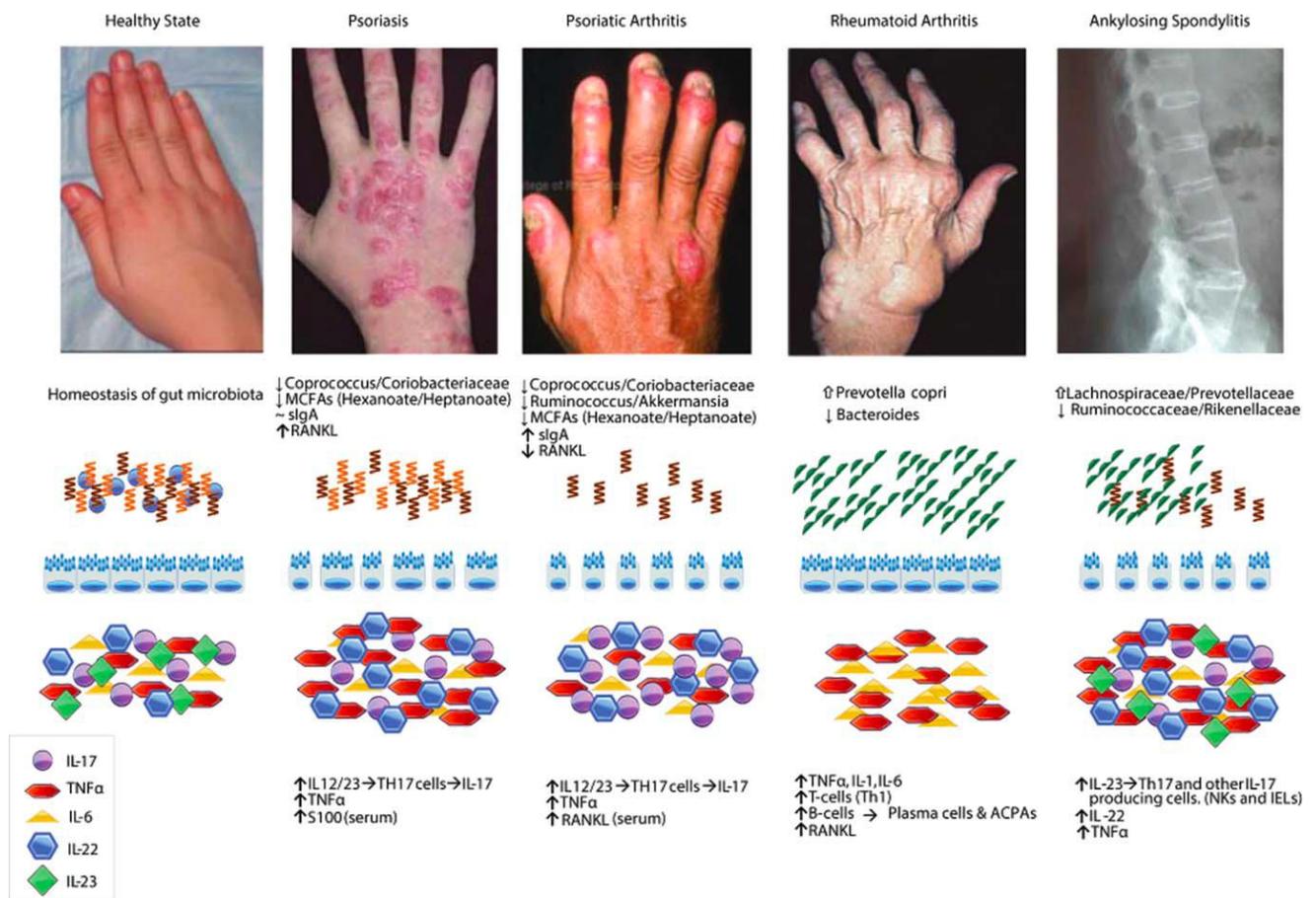
Même si l'augmentation de la colonisation intestinale avec des espèces de *Klebsiella* a été rapportée par plusieurs études[374], d'autres ont échoué à démontrer une augmentation fécale de la bactérie ou une augmentation des réponses immunitaires cellulaires ou humorales à *Klebsiella*.

La polyarthrite rhumatoïde (RA) est une MAI systémique chronique caractérisée par une inflammation synoviale et une érosion de l'os et du cartilage, progressant vers une invalidité fonctionnelle[375,376]. Les signes biologiques de l'autoimmunité dans la PR sont détectables des années avant que l'apparition des manifestations cliniques. Les auto-anticorps circulants contre les peptides cycliques citrullinés (ACPA, Anti-citrullinated protein antibodies) et le facteur rhumatoïde (RF, rheumatoid factor) sont détectables jusqu'à une décennie avant l'apparition clinique de la maladie[377]. La littérature récente soutient l'association entre la PR et la dysbiose, avec un intérêt particulier dans les études les plus anciennes dans le microbiote parodontal. Les modèles animaux indiquent que les pathobiontes parodontaux comme *Porphyromonas gingivalis* et *Porphyromonas nigrescans* augmentent considérablement la gravité de l'arthrite induite par le collagène (CIA), un modèle murin de PR, avec une corrélation entre l'induction d'IL-17 par les

bactéries et l'intensité de l'érosion osseuse[378]. De plus, chez l'homme, les patients nouvellement diagnostiqués ont une prévalence plus élevée de parodontite sévère malgré leur jeune âge, la rareté d'antécédents de tabagisme et une routine normale d'hygiène buccale[379]. De plus, les patients atteints de PR souffrent de parodontites[380] et la sévérité de la maladie parodontale est corrélée avec l'activité de la PR[381]. Au contraire, les patients qui reçoivent un traitement pour la PR montrent des améliorations parodontales avec une diminution concomitante des ACPA, des anticorps anti-*P. gingivalis*[382] et des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α [383].

Cependant, il reste encore à déterminer si la maladie parodontale précède le développement de la PR, ou si la parodontite est une caractéristique extra-articulaire de la PR, et dans ce cas, les tissus parodontaux et les articulations sont des cibles préférentielles des mêmes effecteurs auto-immuns. Pour explorer cette relation, *Marchesan et al.* ont utilisé le modèle de souris CIA et ils ont montré qu'une infection par *P. gingivalis* augmente la gravité des manifestations articulaires et est associée à un profil de cytokines pro-inflammatoires liées notamment à la voie T_H17[384].

Un point particulièrement intéressant dans le cas de *P. gingivalis* est la présence d'un gène codant pour une peptidylarginine déiminase nécessaire à la conversion des résidus arginine en citrulline et qui n'a pas été décrit pour le moment dans d'autres procaryotes. Ainsi, *P. gingivalis* pourrait être impliquée dans la pathogenèse de l'auto-immunité en facilitant la génération de protéines citrullinées qui peuvent favoriser la perte de la tolérance immunitaire et la production d'ACPA. L'hypothèse émise suite à ces travaux propose que *P. gingivalis* pourrait contribuer à l'initiation de la maladie chez des personnes ayant par ailleurs d'autres facteurs de prédisposition, par exemples génétiques. D'autres études, plus récentes, ont lié la PR à une dysbiose cette fois intestinale. *Vahtovuori et al.* ont identifié une dysbiose du microbiote fécal, caractérisée par une diminution des *Bifidobactéries* et des *Bacteroidetes*, chez les patients atteints de PR nouvellement diagnostiqués par rapport aux témoins[385]. De même, le séquençage des gènes codant pour l'ARN 16s dans les prélèvements fécaux a montré que les patients atteints de RA portent un entérotype distinctif de microbiote intestinal caractérisé par une abondance de *Prevotella copri* et un manque relatif de *Bacteroides*[386]. *P. copri* corrèle avec la sévérité de la maladie mais son rôle dans l'initiation ou la progression de l'auto-immunité reste largement inexploré (Fig. 30).



J. U. Scher et al., Arthritis & Rheumatology 2016

Figure 30 : Effets proposés de la dysbiose dans des MAI systémiques.

Alors que dans leur ensemble ces études suggèrent un lien entre le microbiote et des MAI spécifiques d'organe et systémiques, l'exploration du rôle de ces perturbations en terme de mécanismes immunitaires impliqués n'est qu'à ses débuts. De plus, il sera nécessaire de comprendre si ces perturbations sont causales de la maladie, si elles en sont une conséquence qui influence tout de même les réponses immunitaires et/ou l'inflammation chronique associée, ou si ces différents effets peuvent coexister.

IV.4. Les bactéries segmentées filamenteuses et le système immunitaire

Le terme « bactéries segmentées filamenteuses » (SFB, segmented filamentous bacteria) a été utilisé pour décrire des bactéries de forme filamenteuse fixées à la muqueuse épithéliale digestive d'un nombre d'invertébrés et de vertébrés observées par microscopie[387–389]. La forme de ces

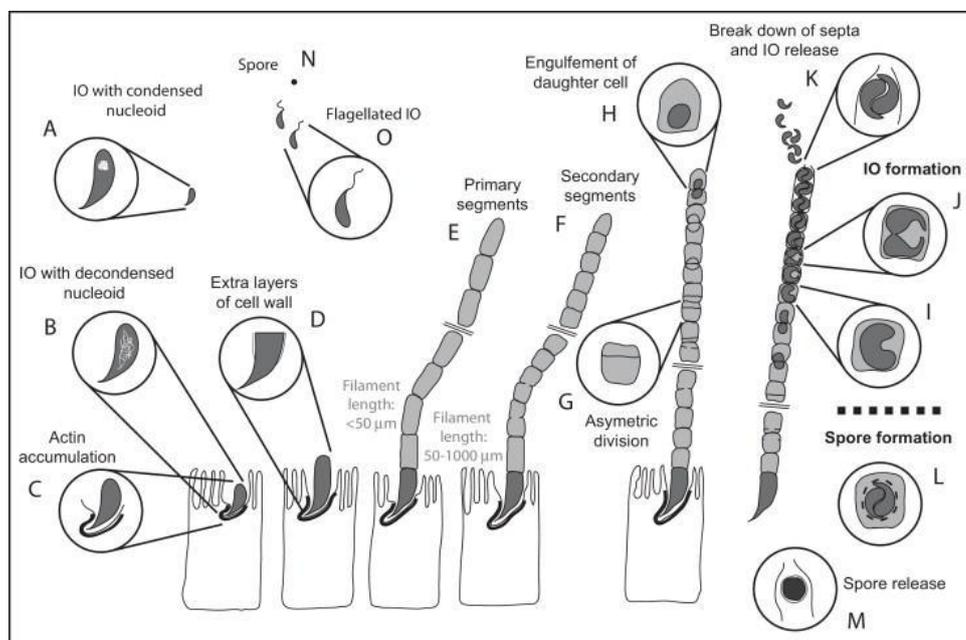
bactéries était à la base du nom qui leur a été attribué afin de les classifier, "*Candidatus Arthromitus*" (du grec "fil articulé"). L'amplification des gènes codant pour l'ARN ribosomique (ARNr) 16S des filaments bactériens prélevés de l'intestin de termites a permis de les classifier dans une lignée distincte dans la famille des *Lachnospiraceae*, qui fait partie de l'ordre des *Clostridiales*[390]. Le séquençage du génome complet des SFB colonisant l'intestin de souris et de rat a permis de confirmer leur phylogénie comme groupe unique parmi les *Clostridia*[391–393]. Des études récentes sur les fonctions de ces bactéries ont permis de démontrer qu'elles jouent un rôle unique dans le développement du système immunitaire intestinal qui ne pouvait pas être récapitulé par un microbiote complet dépourvu de SFB[389]. Ces observations ont inspiré une proposition de changement de leur nom vers *Arthromitus immunis*[392], qui permettrait de refléter leur importance dans l'immunité.

Les SFB des vertébrés partagent un degré élevé des similitudes morphologiques[394–396]. Les études de microscopie ont montré que ces bactéries possèdent une structure unique qui assure leur attachement aux cellules de l'hôte (cellules épithéliales et cellules couvrant les plaques de Peyer, y compris les cellules M)[394,397].

Les SFB murines colonisent de façon prédominante l'iléon terminal et le cæcum, la colonisation baisse en direction de l'intestin grêle proximal et n'a pas été observée dans le gros intestin, excepté chez les souris mono-associées[398]. Au niveau temporel, cette colonisation intervient au moment de l'allaitement chez la souris et les nombres de bactéries commencent à baisser après quelques semaines[398]. Les études de microscopie électronique réalisées durant les années 1970s ainsi que des études fonctionnelles et génomiques réalisées plus tardivement ont permis de proposer un schéma possible du cycle de vie de ces bactéries qui ne semblent pas suivre un schéma classique de reproduction par fission binaire[389,399] (Fig. 31). Les spores transmises aux nouveau-nés germent dans l'intestin et produisent des bactéries unicellulaires dont la forme est apparentée à celle d'une larve et qui ont été qualifiées de descendants intracellulaires (IO, intracellular offsprings)[394,395,399]. Les IO libérés lors de la germination peuvent utiliser la motilité d'un flagelle pour atteindre la surface de l'épithélium de l'intestin grêle[391].

Elles vont ensuite s'attacher aux cellules intestinales, par la structure qui fonctionne comme un « crampon », et induire des réarrangements d'actine au niveau de la cellule cible. Cette fixation, permet ensuite la croissance des bactéries et leur division qui commence par la formation d'une cloison transversale. Les filaments continuent de croître à partir de leur extrémité libre. Une deuxième série de segmentation commence alors à partir de l'extrémité libre en divisant chaque

segment primaire en deux. Intervient ensuite une étape de différenciation avec une division des segments secondaires en deux cellules de taille inégale avec une cellule mère qui engloût la cellule fille plus petite. Les cellules filles se divisent à l'intérieure des cellules mères et forment deux IO. Dans des conditions de croissance continue dans l'intestin, les septa des cellules mères qui séparent les compartiments individuels des IO dégénèrent pour former un tube creux duquel les IO sont libérés à l'extrémité distale terminant ainsi le cycle de vie au sein de l'hôte avec les IO ainsi libérés qui vont pouvoir s'attacher aux cellules intestinales et démarrer un nouveau cycle de filamentation et de différenciation[387,394,396]. En conditions de stress, chaque deux IO au sein de la cellules mères poursuivent leur développement en spores qui seront libérées et qui permettront la transmission à un nouvel hôte après passage par les matières fécales[394,400,401].



P. Schnupf et al., Semin. Immunol., 2013

Figure 31 : Cycle de vie proposé des SFB dans l'intestin de l'hôte.

Ce cycle et notamment la nécessité de s'attacher aux cellules intestinales semblent être en lien avec plusieurs particularités des SFB. L'attachement aux cellules intestinales semble conférer une spécificité bactérie-hôte. Il a été en effet observé que les SFB de souris sont incapables de coloniser l'intestin de rat et vice versa[402]. Cette spécificité suggère que l'attachement implique des interactions spécifiques type ligand-récepteur. De plus, il semblerait que cet attachement implique également une réaction spécifique et active des cellules de l'hôte avec une condensation de l'actine au point d'ancrage. De tels événements sont censés représenter un signal de danger

pour le système immunitaire de l'hôte. Et en effet, il a été récemment montré que ce mode d'attachement avait des conséquences sur l'immunogénicité de ces bactéries[403,404].

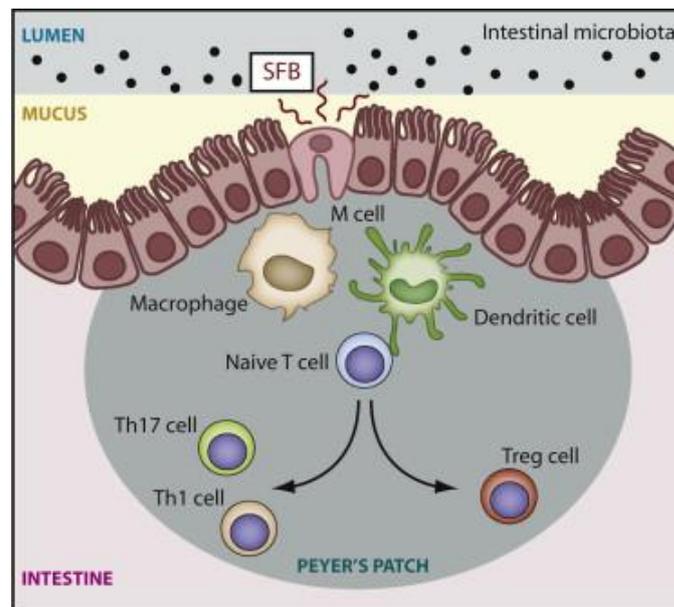
De manière générale, l'adhésion à la muqueuse intestinale est une caractéristique typique des agents pathogènes, mais un trait inhabituel pour des commensaux. Cependant, la colonisation par SFB ne provoque pas une inflammation pathologique mais est plutôt associée à une meilleure protection contre les agents pathogènes intestinaux et à un rôle central dans la maturation postnatale de la barrière immunitaire intestinale.

L'analyse récente des génomes complets des SFB associées à l'intestin de souris et de rat a révélé qu'il s'agit de génomes de taille réduite en comparaison à ceux d'autres commensaux[391–393]. Les analyses de génomique fonctionnelle ont révélé que ce génome réduit résulte dans une auxotrophie de ces bactéries que ce soit au niveau de la synthèse d'acides aminés, de vitamines, de cofacteurs ou d'acides nucléiques[391–393,405]. Ces résultats suggèrent leur dépendance nutritionnelle de l'hôte, de son alimentation ou d'autres microorganismes commensaux qui cohabitent avec les SFB dans l'intestin. Basé sur ces caractéristiques, il a été proposé que les SFB se placeraient entre le statut de symbiote obligatoire et celui de symbiote facultatif[389].

La réponse immunitaire stimulée par les SFB a surtout été étudiée chez la souris. Les SFB sont capables d'induire une réponse humorale à dominance IgA, elles activent les lymphocytes T intra-épithéliaux et elles stimulent une réponse T CD4. La colonisation par les SFB augmente le nombre plasmocytes sécréteurs d'IgA au niveau de l'intestin et de la rate ainsi que le taux d'IgA dans les sécrétions intestinales et dans le sérum[406]. Cette activation de la réponse immunitaire humorale est en accord avec l'activation importante, mais transitoire, des centres germinatifs au niveau des plaques de Peyer[407]. L'étude de la spécificité antigénique des IgA induites par la colonisation des souris par des SFB a montré qu'une petite fraction des IgA était spécifique de la bactérie[408]. Même si les IgA spécifiques représentent une minorité des IgA induites par AFB, l'étude des IgA qui couvrent ces bactéries dans l'intestin a révélé cependant qu'à l'inverse des IgA qui couvrent la majorité des commensaux qui sont pour la plupart indépendantes des lymphocytes T, les IgA qui couvrent les SFB semblent dépendantes des lymphocytes T[409].

L'ensemble de ces résultats semble donc compatible avec une induction d'une réponse lymphocytaire T CD4 spécifique de la bactérie et qui fournirait les fonctions auxiliaires nécessaires au développement de la réponse humorale spécifique. Deux études pionnières ont permis de mettre en évidence le rôle majeur des SFB dans l'induction des réponses T CD4 notamment de type T_H17[327,329]. Les T_H17, contrairement aux autres populations de lymphocytes T CD4, ne

sont pas détectables dans l'intestin de souris axéniques. Cette population est importante pour l'homéostasie intestinale et représente environ 2-5% des cellules T CD4⁺ de la LP à l'état d'équilibre, une fréquence largement supérieure à celle observée dans la circulation. Dans ces deux études initiales les SFB ont été identifiées comme des bactéries ayant la capacité d'induire des fréquences de cellules T_H17 intestinales après colonisation des souris axéniques qui étaient équivalentes à celles observés dans les souris SPF[327,329]. De façon remarquable, Gaboriau-Routhiau et collègues ont montré que ces niveaux ne pouvaient être atteints par une colonisation des souris axéniques avec un microbiote complet dépourvu de SFB[329]. Cette même étude a également montré que l'effet de la colonisation par les SFB ne se limitait pas aux T_H17 mais influençait également les niveaux de lymphocytes T CD4 producteurs d'IFN- γ et d'IL-10 ainsi que ceux des lymphocytes FOXP3⁺ (Fig. 32).



S.K. Mazmanian, *Immunity*, 2009

Figure 32 : Induction des réponses T CD4 suite à l'adhérence des SFB aux cellules intestinales

Une étude plus récente a montré que les SFB sont capables d'induire une population de lymphocytes Treg Helios⁻ intestinaux caractérisés par l'expression, en plus de FOXP3, de ROR γ t le facteur de transcription des T_H17[410]. Les bases mécanistiques du lien entre la colonisation par les SFB et la fréquence élevée de cellules T CD4 IL-17⁺ au niveau de l'intestin ont été récemment investiguées. *Sano et collègues* ont montré que la colonisation par les SFB induit la différenciation des T_H17 au niveau des ganglions lymphatiques mésentériques. Ils ont montré de plus que la

capacité des cellules T_H17 à produire de l'IL-17 était particulièrement accrue au niveau de l'iléon, où le contact direct des SFB avec les cellules épithéliales induit la production des protéines amyloïdes sériques 1 et 2 qui à leur tour augmentent la production d'IL-17 par les cellules ROR γ ⁺[403]. Une deuxième étude a montré que la réponse T_H17 était dépendante pour les SFB, comme pour certaines bactéries pathogéniques, de leur capacité à s'attacher aux cellules épithéliales intestinales[404]. Finalement, alors que les deux études initiales avaient déjà montré la spécificité pour les SFB des lymphocytes T CD4 induits par la colonisation des souris axéniques par ces bactéries[327,329], une étude ultérieure a permis de renforcer ces données en identifiant les protéines immunogéniques des SFB murines ainsi que les épitopes reconnus par les clonotypes T_H17 majeurs induits après colonisation[411]. Les SFB sont également impliquées dans l'induction d'autres populations de lymphocytes T. Notamment, la colonisation des souris axéniques par les SFB induit un doublement des lymphocytes T γ δ intra-épithéliaux et une augmentation massive (x 15) des lymphocytes T CD8 TCR $\alpha\beta$ intra-épithéliaux[332,412]. Cependant, le taux lymphocytes T CD8 TCR $\alpha\beta$ intra-épithéliaux dans les souris mono-colonisées SFB était inférieur à celui observé dans les souris colonisées par un microbiote murin complet[413].

Une question majeure est bien sûr celle du ou des rôle(s) physiologique(s) joué(s) par les réponses immunitaires coordonnées stimulées par les SFB. Plusieurs lignes d'évidence indiquent que ces réponses ont pour rôle de limiter la colonisation par les SFB sans pour autant éliminer complètement ce commensal. Des mécanismes dépendants de l'immunité innée ont été incriminés dans le contrôle des SFB. En effet, un déficit dans la lectine antimicrobienne sécrétée Reg3 γ (souris Reg3 γ ^{-/-}), dont l'activité microbicide est spécifique in vitro aux bactéries à Gram positif, est associé à une augmentation des bactéries à Gram positif dans l'intestin incluant les SFB[414]. En appui de ce rôle dans le cadre de la colonisation SFB, il a été montré que ces bactéries augmentent la production de Reg3 γ [327,329,415]. De plus, une des cytokines impliquée dans l'induction de Reg3 γ et d'autres molécules microbicides est l'IL-22[416]. Hors, dans les souris Ahr^{-/-} qui sont dépourvues de cellules innées lymphoïdes (ILC, innate lymphoid cells) de type 3 qui font partie des cellules produisant l'IL-22 dans l'intestin, une prolifération importante de SFB est observée. Cette prolifération peut cependant être corrigée par l'administration d'IL-22[417,418]. Le rôle de l'IL-22 dépasse probablement l'induction de Reg3 γ mais reste non complètement élucidé. L'IL-22 sécrétée par les ILC3 en réponse au SFB a été récemment impliquée dans la sécrétion par les cellules épithéliales intestinales des protéines amyloïdes sériques 1 et 2 qui, comme indiqué ci-dessus, augmentent la production d'IL-17 par les cellules ROR γ ⁺[403].

Ce rôle de l'IL-22 pourrait faire le lien entre la réponse immunitaire innée et la réponse adaptative stimulées par les SFB. Cette dernière a également été impliquée dans le contrôle des SFB puisque dans les souris nues (athymiques) ou SCID la prolifération des SFB est prolongée dans le temps[398,419]. Le rôle des réponses lymphocytaires T pourrait être direct, même si des données soutenant un tel rôle n'ont pas été publiées. Le rôle des réponses T pourrait être indirect à travers l'aide à la production d'IgA spécifiques dont le rôle dans le contrôle de la croissance des bactéries ou leur attachement à l'épithélium a été montré[420].

Un effet protecteur des SFB contre la colite induite par des bactéries pathogéniques a été montré[327]. A l'inverse, la colonisation par les SFB dans des modèles murins d'autoimmunité permet d'induire les symptômes de la maladie et récapitulent l'effet d'un microbiote SPF[335,421]. Dans le modèle d'arthrite auto-immune le rôle des SFB dans le développement de la maladie a été assigné aux lymphocytes T IL-17⁺. Il a été proposé que l'IL-17 contribue à la formation des centres germinatifs spléniques et à la production d'auto-anticorps[335]. En appui du rôle systémique de cellules T_H17 spécifiques des SFB qui se différencient dans les ganglions lymphatiques mésentériques, ces cellules sont détectés, par des tetramères spécifiques, dans le côlon de souris colonisées[411]. De plus, après transfert adoptif de lymphocytes T CD4 naïfs transgéniques qui expriment un TCR spécifique d'un épitope SFB, ces cellules sont détectées au niveau du côlon et de la rate où elles ont un phénotype mémoire avec une partie d'entre elles (80% dans le côlon et 40% dans la rate) exprimant RORγt[411]. Une étude plus récente réalisée dans le modèle d'arthrite auto-immune propose que l'augmentation des auto-anticorps après colonisation par les SFB est due au développement d'une réponse T_{FH} dans les plaques de Peyer [422]. Dans un autre modèle de maladie auto-immune, celui de l'encéphalomyélite auto-immune induite par vaccination avec l'épitope immunodominant de la glycoprotéine myéline oligodendrocyte dans de l'adjuvant complet de Freund, la mono-colonisation par SFB aggrave la maladie avec une augmentation au niveau de la moelle épinière de lymphocytes T CD4 produisant de l'IL-17, de l'IFN-γ ou les deux ainsi que de certains Treg. Dans ce modèle les SFB récapitulent les effets d'un microbiote SPF mais avec moins d'intensité[421]. Dans leur ensemble ces études suggèrent fortement que les réponses immunitaires adaptatives induites par les SFB pourraient avoir un rôle systémique qui dépasse donc le cadre strict de l'immunité intestinale.

Les SFB représentent pour le moment un exemple qui reste unique d'une bactérie capable de stimuler une réponse immunitaire innée et adaptative qui semble essentiel pour le développement postnatal du système immunitaire intestinal. Cette même réponse contrôle la

prolifération de ces bactéries sans pour autant les éliminer complètement. Lorsque ces réponses sont exagérées, elles pourraient jouer un rôle pathogénique systémique comme le suggèrent les modèles de maladies auto-immunes cités ci-dessus.

L'importance des SFB pour le développement de l'immunité intestinale chez la souris ensemble avec la présence de ces bactéries dans plusieurs espèces à travers le règne animal a suscité la recherche de preuves de leur présence dans l'intestin chez l'homme et l'investigation des rôles qu'elles pourraient jouer dans le développement de l'immunité intestinale ou dans la pathologie notamment auto-immune[423]. Les études de microscopie réalisées au début des années 1990s et ayant identifié les structures filamenteuses segmentées caractéristiques de ces bactéries chez plusieurs espèces animales les avaient aussi retrouvées chez l'homme[388]. Des densités élevées de structures SFB-like ont été identifiées plus récemment dans des échantillons de valves iléo-caecales de patients souffrant de colite ulcéreuse mais pas chez des patients atteints de la maladie de Crohn ou chez des patients ne présentant pas de signes d'inflammation intestinale[424]. L'analyse par PCR des gènes codant pour les ARNr 16S du contenu intestinal a indiqué dans une étude la présence de SFB dans l'intestin chez l'homme dans les premières années de vie entre l'âge de 2 et 3 ans avec un déclin chez les sujets plus âgés[425]. Dans une autre étude cependant, les gènes des ARNr 16S de SFB étaient détectables dans les échantillons intra-muraux de colon de patients souffrant de maladie inflammatoire de l'intestin (IBD, inflammatory bowel disease) mais pas dans les échantillons prélevés au niveau de la surface[426]. Alors que ces différentes études apportent une indication d'une possible colonisation de l'intestin humain par des SFB ou des bactéries apparentées, la présence des SFB chez l'homme a été remise en question puisque la recherche de séquences homologues à celles du génome des SFB murines dans les données de métagénomique du microbiote humain n'a pas permis d'identifier d'homologies[393].

Objectifs de la thèse et approche expérimentale

Afin d'assurer leurs rôles dans le maintien de la tolérance au soi et la modulation des réponses immunitaires permettant ainsi de protéger les tissus normaux au cours de ces réponses, deux populations de Treg, les nTreg et les iTreg, se sont spécialisées par leur ontogénie et spécificité antigénique. La compréhension des rôles respectifs des deux populations à l'état physiologique, dans la tolérance au soi, la tolérance du microbiote et la régulation des réponses aux pathogènes, ainsi que dans les pathologies où elles sont impliquées, comme le cancer ou les maladies autoimmunes, est rendue difficile par leur quasi-identité phénotypique. Ceci est particulièrement vrai chez l'homme où il n'est pas possible de réaliser les manipulations génétiques permettant d'affecter le développement ou les fonctions de l'une ou de l'autre des deux populations afin d'en investiguer les conséquences physiologiques et pathologiques. La population de iTreg est de plus liée à celle des cellules T_H17 qui ont, à l'inverse des Treg, des fonctions pro-inflammatoires (Fig. 33). De façon intéressante, les populations iTreg et T_H17 sont particulièrement abondantes dans les muqueuses, notamment la muqueuse intestinale, et sont toutes les deux liées au microbiote qui semble, chez la souris, jouer un rôle majeur dans leur ontogénie.

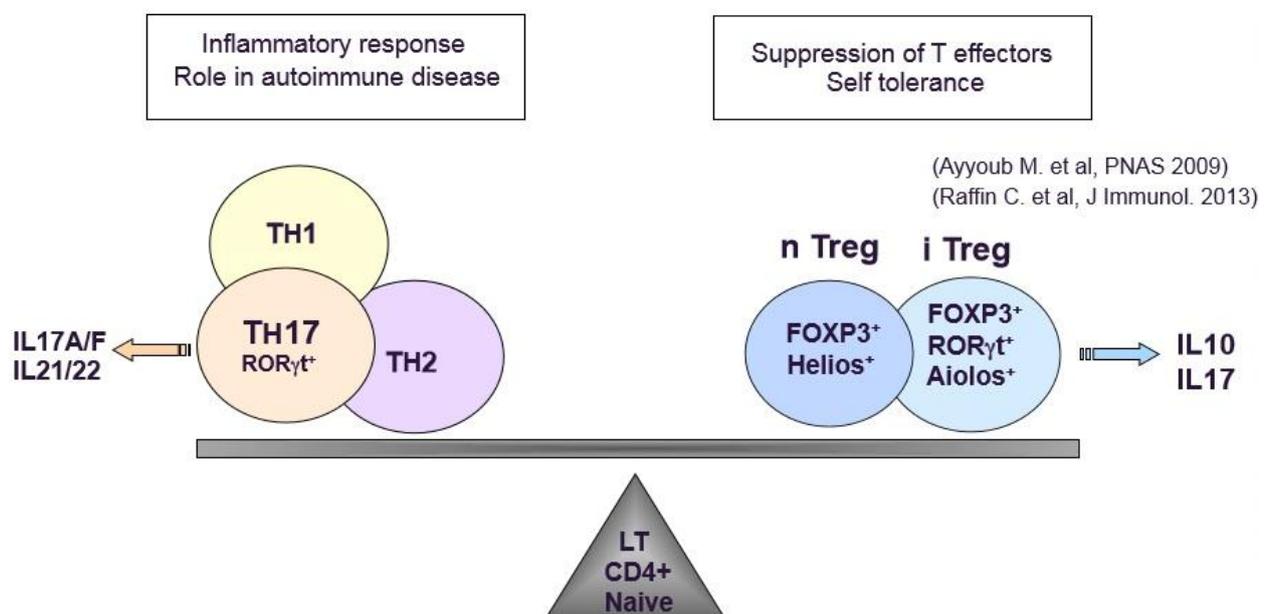


Figure 33. Equilibre entre lymphocytes effecteurs et régulateurs. L'équilibre entre les populations de cellules pro- et anti-inflammatoires T CD4 est un facteur déterminant dans la capacité de notre système immunitaire à nous défendre contre les agents pathogènes, tout en évitant d'attaquer les tissus normaux. Deux populations importantes pour le maintien de cet équilibre sont les T_H17, qui produisent la cytokine pro-inflammatoire IL-17 et sont impliquées dans la pathogenèse des maladies autoimmunes, et les cellules Treg FOXP3⁺, qui contrôlent les réponses immunitaires et participent à maintenir la tolérance au soi. En dépit de leurs fonctions apparemment opposées, Treg et T_H17 sont étroitement liées.

Les populations iTreg et nTreg sont toutes deux définies par l'expression de CD25 et de FOXP3 et par le manque d'expression de CD127. L'expression du facteur de transcription Helios caractérise les nTreg, même si le lien strict entre Helios et nTreg n'est pas nécessairement complètement accepté. En plus de cette identité phénotypique des deux populations, aujourd'hui la spécificité antigénique des deux populations reste inconnue. Il est accepté, surtout grâce à des données obtenues dans les modèles murins, que les nTreg ont une affinité élevée pour les antigènes du soi et que les iTreg se développent en grande partie dans l'intestin en réponse au microbiote. Cependant, les antigènes cibles des iTreg restent inconnus même si les expériences réalisées chez la souris suggèrent qu'il s'agit d'antigènes dérivés du microbiote.

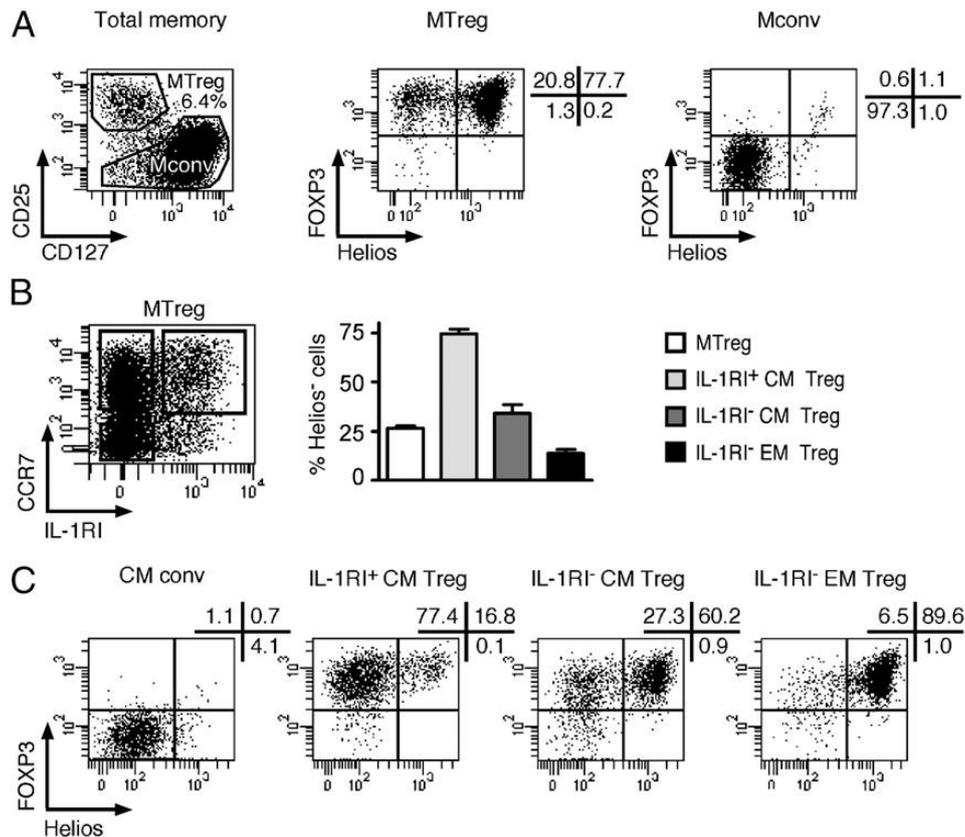
Avec l'objectif de contribuer à la compréhension des rôles respectifs des populations de nTreg et iTreg humaines, dans le travail expérimental de ma thèse j'ai abordé deux questions relatives à ces populations. Dans la première partie j'avais comme objectif l'identification de mécanismes ou de voies permettant de cibler de façon différentielle ces deux populations. Dans la deuxième partie du travail, j'ai étudié la réponse immunitaire au SFB dans le but d'investiguer le rôle du microbiote dans le développement et la spécificité des iTreg. Dans les deux parties du travail, j'ai abordé la population de iTreg en prenant en compte ses liens étroits avec la population T_H17.

V. 1. a. Partie I: Etude de l'expression de l'enzyme immunosuppressive IL4I1 dans les TH17 et les lymphocytes T régulateurs.

Dans la première partie de la thèse je me suis intéressée à l'identification de voies pouvant permettre de cibler de façon différentielle les deux populations de Treg, naturelles et induites.

Afin d'identifier des voies ou des mécanismes qui interviennent spécifiquement dans la physiologie des iTreg, je me suis basée sur les liens étroits entre les populations de iTreg et de T_H17. En effet, mon équipe d'accueil a étudié la relation entre ces deux populations chez l'homme. Notamment, rapidement après la mise en évidence du rôle primordial du TGF- β dans la différenciation des T_H17, l'équipe s'est basée sur l'importance de cette même cytokine pour le développement des Treg pour explorer le lien entre les deux populations. Ils ont dans un premier temps montré que les cellules Treg humaines mémoires pouvaient se convertir en cellules FOXP3⁻ qui produisent de l'IL-17 et cela lorsqu'elles sont stimulées en conditions inflammatoires, notamment en présence d'IL-1 β [160]. Ils ont ensuite montré la relevance de ce lien *in vivo* en

montrant qu'une sous-population de Treg mémoires exprimait *ex vivo* le facteur de transcription des T_H17, ROR γ t, et sécrétait de l'IL-17 tout en ayant des fonctions suppressives[158]. Ce lien était renforcé par les données de l'équipe montrant que la différenciation des T_H17 *in vitro* avait préférentiellement lieu à partir de la population de Treg naïves en comparaison aux cellules T CD4 conventionnelles CD25⁻[162]. L'identification de Helios comme marqueur potentiel des nTreg[141], a fourni la possibilité d'affiner l'exploration du lien entre Treg et T_H17. Mon équipe d'accueil a montré que la population de cellules FOXP3⁺ qui sécrètent l'IL-17 *ex vivo* était des iTreg Helios⁻[144]. Dans une étude précédente et se basant sur le rôle spécifique de l'IL-1 β dans la conversion des Treg en T_H17, ils avaient montré que le récepteur de type I de l'IL-1 (IL-1RI) était plus fortement exprimé dans les Treg par rapport aux lymphocytes T conventionnels CD25⁻ et, de façon importante, que les cellules FOXP3⁺IL-17⁺ étaient contenues dans la fraction de Treg IL-1RI⁺[427]. En combinant ces deux observations, ils ont mis au point un marquage basé sur l'IL-1RI et d'autres marqueurs de surface et qui permettait de séparer des populations viables de Treg Helios⁺ et Helios⁻ et de les caractériser (Fig. 34)[144]. Un des résultats marquant de cette étude était la démonstration que les Treg Helios⁻ exprimaient Aiolos, un autre membre de la famille de facteurs de transcription Ikaros, qui avait été associé dans des modèles murins avec le développement des T_H17 et des iTreg[145,428]. Cette étude a permis de conforter l'hypothèse de l'expression spécifique de Helios dans les nTreg, au moins en conditions « steady state » et de fournir une stratégie expérimentale permettant de séparer et d'étudier les deux populations de Treg. Dans cette partie de mon travail expérimental, j'ai utilisé cette stratégie pour séparer ces deux populations cellulaires.



Raffin C., *Jl*, 2013

Figure 34: L'expression de l'IL-1RI permet de distinguer les populations Helios⁻ et Helios⁺ de Treg humaines. A) Des cellules T CD4⁺ ont été marquées avec des anticorps anti-CD45RA, -CCR7, -CD25, -CD127, -LA-1RI, -FOXP3 et -Helios, et analysées par cytométrie de flux. L'expression de CD25 et CD127 dans les cellules mémoire (CD45RA⁻) T CD4⁺ définit les MTregs (CD25⁺ CD127^{low}) et les cellules mémoire conventionnelles (Mconv; CD25⁺). L'expression de FOXP3 et de Helios est montrée pour les MTregs et les Mconv. (B) Le graphique montre l'expression de l'IL-1RI et CCR7 dans les cellules mémoire Tregs (CD45RA⁻CD25⁺CD127^{low}) pour un donneur représentatif. L'expression de Helios a été évaluée dans les MTreg, les cellules Treg IL-1RI⁺ CM (CD45RA⁻ CCR7⁺), IL-1RI⁻ CM Treg, et IL-1RI⁻ EM (CD45RA⁻CCR7⁻) Treg. Les proportions de cellules Helios⁺ dans chaque population sont récapitulées (n = 5). (C) Les cellules T CD4⁺ ont été marquées avec anticorps anti-CD45RA, -CCR7, -CD25, -CD127 et -the-1RI et triées par cytométrie en flux en populations CM conv (CD45RA⁺ CCR7⁺ CD25⁺), CM Treg IL-1RI⁺, CM Treg IL-1RI⁻ et EM Treg IL-1RI⁻. Aliquotes de populations triées ont été marquées avec des anticorps anti-FOXP3 et -Helios, et analysées par cytométrie de flux. L'expression de Helios et FOXP3 dans les populations triées est montrée pour un représentant sur trois donneurs.

Les Treg assurent leurs fonctions suppressives à travers de multiples mécanismes qui sont résumés dans l'introduction de ce manuscrit. Les activités de certaines enzymes participent, pour certaines populations de Treg, à leur activité suppressive. Par exemple, l'ectonucléotidase CD39 est exprimée par les Treg et pourrait participer à leur activité suppressive par la modulation de l'adénosine dans le milieu extracellulaire[119]. De façon intéressante, CD39 en association à une autre ectonucléotidase, CD73, est exprimée par les T_H17 murines générées in vitro et il a été proposé que ces deux enzymes confèrent des propriétés suppressives aux T_H17 qui pourrait expliquer le rôle pro-tumoral de ces cellules dans certains modèles murins et certaines tumeurs humaines[429,430]. Récemment, l'enzyme immunosuppressive IL4I1, dont l'expression a été

initialement décrite dans les lymphocytes B sous le contrôle de l'IL-4[253,258] et dans les cellules dendritiques sous le contrôle de signaux pro-inflammatoires[431], a été identifiée comme étant spécifiquement exprimée dans les T_H17 et absente des T_H1 chez l'homme[88]. Son expression dans les T_H17 est dépendante de ROR γ t, lui-même induit par le TGF- β . Son activité enzymatique dans les T_H17 est associée à une baisse de l'expression de la chaîne ζ du CD3 qui conduit à une modulation à la baisse de la production d'IL-2 suite à la stimulation de ces cellules à travers leur TCR. Son expression dans les T_H17 est aussi associée à l'expression de Tob1 qui régule négativement l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire[89]. Cette expression et ses conséquences fonctionnelles ont été proposées comme mécanisme régulateur intrinsèque qui limiterait le danger des T_H17[88]. Les liens entre iTreg et T_H17, le rôle de l'IL4I1 dans les T_H17 ainsi que les fonctions immunosuppressives de l'IL4I1 lorsqu'elle est exprimée dans les cellules dendritiques nous ont incités à explorer son rôle dans les Treg humaines (Fig. 35).

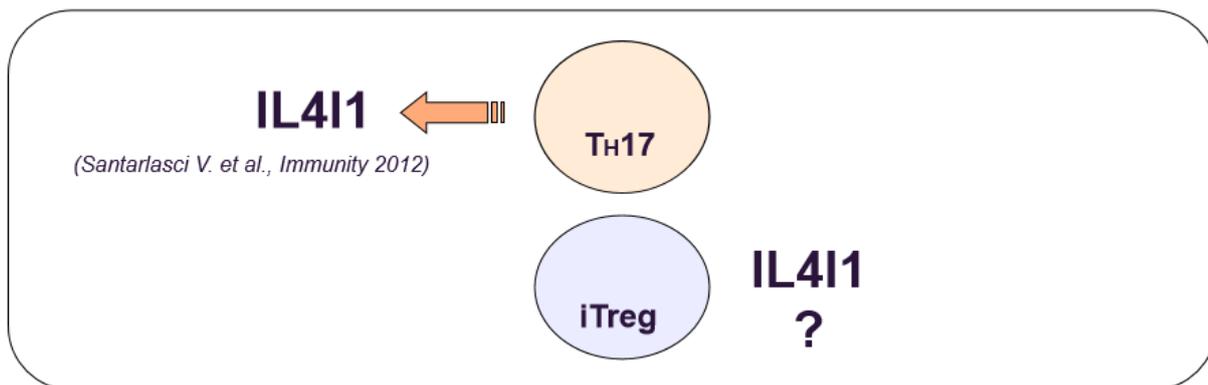


Figure 35. Hypothèse expérimentale.

V. 1. b. Partie I : Travail expérimentale et résultats.

Afin d'investiguer l'expression de l'IL4I1 dans les sous-populations de Treg nous avons dans un premier temps mesuré les taux de l'ARNm de l'IL4I1 dans les lymphocytes T CD4 circulants naïfs et mémoires conventionnels ainsi que dans les Treg mémoires. Nous avons observé que l'expression de l'IL4I1 était dépendante de l'activation des lymphocytes et qu'elle était observée dans les deux populations mémoires, conventionnelle et Treg, mais pas dans les lymphocytes naïfs. Nous avons ensuite utilisé la combinaison de marqueurs définis précédemment par mon équipe d'accueil (Fig. 34) afin de séparer les Treg mémoires Helios⁺ et Helios⁻ et nous avons mesuré l'expression de

l'IL4I1 dans ces populations. Nous avons montré que seule la population Helios⁻ exprime l'IL4I1 et, en accord avec ces résultats, nous avons observé que cette même population exprime de façon différentielle ROR γ t, l'IL-17 ainsi que Tob1. Comme l'expression de l'IL4I1 était décrite comme étant associée, parmi les lymphocytes T CD4, à la sous-population des T_H17 et comme les données précédentes de mon équipe d'accueil montraient que les Treg pouvaient se convertir en T_H17 en conditions inflammatoires, nous avons suivi l'expression de l'IL4I1 au cours de cette conversion. Nous avons vu que lorsque les Treg mémoires sont stimulées en présence d'IL-1 β et d'IL-2 elles perdent en partie l'expression de FOXP3, une partie importante d'entre elles commencent à produire de l'IL-17, une fraction moins importante produit aussi de l'IFN- γ et, de façon remarquable et compatible avec ce profile inflammatoire, la proportion de cellules qui produisent la cytokine anti-inflammatoire IL-10 est moins importante en comparaison à celle observée lorsque les Treg sont stimulées en absence d'IL-1 β . Nous avons montré que la conversion des Treg était accompagnée par une augmentation de l'expression de l'IL4I1. L'augmentation de l'expression d'une enzyme immunosuppressive pourrait paraître surprenante dans une population qui perd ses capacités suppressives et devient pro-inflammatoire. Cependant, cette expression semble compatible avec les données de la littérature montrant sa présence dans les T_H17 et son rôle dans la limitation de leur expansion. Il est donc possible que son expression dans les Treg converties en T_H17 ait une fonction similaire, en d'autres termes qu'elle tente de limiter les dangers qui résultent de la conversion des Treg en T_H17 en conditions inflammatoires qui contribueraient autrement à l'aggravation de l'inflammation.

En résumé, nous avons montré que l'IL4I1 est exprimée, parmi les Treg, spécifiquement dans les iTreg. Nous avons montré que son expression augmente lorsque les Treg sont stimulées en conditions inflammatoires probablement afin de limiter le danger qui résulte de leur conversion en T_H17. Ces résultats renforcent ceux obtenus précédemment par mon équipe d'accueil et par d'autres groupes concernant les liens entre les iTreg et les T_H17. De plus, comme l'IL4I1 est une enzyme qui pourrait être ciblée pharmacologiquement, nos résultats suggère que son ciblage pourrait être utilisé afin de moduler les iTreg et les T_H17 sans affecter les nTreg.

V. 1. c. Article

Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous sous forme d'article publié dans le European Journal of Immunology (Scarlata et al., 2015).

Differential expression of the immunosuppressive enzyme IL4I1 in human induced Aiolos⁺, but not natural Helios⁺, FOXP3⁺ Treg cells

Clara-Maria Scarlata¹, Clotilde Celse¹, Pascale Pignon¹, Maha Ayyoub*¹ and Danila Valmori*^{1,2}

¹ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 1102, Equipe Labellisée Ligue Contre le Cancer, Institut de Cancérologie de l'Ouest, Nantes-Saint Herblain, France
² Faculty of Medicine, University of Nantes, Nantes, France

IL4I1 encodes an L-phenylalanine oxidase that inhibits T-cell proliferation. It has been recently reported that *IL4I1* is expressed in T_H17 cells as part of a mechanism that limits their pathogenicity. We have previously identified a population of human FOXP3⁺ Treg cells that secrete IL-17 *ex vivo*; here, we addressed the expression of *IL4I1* in that Treg-cell population. We found that in *ex vivo* isolated circulating Treg cells, *IL4I1* expression is induced by activation. Moreover, *IL4I1* expression is restricted to cells that do not express Helios, a transcription factor that characterizes natural Treg cells, but that express Aiolos, which is involved in the differentiation of T_H17 and induced Treg cells. We also showed that conversion of Treg cells under inflammatory conditions increases *IL4I1* expression, likely as part of a regulatory loop that attempts to limit the pathogenicity resulting from their conversion into T_H17. The specific expression of *IL4I1* in T_H17 and iTreg cells may provide insights into approaches that aim at modulating these populations in different pathological conditions involving inflammation-mediated immunosuppression.

Keywords: FOXP3⁺ Treg · Immune regulation · Immunosuppressive enzymes · IL4I1 · T_H17



Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site

Introduction

The differentiation of CD4⁺ T cells into populations with effector or regulatory/suppressive capacity allows the immune system to develop either protective or tolerogenic immune responses. However, conditions can rapidly change and the immune response needs to adapt accordingly. Therefore, the immune system has also evolved to ensure a certain degree of developmental and functional plasticity between effector and regulatory subsets. This paradigm is particularly well illustrated in the case of T helper 17

(T_H17) cells, which appear closely related to FOXP3⁺ regulatory T (Treg) cells. FOXP3⁺ Treg cells include both populations generated as such in the thymus, called natural (nTreg), and those called induced (iTreg), that are generated in the periphery from conventional CD4⁺ T cells, under tolerogenic conditions. T_H17 cells have been described as closely related to iTreg cells [1, 2]. In support of this concept, we have previously identified a subpopulation of human Treg cells that express the T_H17-specific transcription factor RORγt and secrete IL-17 *ex vivo*, while simultaneously exerting suppressor functions [3]. These Treg cells do not express Helios, a

Correspondence: Dr. Maha Ayyoub
e-mail: Maha.Ayyoub@univ-nantes.fr

*These authors share senior authorship.

[Correction added on 2 February after first online publication: Title has been corrected.]

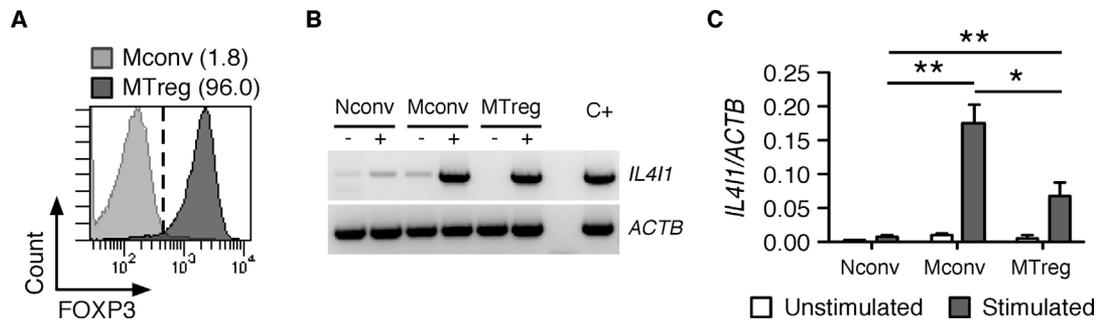


Figure 1. *IL4I1* is expressed in conventional memory $CD4^+$ T cells and MTreg cells. Human $CD4^+$ T cells were stained with anti-CD45RA, -CCR7, -CD25, and -CD127 Ab and sorted by flow cytometry into naïve conventional (Nconv), memory conventional (Mconv), and memory Treg (MTreg) cell populations (Supporting Information Fig. 1A). (A) Aliquots of Mconv- and MTreg-cell populations were stained with anti-FOXP3 Ab and analyzed by flow cytometry. The numbers in brackets indicate the percentage of FOXP3⁺ Treg cells in the sorted populations. Histogram plot is representative of three independent experiments. (B and C) Nconv-, Mconv-, and MTreg-cell populations were unstimulated (-) or stimulated (+) for 24 h using PMA and ionomycin and *IL4I1* mRNA expression was assessed by (B) semi-quantitative PCR and (C) qPCR ($n = 5$). cDNA prepared from testis tissue was used as positive control (C+) for *IL4I1* expression. (B) Data are representative of five independent experiments, performed using cell populations isolated from five donors. (C) Data are shown as mean + SEM ($n = 5$ donors) and are pooled from five independent experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; Mann-Whitney test.

transcription factor of the Ikaros family that is expressed by nTreg cells [4], but express instead another Ikaros family member, Aiolos, that is involved in the differentiation of T_H17 and iTreg cells [5, 6], suggesting that they are indeed iTreg cells [7].

IL4I1 encodes an L-phenylalanine oxidase that inhibits T-cell proliferation [8]. Whereas initial studies reported no significant expression of *IL4I1* in human resting T cells [8], assessment of gene expression profiles of T-cell clonal populations has recently revealed that *IL4I1* is expressed by T_H17 [9]. Expression of *IL4I1* in T_H17 cells was shown to be dependent on ROR γ t, and proposed to be induced as part of a mechanism that limits their potential pathogenicity [9]. Because the identification of molecules differentially expressed in nTreg and iTreg cells is highly relevant to the development of immunotherapies aimed at differentially targeting these subsets, and based on the known relation between T_H17 and iTreg cells, here, we investigated the expression of *IL4I1* in human circulating Treg cells.

Results and discussion

IL4I1 is expressed in memory Helios⁻ Aiolos⁺ induced, but not in memory Helios⁺ natural, Treg cells

We initially isolated $CD25^-$ conventional naïve (Nconv), $CD25^-$ conventional memory (Mconv), and $CD25^+CD127^{low}$ memory Treg (MTreg) cell populations from circulating $CD4^+$ T cells of healthy donors, ex vivo (Fig. 1A and Supporting Information Fig. 1A), and assessed them by PCR using *IL4I1*-specific primers. As illustrated in Fig. 1B and C, we detected low expression of *IL4I1* in naïve populations, both unstimulated and stimulated, as well as in unstimulated memory populations. However, we found that expression of *IL4I1* was significantly induced by stimulation both in Mconv and MTreg cells. Expression of *IL4I1* in T_H17 cells has been reported to be dependent of ROR γ t, which

is, in turn, induced by TGF- β in combination with inflammatory cytokines [10, 11]. We therefore reasoned that expression of *IL4I1* in Treg cells could be restricted to iTreg that, at variance with nTreg, are induced by TGF- β [12–14]. nTreg- and iTreg-cell subsets have been considered indistinguishable, until, recently, expression of the transcription factor Helios, of the Ikaros family, has been proposed to specifically identify nTreg cells [4]. Using Helios-specific Ab, Helios⁺ and Helios⁻ populations are readily distinguishable among circulating memory FOXP3⁺ Treg cells (Fig. 2A) [4]. The concept that expression of Helios identifies nTreg cells was based on initial evidence that most murine FOXP3⁺ thymocytes, as well as most FOXP3⁺ Treg cells in neonate mice, are Helios⁺ [4]. The validity of Helios as an exclusive marker of nTreg cells, however, has been challenged by reports of induction of Helios in Treg generated from TCR transgenic T cells both in vitro and after in vivo transfer, although at lower levels than those detected ex vivo [15]. Thus, whereas it is fairly well accepted that nTreg cells are generated as Helios⁺, it is presently unclear if all Helios⁺ Treg are nTreg cells. With regard to Helios⁻ circulating Treg cells, it has been recently reported that human naïve Treg cells include both Helios⁺ and Helios⁻ populations, in proportions close to those found in the memory Treg-cell compartment [16]. We have shown, however, that Treg cells in human cord blood are uniformly Helios⁺, which would argue for a peripheral origin of most Helios⁻ Treg cells in circulating lymphocytes of adults [17]. In line with the concept that Helios⁻ Treg cells are iTreg, expression of ROR γ t segregates with Helios⁻ Treg cells (Fig. 2A).

Because Helios is nuclear, sorting of Helios⁺ and Helios⁻ subpopulations does not allow for the isolation of cells suitable for further mRNA analysis. However, we have recently reported that circulating Helios⁻ and Helios⁺ Treg cells can be highly enriched, ex vivo, based on their differential expression of IL-1RI, that is restricted to the Helios⁻ Treg-cell population, and CCR7, that is enriched in the latter population (Fig. 2B and [7]). It is noteworthy

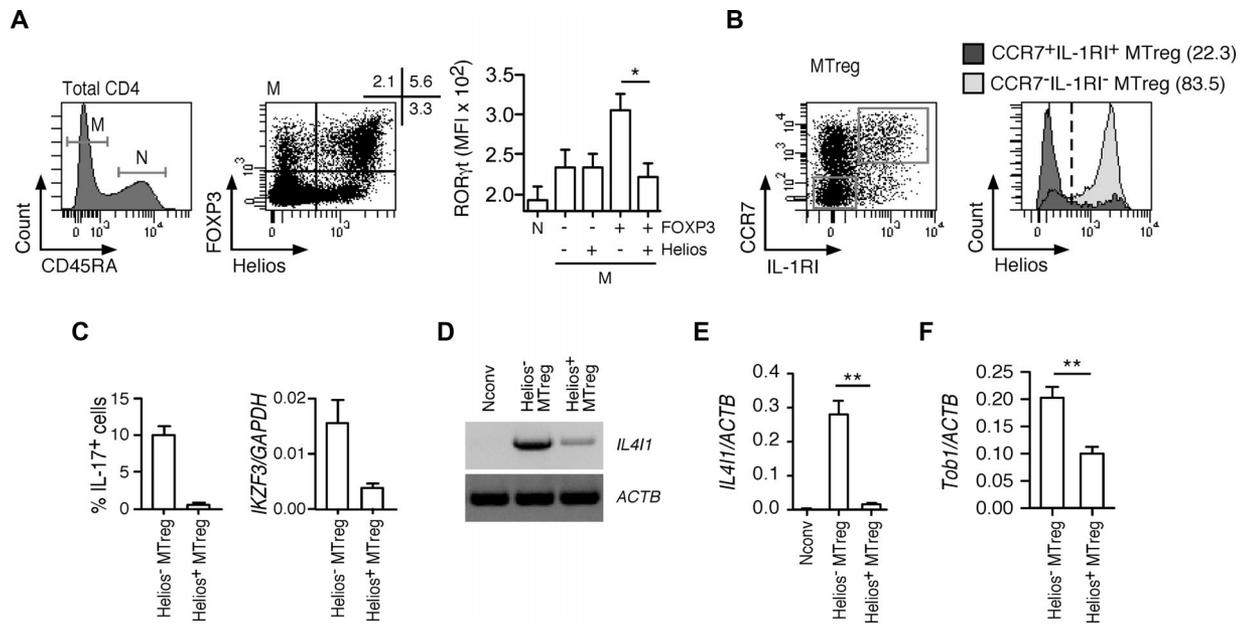


Figure 2. *IL4I1* is expressed in Helios⁻ iTreg but not in Helios⁺ nTreg cells. (A) Human CD4⁺ T cells were stimulated with PMA and ionomycin for 6 h, stained with anti-CD45RA, -FOXP3, -Helios, and -RORγt Ab, and analyzed by flow cytometry. (Middle panel) Expression of Helios versus FOXP3 gated (left panel), on memory (M; CD45RA⁻) cells. (Right panel) The mean fluorescence intensity (MFI) of RORγt staining for naive (N; CD45RA⁺), memory conventional (FOXP3⁻ Helios⁻ and FOXP3⁻ Helios⁺), and memory Treg (FOXP3⁺ Helios⁻ (iTreg) and FOXP3⁺ Helios⁺ (nTreg)) cell populations is shown. Data are shown as mean + SEM (n = 5 donors) assessed in five independent experiments. (B) CD4⁺ T cells were stained with anti-CD45RA, -CCR7, -CD25, -CD127, -IL-1RI, and -Helios Ab and analyzed by flow cytometry. (Left panel) Dot plot shows the expression of CCR7 and IL-1RI gated on MTreg cells (defined as in Supporting Information Fig. 1A). (Right panel) Histogram plot shows Helios expression, gated on the indicated MTreg-cell populations. The numbers in brackets indicate the percentage of Helios⁺ cells in each population. Data are representative of three independent experiments. (C) CD4⁺ T cells were stained with anti-CD45RA, -CCR7, -CD25, -CD127, and -IL-1RI Ab and MTreg cells were sorted by flow cytometry according to CCR7 and IL-1RI expression (Supporting Information Fig. 1B) into CCR7⁺IL-1RI⁺ (enriched in Helios⁻ MTreg) and CCR7⁻IL-1RI⁻ (enriched in Helios⁺ MTreg) cell populations. Sorted cells were assessed for (left panel) IL-17 production in an intracellular cytokine staining assay following stimulation with PMA and ionomycin and for (right panel) Aiolos (*IKZF3*) expression by qPCR. Data are shown as mean + SEM (n = 3 (IL-17) or 4 (*IKZF3*) samples) and are pooled from 3 (IL-17) or 4 (*IKZF3*) independent experiments, each performed in duplicates for *IKZF3*. (D–F) Nconv and MTreg cell populations, sorted from CD4⁺ T cells following staining as in (C) and Supporting Information Figure 1B, were assessed, following stimulation for 24 h with PMA and ionomycin, for *IL4I1* mRNA expression by (D) semiquantitative PCR and (E) qPCR, and for (F) *Tob1* mRNA expression by qPCR. (D) Data are representative of three independent experiments performed using cell populations isolated from three donors. (E and F) Data are shown as mean + SEM (n = 3 donors) and are pooled from three independent experiments, each performed in duplicate. *p < 0.05; **p < 0.01; Mann–Whitney test.

that IL-1RI⁺ Helios⁻ Treg cells express Aiolos (Supporting Information Fig. 1B and Fig. 2C), another Ikaros family member that is involved in the differentiation of T_H17 and iTreg cells [5, 6]. We therefore used this approach to isolate highly enriched Helios⁻ and Helios⁺ Treg-cell populations ex vivo (Supporting Information Fig. 1B) and assess *IL4I1* expression. In line with our hypothesis, we found that expression of *IL4I1* was largely restricted to the enriched Helios⁻ Treg-cell population (Fig. 2D and E). It has been recently shown that *IL4I1* limits the proliferative potential of T_H17 cells not only by blocking the molecular pathway involved in the activation of the IL-2 promoter, but also by maintaining high levels of the antiproliferative protein Tob1 [18]. Consistent with the restricted expression of *IL4I1* in Helios⁻ Treg cells, we found high expression of *Tob1* in the enriched Helios⁻ but not in Helios⁺ Treg-cell populations (Fig. 2F).

iTreg cells are likely a heterogeneous population that may include several subpopulations. Because the phenotypic difference between these subpopulations is up to date unknown, it is also not known, at this stage, whether *IL4I1* is expressed by

all iTreg cells or if *IL4I1* expression identifies a subpopulation of iTreg cells that have T_H17-cell characteristics. This last hypothesis is the most likely, taking into account that a subpopulation of Helios⁻ iTreg cells, and not all of them, express IL-17. This subpopulation of iTreg cells may be on the way to becoming T_H17 cells. Indeed, we have recently proposed that IL-1RI⁺ Treg cells, highly enriched in Helios⁻ cells [7], encompass an early intermediate in a differentiation pathway leading from Treg to T_H17 cells [19]. Alternatively, this population could retain the potential to transition from Treg to T_H17 and vice versa, depending on conditions.

***IL4I1* expression in memory Treg cells is increased by stimulation under inflammatory conditions**

FOXP3⁺ Treg cells are anergic, i.e. do not secrete IL-2, and are unable to proliferate following TCR stimulation in the absence of exogenous IL-2. We and others, however, have previously

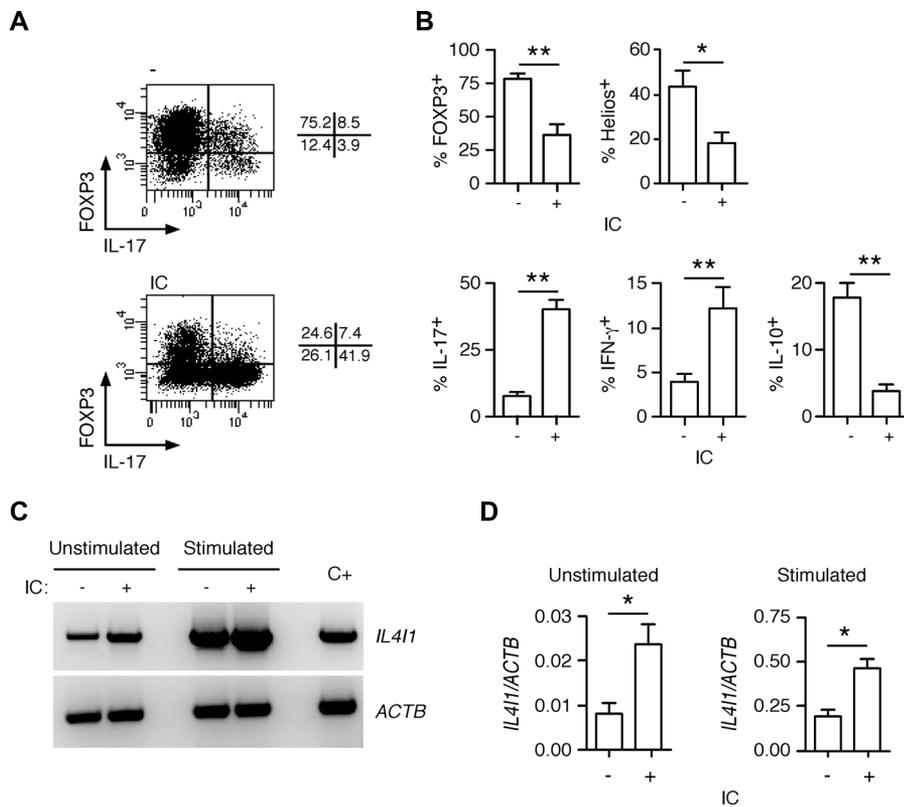


Figure 3. *IL4I1* expression in Treg cells is increased following stimulation under inflammatory conditions. iTreg cells were sorted ex vivo from human CD4⁺ T cells as in Supporting Information Figure 1A, and then expanded in vitro by stimulation with anti-CD3/CD28 beads in the presence of IL-2 and in the absence or presence of inflammatory cytokines (iC: IL-1 β , IL-21, and IL-23). (A and B) Day 12 cultures were assessed for FOXP3 and Helios expression and cytokines production in a 4 h intracellular/intranuclear cytokines/transcription factors staining assay following stimulation with PMA and ionomycin. (A) Dot plots show IL-17 production and FOXP3 expression. (B) Percentage of FOXP3, Helios, IL-17, IFN- γ , and IL-10 expression. Data are shown as mean \pm SEM ($n = 5$ donors) and are pooled from five independent experiments. (C and D) *IL4I1* expression was assessed in the cultures by (C) semi-quantitative PCR and (D) qPCR following stimulation or not with PMA and ionomycin for 24 h. (C) Data are representative of four independent experiments. (D) Data are shown as mean \pm SEM ($n = 4$ donors) and are pooled from four independent experiments, each performed in duplicate. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; Mann-Whitney test.

shown that Treg cells stimulated in the presence of inflammatory cytokines and IL-2 can proliferate, downregulate FOXP3 expression, and suppressive functions and are converted into T_H17 cells [20, 21]. We therefore asked whether stimulation of Treg cells under inflammatory conditions would be accompanied by an increase in the expression of *IL4I1*, as a regulatory mechanism to limit the potential dangerousness of T_H17 cells derived from converted iTreg cells. To address this point, we isolated Treg cells ex vivo, stimulated them in the absence or in the presence of inflammatory cytokines and IL-2 and assessed cytokines secretion along with expression of *IL4I1*. We found that stimulation of Treg cells under these conditions resulted in decreased expression of FOXP3 and of Helios and increased proportions of IL-17⁺ cells, and, to a lesser extent, IFN- γ -secreting cells (Fig. 3A and B). In contrast and notably, the proportions of IL-10-secreting cells in the cultures were significantly decreased. In addition, we found that the conversion was accompanied by a significant increase in *IL4I1* expression levels (Fig. 3C and D).

Increased expression levels of *IL4I1* following conversion may seem at odds with decreased suppressive functions. However, because *IL4I1* is also expressed at high levels in T_H17 cells [9], that are not suppressive, it is likely not directly involved in the suppressive activity of iTreg cells, but may contribute to their inability to secrete IL-2 and to proliferate. Thus, upregulation of *IL4I1* expression in T_H17 derived from iTreg cells may limit their TCR-mediated expansion following downregulation of FOXP3.

Concluding remarks

In sum, the results of these analyses reveal that *IL4I1*, recently reported to be expressed in T_H17 cells [9], is also expressed in human iTreg, but not in nTreg, cells. We also show that *IL4I1* expression is increased in Treg cells stimulated under inflammatory conditions most likely to limit the danger that results from their conversion into IL-17-secreting cells. Together, these results support the close relationship between human T_H17 and iTreg cells and suggest that targeting *IL4I1* could allow to modulate these populations without affecting nTreg cells, a finding that has potential therapeutic applications in different pathological conditions involving inflammation-mediated immunosuppression.

Materials and methods

Samples, cell purification, cell sorting, and functional assessment

Blood samples from healthy donors were obtained from the Etablissement Français du Sang des Pays de la Loire (Nantes, France) upon informed consent and IRB approval. CD4⁺ T cells were enriched by positive selection from PBMC by magnetic cell sorting (Miltenyi Biotec), stained with anti-CD45RA (BD Biosciences), -CCR7 (BD Biosciences), -CD25 (Beckman Coulter),

-CD127 (BD Biosciences), and -IL-1RI (R&D Systems) Ab, as indicated, and sorted by flow cytometry (FACSaria, BD Biosciences) into the indicated subpopulations to high purity (> 97%). In some experiments, sorted populations were expanded in vitro by stimulation with anti-CD3/CD28 beads (Miltenyi Biotec) in the absence or presence of IL-1 β , IL-21, and IL-23 (50, 12.5, and 50 ng/mL, respectively; R&D Systems) and in the presence of IL-2 (100 IU/mL; Chiron). Total CD4⁺ T cells and ex vivo-sorted and in vitro-expanded CD4⁺ T-cell populations were assessed in an intracellular/intranuclear cytokines and/or transcription factors staining assay, using the indicated combinations of Ab specific for FOXP3 (eBioscience), ROR γ t (eBioscience), Helios (Biolegend), IL-17 (eBioscience), IFN- γ (BD Biosciences), and IL-10 (BD Biosciences), following stimulation or not with PMA and ionomycin (0.1 μ g/mL and 1 μ g/mL, respectively; Sigma Aldrich).

Assessment of *IL4I1*, *IKZF3*, and *Tob1* mRNA expression by PCR

RNA was prepared from ex vivo-sorted or in vitro-expanded CD4⁺ T-cell populations, following stimulation or not with PMA and ionomycin for 24 h, using the RNeasy Micro Kit (Qiagen). Total RNA from human testis tissue was purchased from Ambion Inc. cDNA synthesis was performed using Promega Reverse Transcription System A3500 (Promega). Semiquantitative PCR was performed using GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega). cDNA integrity was tested by amplification of β -actin (*ACTB*) mRNA, and *IL4I1* mRNA expression was assessed using the following primers: forward, 5'-CCAAGACCCCTTCGAGAAATG-3'; reverse, 5'-GCCTCGGCGAAGCTGAGATAG-3'. Quantitative PCR (qPCR) was performed with a TaqMan assay on an ABI 7000 system using Assays-on-Demand Gene Expression probes (Applied Biosystems) for *IL4I1* (Hs00541746.m1), *IKZF3* (Hs00232635.m1), *Tob1* (Hs03986111.s1), and the house keeping genes *ACTB* (Hs99999903.m1) and *GAPDH* (Hs02758991.g1). Relative mRNA expression was calculated as $2^{-(Ct \text{ house keeping gene} - Ct \text{ test gene})}$.

Acknowledgments: The study was supported by the Ludwig Institute for Cancer Research (USA), the Cancer Research Institute (USA), the Ligue contre le Cancer (France), and the LabEX IGO (France). C.M.S. is supported through a fellowship from INSERM and the Région des Pays de la Loire (France).

Conflict of interest: The authors declare no commercial or financial conflict of interest.

References

- Weaver, C. T. and Hatton, R. D., Interplay between the TH17 and TReg cell lineages: a (co-)evolutionary perspective. *Nat. Rev. Immunol.* 2009. **9**: 883–889.
- Lee, Y. K., Mukasa, R., Hatton, R. D. and Weaver, C. T., Developmental plasticity of Th17 and Treg cells. *Curr. Opin. Immunol.* 2009. **21**: 274–280.
- Ayyoub, M., Deknuydt, F., Raimbaud, I., Dousset, C., Leveque, L., Biolley, G. and Valmori, D., Human memory FOXP3⁺ Tregs secrete IL-17 ex vivo and constitutively express the T(H)17 lineage-specific transcription factor ROR γ t. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009. **106**: 8635–8640.
- Thornton, A. M., Korty, P. E., Tran, D. Q., Wohlfert, E. A., Murray, P. E., Belkaid, Y. and Shevach, E. M., Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3⁺ T regulatory cells. *J. Immunol.* 2010. **184**: 3433–3441.
- Gandhi, R., Kumar, D., Burns, E. J., Nadeau, M., Dake, B., Laroni, A., Kozoriz, D. et al., Activation of the aryl hydrocarbon receptor induces human type 1 regulatory T cell-like and Foxp3(+) regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 2010. **11**: 846–853.
- Quintana, F. J., Jin, H., Burns, E. J., Nadeau, M., Yeste, A., Kumar, D., Rangachari, M. et al., Aiolos promotes TH17 differentiation by directly silencing IL2 expression. *Nat. Immunol.* 2012. **13**: 770–777.
- Raffin, C., Pignon, P., Celse, C., Debien, E., Valmori, D. and Ayyoub, M., Human memory Helios- FOXP3⁺ regulatory T cells (Tregs) encompass induced Tregs that express Aiolos and respond to IL-1 β by downregulating their suppressor functions. *J. Immunol.* 2013. **191**: 4619–4627.
- Boulland, M. L., Marquet, J., Molinier-Frenkel, V., Moller, P., Guiter, C., Lasoudris, F., Copie-Bergman, C. et al., Human IL4I1 is a secreted L-phenylalanine oxidase expressed by mature dendritic cells that inhibits T-lymphocyte proliferation. *Blood* 2007. **110**: 220–227.
- Santarasci, V., Maggi, L., Capone, M., Querci, V., Beltrame, L., Cavaliere, D., D'Aiuto, E. et al., Rarity of human T helper 17 cells is due to retinoic acid orphan receptor-dependent mechanisms that limit their expansion. *Immunity* 2012. **36**: 201–214.
- Ivanov, I., McKenzie, B. S., Zhou, L., Tadokoro, C. E., Lepelley, A., Lafaille, J. J., Cua, D. J. et al., The orphan nuclear receptor ROR γ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 2006. **126**: 1121–1133.
- Valmori, D., Raffin, C., Raimbaud, I. and Ayyoub, M., Human ROR γ t⁺ TH17 cells preferentially differentiate from naive FOXP3⁺Treg in the presence of lineage-specific polarizing factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010. **107**: 19402–19407.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K. J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G. et al., 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.* 2003. **198**: 1875–1886.
- Fantini, M. C., Becker, C., Monteleone, G., Pallone, F., Galle, P. R. and Neurath, M. F., Cutting edge: TGF- β induces a regulatory phenotype in CD4⁺CD25⁻ T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J. Immunol.* 2004. **172**: 5149–5153.
- Fahlen, L., Read, S., Gorelik, L., Hurst, S. D., Coffman, R. L., Flavell, R. A. and Powrie, F., T cells that cannot respond to TGF- β escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 2005. **201**: 737–746.
- Gottschalk, R. A., Corse, E. and Allison, J. P., Expression of Helios in peripherally induced Foxp3⁺ regulatory T cells. *J. Immunol.* 2012. **188**: 976–980.

- 16 Himmel, M. E., MacDonald, K. G., Garcia, R. V., Steiner, T. S. and Levings, M. K., Helios⁺ and Helios⁻ cells coexist within the natural FOXP3⁺ T regulatory cell subset in humans. *J. Immunol.* 2013. **190**: 2001–2008.
- 17 Ayyoub, M., Raffin, C. and Valmori, D., Comment on "helios⁺ and helios⁻ cells coexist within the natural FOXP3⁺ T regulatory cell subset in humans". *J. Immunol.* 2013. **190**: 4439–4440.
- 18 Santarlasci, V., Maggi, L., Mazzoni, A., Capone, M., Querci, V., Rossi, M. C., Beltrame, L. et al., IL-4-induced gene 1 maintains high Tob1 expression that contributes to TCR unresponsiveness in human T helper 17 cells. *Eur. J. Immunol.* 2014. **44**: 654–661.
- 19 Raffin, C., Raimbaud, I., Valmori, D. and Ayyoub, M., Ex vivo IL-1 receptor type I expression in human CD4⁺ T cells identifies an early intermediate in the differentiation of Th17 from FOXP3⁺ naive regulatory T cells. *J. Immunol.* 2011. **187**: 5196–5202.
- 20 Deknuydt, F., Bioley, G., Valmori, D. and Ayyoub, M., IL-1beta and IL-2 convert human Treg into T(H)17 cells. *Clin. Immunol.* 2009. **131**: 298–307.
- 21 Koenen, H. J., Smeets, R. L., Vink, P. M., van Rijssen, E., Boots, A. M. and Joosten, I., Human CD25^{high}Foxp3^{pos} regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells. *Blood* 2008. **112**: 2340–2352.

Full correspondence: Dr. Maha Ayyoub, INSERM UMR 1102, Institut de Cancérologie de l'Ouest, 44800 Nantes-Saint Herblain, France
Fax: +33-02-40-67-97-63
e-mail: Maha.Ayyoub@univ-nantes.fr

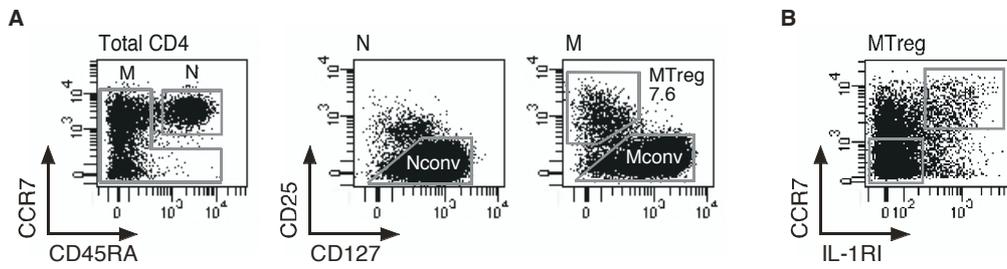
Additional correspondence: Prof. Danila Valmori, INSERM UMR 1102, Institut de Cancérologie de l'Ouest, 44800 Nantes-Saint Herblain, France
Fax: +33-02-40-67-97-63
e-mail: Danila.Valmori@univ-nantes.fr

Received: 2/6/2014

Revised: 29/10/2014

Accepted: 26/11/2014

Accepted article online: 29/11/2014



Supporting Information Figure 1. Sorting of CD4⁺ T cell conventional and regulatory populations. (A) CD4⁺ T cells enriched from healthy donors PBMC by magnetic cell sorting were stained with anti-CD45RA, -CCR7, -CD25 and -CD127 Ab and sorted by flow cytometry into naive conventional (Nconv; CD45RA⁺CCR7⁺CD25⁻), memory conventional (Mconv; CD45RA⁻CCR7^{+/-}CD25⁻) and memory Treg (MTreg; CD45RA⁻CCR7^{+/-}CD25⁺CD127^{low}) populations. (B) CD4⁺ T cells were stained with anti-CD45RA, -CCR7, -CD25, -CD127 and -IL-1RI Ab and MTreg, gated as in A, were sorted into CCR7⁺IL-1RI⁺ and CCR7⁻IL-1RI⁻ populations.

V. 2. a. Etude des la réponse T CD4 spécifique des bactéries filamenteuses segmentées (SFB) chez les donneurs sains et les patients atteints de maladies autoimmunes.

Le travail présenté dans ce chapitre a été réalisé en collaboration avec les équipes du Dr. Nadine Cerf-Bensussan (Laboratory of Intestinal Immunity, INSERM UMR1163, Paris) et du Prof. Xavier Mariette (Hôpitaux Universitaires Paris Sud, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Le Kremlin Bicêtre).

Mon objectif initial dans la deuxième partie de ma thèse était d'explorer la spécificité antigénique des iTreg chez l'homme et en particulier d'explorer si une partie de ces cellules sont spécifiques du microbiote. En effet, bien qu'il soit aujourd'hui admis que les deux populations de Treg, iTreg et nTreg, aient des fonctions physiologiques spécialisées, leurs spécificités antigéniques, qui permettraient de mieux comprendre leurs rôles respectifs et de concevoir des stratégies thérapeutiques permettant de les manipuler, commencent seulement à être explorées.

Des travaux réalisés dans des modèles murins transgéniques explorant le répertoire TCR des Treg intestinales, qui participent à la tolérance du microbiote, ont donné des résultats contrastant avec certains montrant un chevauchement important avec celui des Treg thymiques[135] et d'autres, au contraire, soutenant leur origine périphérique[126]. Plus récemment, un rôle direct du microbiote intestinal, et en particulier du butyrate, produit par la fermentation de l'amidon par des bactéries intestinales, dans la différenciation colique des Treg a été mis en évidence[136,137]. Ces études ont cependant montré que le butyrate seul ne suffisait pas à induire la différenciation des iTreg dans les souris axéniques (GF) ou traitées par des antibiotiques et la présence de bactéries, probablement comme source d'antigènes, était donc indispensable. D'autres études ont pu identifier plusieurs souches commensales de Clostridia des clusters IV, XIVa et XVIII chez l'homme[432] et des clusters IV et XIVa chez la souris[338] qui, lorsqu'elles sont introduites dans des souris GF, induisent une augmentation de la fréquence des Treg coliques. Certaines de ces souches sont capables de produire du butyrate mais les mécanismes impliqués dans l'induction des Treg après colonisation et la spécificité des Treg induites n'ont pas été explorés. Il est intéressant de noter que la mono-colonisation avec chacune des souches ne permet pas d'observer le même phénomène d'induction de Treg. Alors que l'ensemble de ces études suggère fortement une implication primordiale du microbiote dans le développement des iTreg, la spécificité antigénique de ces dernières reste aujourd'hui inconnue chez l'homme et chez la souris.

L'analyse du microbiome, grâce aux techniques de séquençage de haut débit des gènes codants pour le 16S rRNA permettant de déterminer les espèces bactériennes majeures composant le microbiote intestinal, a montré que deux phylums, *Firmicutes* (incluant les genres *Enterococcus* et *Clostridium*) et *Bacteroidetes* (incluant le genre *Bacteriodes*), représentent >90% du microbiote suivis des *Proteobacteria* (ex : *Escherichia*) et *Actinobacteria* (ex : *Bifidobacterium*). Afin d'explorer la spécificité des cellules iTreg humaines, j'ai utilisé des souches représentatives de ces espèces afin de tester leur reconnaissance par les cellules Treg et CD4 conventionnelles mémoires de donneurs sains. Pour cela, j'ai trié les cellules CD4 par cytométrie en flux afin d'obtenir des populations mémoires Treg et conventionnelles pures. J'ai ensuite évalué leur capacité à reconnaître les différents commensaux présentés par des cellules présentatrices de l'antigène (APC) autologues (DC ou monocytes). Etant donné que la large majorité de Treg ne produit pas de cytokines, j'ai évalué leur capacité à reconnaître les APC en suivant leur degré de prolifération, par des essais basés sur un marquage stable des cellules par du CFSE. J'ai également, cependant, mesuré dans ces mêmes cultures les proportions de cellules produisant des cytokines (principalement l'IFN- γ et l'IL-17). Nous sous sommes cependant rendus compte des limites de ce système expérimental. En effet, comme les Treg contiennent une proportion de cellules auto-réactives, il était difficile de distinguer la prolifération suscitée par une réponse spécifique contre les antigènes bactériens de celle résultant de la reconnaissance des APC autologues activées par l'incubation avec des bactéries entières qui augmentent l'expression des molécules de costimulation. Nous avons donc souhaité orienter le projet vers l'étude des réponses anti-SFB où les protéines immuno-dominantes sont connues[411] et il était donc possible d'étudier la réponse spécifique sans avoir recours aux commensaux entiers.

Les SFB sont des bactéries sporulantes à Gram positif anaérobies qui font partie du microbiote intestinal. Leur présence dans plusieurs espèces d'invertébrés et de vertébrés a été suggérée par des études de microscopie électronique en se basant sur leur morphologie caractéristique[387,388] et a été confirmée par l'amplification par PCR de l'ARN ribosomique (ARNr) 16S spécifique[425,433].

Le séquençage de l'ARNr a permis la classification des SFB qui colonisent les vertébrés comme un groupe distinct du sous-phylum *Clostridium*[433]. La cohabitation des SFB avec un large spectre d'espèces à travers le règne animal suggère une coévolution bénéfique au commensal, à l'hôte ou au deux à la fois[389]. Le séquençage des génomes complets des SFB colonisant le rat et la souris a

confirmé leur classification phylogénétique comme groupe unique parmi les *Clostridia*[391–393]. De façon tout à fait remarquable, les analyses de génomique fonctionnelle et comparative ont révélé la probable dépendance des SFB de nutriments et de cofacteurs dérivés de l'environnement fourni par l'hôte[391–393]. Une des interprétations proposées de ces résultats étaient que cette dépendance pouvait découler d'une adaptation imposée par l'hôte aux bactéries durant l'évolution de façon à imposer une relation mutualiste, plutôt que commensal, avec des microorganismes qui jouent un rôle primordial pour l'hôte[393].

Chez la souris, des évidences expérimentales irréfutables démontrent le rôle important que les SFB jouent dans le développement du système immunitaire intestinal[391]. Les premières études ont montré que la colonisation de souris axéniques (GF, germfree) par les SFB augmentait le nombre de lymphocytes intra-épithéliaux TCR $\alpha\beta^+$ et induisait l'expression des molécules de MHC de classe II dans les cellules épithéliales de l'intestin[412]. La mono-colonisation de souris axéniques avec des SFB augmente le nombre de plasmocytes sécrétant des IgA dans la muqueuse intestinale ainsi que les titres d'IgA dans les sécrétions intestinales et dans le sérum et cela à des niveaux supérieurs à ceux atteints dans des souris colonisées avec une flore complexe dépourvue de pathogènes (SFP, specific-pathogen-free) et qui ne contient pas de SFB[406]. L'étude de la spécificité antigénique des IgA a montré que seule une petite fraction des IgA induites par les SFB en étaient spécifiques[408]. Cependant, les IgA qui couvrent les SFB semblent dépendantes des lymphocytes T à l'inverse de celles couvrant la majorité des commensaux qui sont pour la plupart indépendantes des T[409]. En accord avec le concept selon lequel les SFB seraient capables d'induire des IgA spécifiques dépendantes des T, deux études pionnières ont démontré que la mono-colonisation de souris axéniques avec des SFB pouvait restaurer les populations lymphocytaires T CD4 de la lamina propria, notamment les T_H17[327,329] et, à un degré moindre, les lymphocytes produisant l'IFN- γ et l'IL-10 ainsi que les Treg FOXP3⁺[329]. De façon intéressante, l'induction des T_H17 par les SFB *in vivo* est dépendante de l'expression des molécules du MHC de classe II dans les cellules dendritiques[434] et, lorsqu'elles sont générées dans des souris ayant un tissu lymphoïde intestinal normal, la plupart des T_H17 induites par les SFB reconnaissent spécifiquement des antigènes dérivés des SFB[408,434]. La réponse T CD4 induite par les SFB est polyclonale avec cependant, dans les souris I-A^{b+}, une dominance de lymphocytes T portant le segment variable 14 au niveau de la chaîne β du TCR[411,434]. La dominance des cellules TCR V β 14 a été exploitée par le groupe de D. Littman pour séparer et cloner ces cellules afin d'en déterminer la spécificité antigénique[411]. Ce travail a permis de confirmer que les lymphocytes T

CD4 induits par les SFB en étaient spécifiques. Il a été proposé que la réponse immunitaire intégrée induite par les SFB a pour rôle physiologique de contrôler l'expansion de ces bactéries dans l'intestin[389,435]. Cependant, des études réalisées dans plusieurs modèles murins d'auto-immunité, comme ceux de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale et de l'arthrite, ont montré que la réponse immunitaire induite par les SFB participe au développement des manifestations d'auto-immunité[335,421,436].

L'importance des SFB pour le développement de l'immunité intestinale chez la souris ensemble avec la présence de ces bactéries dans plusieurs espèces à travers le règne animal a suscité la recherche de preuves de leur présence dans l'intestin chez l'homme[423]. Comme je l'ai présenté de façon plus détaillée dans le chapitre de l'introduction dédié aux SFB, des études de microscopie ainsi que des analyses des gènes ARNr 16S ont suggéré la présence des SFB chez l'homme dans certaines pathologies ou en situation physiologique[388,424–426]. Alors que ces différentes études apportent une indication d'une possible colonisation de l'intestin humain par des SFB ou des bactéries apparentées, la présence des SFB chez l'homme a été remise en question puisque la recherche de séquences homologues au génome des SFB murines dans les données de métagénomique du microbiote humain n'a pas permis d'identifier d'homologies[393].

Afin de rechercher des évidences de la présence des SFB chez l'homme nous avons décidé d'aborder la question du côté des lymphocytes T spécifiques. Nous avons émis l'hypothèse que malgré la spécificité hôte/SFB, qui serait surtout en lien avec leur capacité à adhérer de façon spécifique à l'épithélium de chaque espèce hôte[402], les gènes codant pour les protéines les plus immunogéniques et qui confèrent donc un avantage à l'hôte[393], serait conservées à travers les SFB colonisant différentes espèces. Une analyse non biaisée de la réponse T CD4 dans des souris axéniques monocolonisées avec des SFB a permis d'identifier deux protéines bactériennes, SFBNYU_003340 et SFBNYU_004990, uniques à SFB, dont les fonctions sont inconnues et qui induisaient à elles seules la majeure partie de la réponse CD4 contre la bactéries[411]. Ces deux protéines semblent donc être parmi les antigènes immunodominants des SFB et nous avons focalisé notre analyse de la réponse anti-SFB chez l'homme sur une de ces protéines, SFBNYU_004990 (SFB49).

V. 2. b. Travail expérimental et résultats.

Mise en évidence des réponses T CD4 spécifiques de SFB chez les donneurs sains

Nous avons dans un premier temps utilisé un algorithme de prédiction de liaison des peptides aux molécules de MHC de classe II (NetMHCII) afin d'identifier les régions de la protéine SFB49 (309 acides aminés (aa)) potentiellement présentées par les différents allèles codant pour les principaux HLA-DR. Cette analyse a montré que plusieurs régions de la protéine avaient une densité élevée de peptides potentiellement présentables par HLA-DR (Fig. 36). De façon intéressante, le peptide immunodominant chez la souris (positions 58-66)[411] est localisé dans la principale région de la protéine contenant une densité élevée de peptides prédits comme étant capables de se lier aux molécules de MHC humaines.

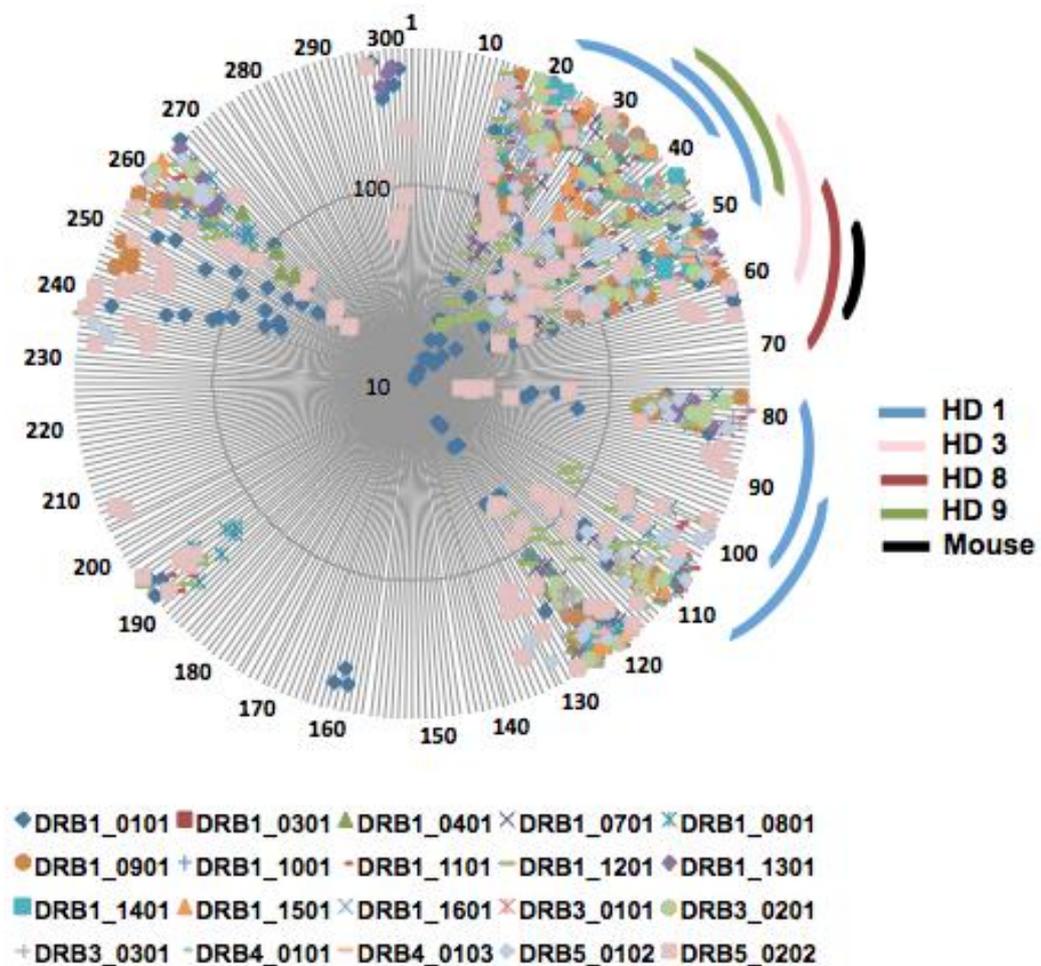


Figure 36. Identification des régions de la protéine SFB49 contenant des peptides potentiellement capables de se lier à HLA-DR. La prédiction de liaison de tous les peptides de 15 acides aminés de la protéine aux molécules HLA-DR codées par les allèles principaux a été réalisée utilisant l'algorithme NetMHCII. Les peptides ayant une affinité de liaison prédite < 500 nM sont représentés. Chaque point sur le graphique représente un peptide prédit selon : la molécule HLA à laquelle il se lie (couleur des symboles), la position du premier acide aminé du peptide dans la

protéine (abscisses, anneau extérieur) et la valeur de l'affinité de liaison prédite (axe radar). Les traits à l'extérieur du graphique montrent les peptides de SFB49 capables d'induire des réponses T CD4 chez la souris (mouse) et chez les donneurs sains (HD).

Nous avons ensuite synthétisé des peptides de 20 aa chevauchant par 10 aa et qui couvrent la majeure partie de la séquence de la protéine (aa 1-280; Tableau 1) et les avons utilisés pour rechercher les lymphocytes T CD4 spécifiques chez les donneurs sains.

Tableau 1. Peptides longs chevauchants (protéine SFB49)

Peptide number	Amino acid range	Sequenze
P1	1-20	MGEINMKNSKNNNDKKQKNY
P2	11-30	NNNDKKQKNYRDKSYKAISL
P3	21-40	RDKSYKAISLASLSTIALTL
P4	31-50	ASLSTIALTLGLSNFKEVKS
P5	41-60	GLSNFKEVKSMLMTKGGTIRW
P6	51-70	LMTKGGTIRWFGSSVQKVIQ
P7	61-80	FGSSVQKVIQPGNMGSTGNT
P8	71-90	PGNMGSTGNTGAKVVAAKSG
P9	81-100	GAKVVAAKSGAVANATTKVT
P10	91-110	AVANATTKVTGGINTTSTRGF
P11	101-120	GGINTTSTRGFAKFNKQWPNP
P12	111-130	AKFNKQWPNPFTKIHLDLTK
P13	121-140	FTKIHLDLTKNPSIGSTSSV
P14	131-150	NPSIGSTSSVKKPTSGTTSS
P15	141-160	KKPTSGTTSSSTKNNSNSST
P16	151-170	STKNNSNSSTGATGSLKLP
P17	161-180	GATGSLKLPATNGSTSGSLK
P18	171-190	TNGSTSGSLKLPNNNTTETP
P19	181-200	LPNNNTTETPNSGNTTLVKR
P20	191-210	NSGNTTLVKRPPSSSSTSSNT
P21	201-220	PSSSSTSSNTSSNGAVKLP
P22	211-230	SSNGAVKLPIGEYEDVTQNQ
P23	221-240	GEYEDVTQNTNNTNPNTGMS
P24	231-250	NTNNTNPNTGMSTAKKVGIGVA
P25	241-260	TAKKVGIGVAAVAGAGAIAG
P26	251-270	AVAGAGAIAGIIAGIISATN
P27	261-280	IIAGIISATNSAGGQSSGSN

Nous avons utilisé le pool de peptides SFB49 pour stimuler *in vitro* les lymphocytes T CD4 de donneurs sains en présence de la fraction CD4⁻ comme APC autologues. Comme nous nous attendions à avoir une fréquence faible de précurseurs spécifiques, nous avons réalisé ces expériences en utilisant un nombre élevé de CD4, > 10⁷. Après 10 jours de culture en présence d'IL-2, nous avons utilisé une fraction des cellules afin de mesurer l'expansion des cellules spécifiques. Pour cela, nous avons stimulé les cellules en absence ou en présence du pool de peptide et avons mesuré la production de cytokines (IFN- γ , IL-10 et IL-17) par marquage intracellulaire. L'analyse de 14 donneurs sains a montré que 5 d'entre eux avaient une réponse anti-SFB 49 dominée par des cellules IFN- γ ⁺ (Fig. 37). Des cellules produisant de l'IL-17 ou de l'IL-10 étaient détectables à des fréquences plus basses et dans un nombre moins importants de donneurs (résultats non montrés).

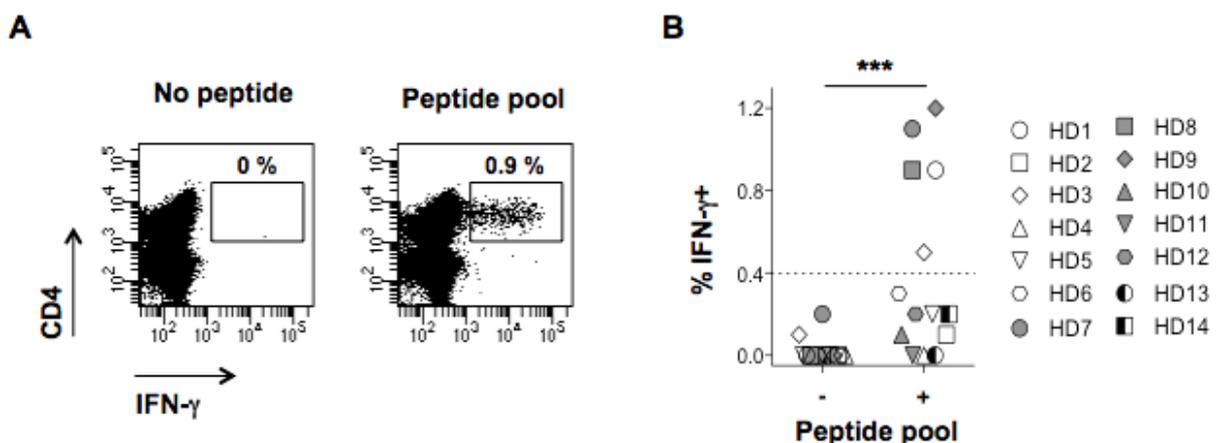


Figure 37. Détection des réponses T CD4 IFN- γ ⁺ spécifiques de SFB chez les donneurs sains. Les lymphocytes T CD4 de 14 donneurs sains ont été stimulés *in vitro* pendant 12 jours en présence du pool de peptides SFB49 (Tableau 1) en présence de la fraction CD4⁻ irradiée. Les cultures ont été stimulées en absence et en présence du pool à J12 et la production d'IFN- γ a été mesurée par marquage intracellulaire et analysée par cytométrie en flux. Un exemple de cytogramme montrant le marquage CD4 et IFN- γ pour un donneur est montré (A) et les données obtenues pour l'ensemble des donneurs en terme de pourcentage de cellules IFN- γ ⁺ sont résumées (B). Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le test de Mann-Whitney. ***, $p < 0,001$.

Dans les cultures des donneurs répondeurs nous avons mesuré la production d'IFN- γ en réponse aux peptides individuels composant le pool. La majeure partie des réponses était spécifique de peptides contenus dans la région 15-75 qui contenait la plus grande densité de peptides prédits

comme étant capable de se lier aux molécules HLA-DR et qui contient de plus l'épitope immunodominant murin (Fig. 36).

Afin de confirmer que les réponses observées dans les cultures reflétaient la présence de lymphocytes mémoires *in vivo* et non le priming d'une réponse *in vitro* à partir de lymphocytes naïfs, nous avons séparé par tri cellulaire les lymphocytes T CD4 naïfs ($CD45RA^+CCR7^+$) et mémoires ($CD45RA-CCR7^{+/-}$) (Fig. 38A) des répondeurs et les avons testés pour la présence de cellules spécifiques de SFB49 en utilisant la même approche expérimentale. Les résultats résumés dans la Figure 38C montrent que les cellules spécifiques sont détectées uniquement dans les cultures de lymphocytes T CD4 mémoires. L'ensemble de ces résultats (Figure 37 et 38C) suggère que des réponses lymphocytaires T CD4 mémoires sont détectables dans une fraction de donneurs sains.

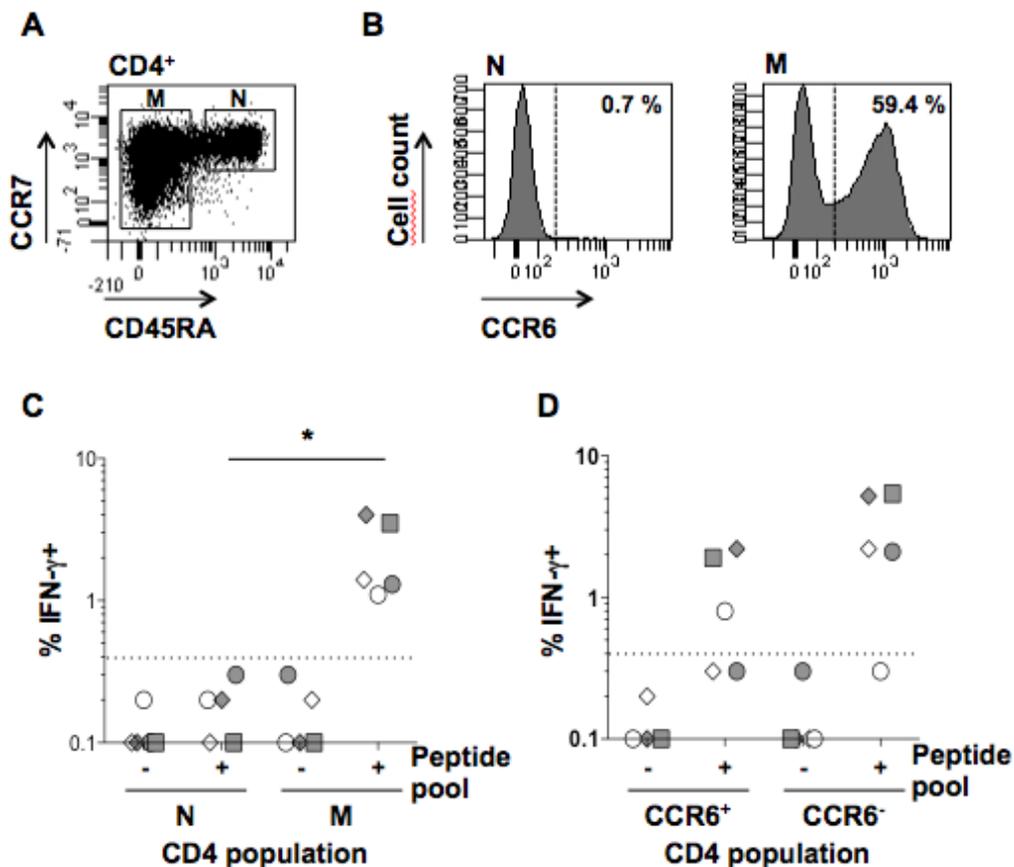


Figure 38. Détection des réponses T CD4 IFN- γ ⁺ spécifiques de SFB dans les sous populations de lymphocytes T CD4. A) Les lymphocytes T CD4 des donneurs sains répondeurs ont été séparés *ex vivo* par tri magnétique et marqués par des anticorps monoclonaux spécifiques de CD4, CD45RA, CCR7 et CCR6. Les populations de lymphocytes T CD4 naïfs ($CD45RA^+CCR7^+$) et mémoires ($CD45RA^-$

CCR7^{+/+}) ont été triées par cytométrie en flux (cytogramme de gauche) (pureté > 98%). Une partie des lymphocytes mémoires ont été séparés dans deux populations selon l'expression de CCR6 (cytogramme de droite). B) Les populations séparées ont été stimulées *in vitro* avec le pool de peptides SFB49 et testés pour la production d'IFN- γ comme détaillé dans la légende à la Figure 37 ci-dessus. Les symboles identifiant les donneurs individuels sont les mêmes que dans la Figure 37. Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le test de Mann-Whitney. *, $p < 0,05$.

La réponse anti-SFB49 chez les donneurs sains était dominée par des cellules produisant de l'IFN- γ . Ce résultat est en contraste avec les données murines qui montrent qu'une large fraction des cellules induites par SFB sécrètent de l'IL-17 au niveau de l'intestin[329,411], même si des cellules IFN- γ ⁺ et IL-10⁺ sont induites après colonisation des souris axéniques par les SFB[329] et des cellules IFN- γ ⁺ spécifiques de la protéine SFB49 ont également été détectées[411]. Les T_H17, comme les Treg, sont parmi les populations T CD4 dotées d'un degré important de plasticité. Les cellules T_H17 peuvent perdre la capacité de produire l'IL-17 et peuvent se trans-différencier en cellules produisant de l'IFN- γ dans des conditions inflammatoires[173] et à des stades tardifs de différenciation[174]. Elles peuvent également se trans-différencier en cellules régulatrices produisant de l'IL-10[169].

L'expression de récepteurs de chimiokines spécifiques des différentes populations de lymphocytes T CD4 lors du priming leur confère la capacité de migrer vers les sites inflammatoires appropriés. Le récepteur de chimiokines CCR6 est exprimé par les cellules T_H17 et plusieurs études ont montré que son expression était maintenue même lorsque ces cellules se trans-différencient en cellules IFN- γ ⁺[174]. En séparant les lymphocytes T CD4 mémoires des donneurs sains répondeurs selon l'expression de CCR6 *ex vivo* (Figure 38A et 38B) et en les stimulant *in vitro* avec le pool de peptides SFB49, nous avons détecté des réponses spécifiques dans les deux fractions (Figure 38D). Ce résultat suggère qu'au moins une fraction des cellules spécifiques IFN- γ ⁺ a pu s'être développée initialement comme T_H17.

Séparation et caractérisation des lymphocytes T CD4 spécifiques de SFB au niveau clonal.

Afin de caractériser les lymphocytes T CD4 spécifiques de SFB, nous les avons séparés et nous avons généré des populations clonales que nous avons ensuite caractérisées en terme de sécrétion de cytokines et d'expression de facteurs de transcription ainsi que celle d'autres molécules d'intérêt. Afin de séparer les cellules spécifiques à partir des cultures de lymphocytes T

CD4 des donneurs répondeurs, nous avons utilisé l'essai de sécrétion-capture de cellules sécrétrices de cytokines (cytokine secretion catch assay, Miltenyi Biotec) qui permet de séparer des cellules viables en fonction des cytokines qu'elles produisent. En concordance avec les résultats obtenus dans l'essai de marquage intracellulaire de cytokines, nous avons détecté des fréquences élevées de cellules $\text{IFN-}\gamma^+$ et peu de cellules IL-17^+ (Fig. 39). Cependant, en contraste avec les données de marquage intracellulaire, l'essai de sécrétion-capture nous a permis de détecter une fraction de cellules dans les cultures qui sécrétaient de l'IL-10 en réponse à la stimulation peptidique (Fig. 39). Ces résultats étaient compatibles avec les données de la littérature qui documentent la difficulté de détection de l'IL-10 par marquage intracellulaire[437]. Nos résultats indiquaient donc que la réponse à SFB chez les donneurs sains était composée de cellules productrices d'IL-10 en plus de celles qui produisent de l'IFN- γ . Nous avons trié par cytométrie en flux les cellules $\text{IFN-}\gamma^+$ et IL-10^+ spécifiques de SFB et nous les avons clonées.

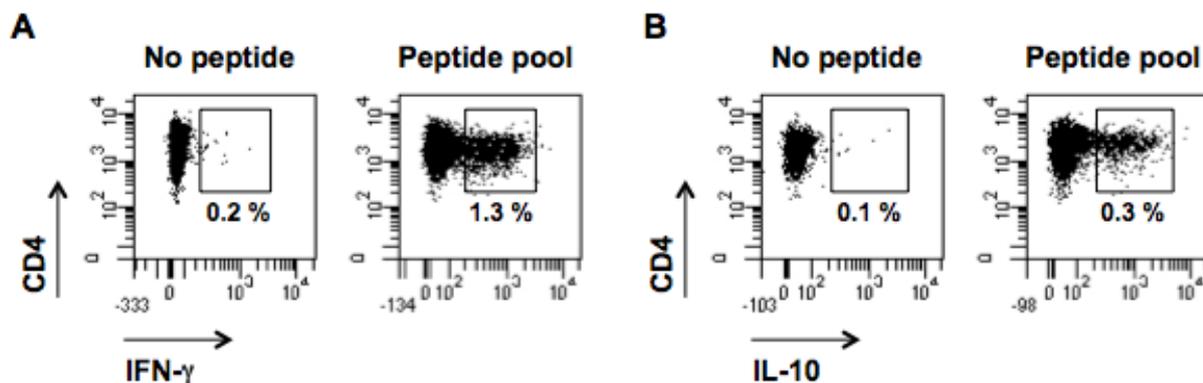


Figure 39. Tri cellulaire des lymphocytes T CD4 $\text{IFN-}\gamma^+$ et IL-10^+ spécifiques de SFB. Les lymphocytes T CD4 séparés ex vivo par tri magnétique ont été stimulés in vitro pendant 12 jours en présence du pool de peptides SFB49 (Tableau 1) en présence de la fraction CD4^+ irradiée. Les cultures ont été stimulées en absence et en présence du pool à J12 et la production d'IFN- γ (A) et d'IL-10 (B) a été mesurée en utilisant l'essai de sécrétion-capture (Miltenyi Biotec). Les lymphocytes $\text{IFN-}\gamma^+$ et IL-10^+ ont été triés par cytométrie en flux (pureté > 98%).

Nous avons confirmé la spécificité antigénique des clones obtenus en les stimulant en absence et en présence du pool de peptides et en mesurant la sécrétion d'IFN- γ et d'IL-10 dans le surnageant des cultures par ELISA (données non montrées). Nous avons utilisé les clones dont la spécificité était confirmée dans les analyses montrées ci-dessous. Nous avons également cloné des lymphocytes T CD4 naïfs et avons utilisé les clones obtenus comme contrôles dans ces

expériences. Tous les clones spécifiques, qu'ils aient été obtenus à partir de cellules séparées comme $\text{IFN-}\gamma^+$ ou IL-10^+ , produisent des quantités élevées d' $\text{IFN-}\gamma$ en réponse à une stimulation par PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate)/ionomycine (Fig. 40A). Les clones contrôles obtenus des lymphocytes naïfs produisent également de l' $\text{IFN-}\gamma$. D'un total de 47 clones spécifiques, 14 sécrètent de quantités significatives d' IL-10 et, de façon remarquable, 11 produisent de l' IL-17 (Figure 40A). Aucun des clones obtenus des lymphocytes naïfs ne produit ces deux cytokines.

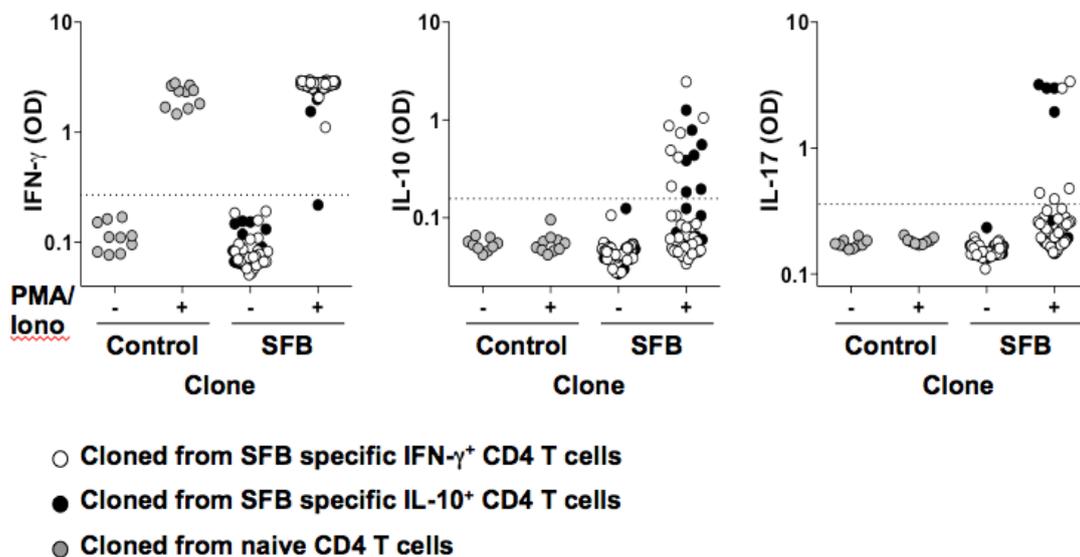


Figure 40. Profil de production de cytokines des clones T CD4 spécifiques de SFB. Les clones spécifiques de SFB obtenus par tri des cellules sécrétant spécifiquement de l' $\text{IFN-}\gamma$ ou de l' IL-10 en réponse à SFB (Figure 39) ainsi que les clones contrôles (obtenus de lymphocytes T CD4 naïfs) ont été stimulés en absence et en présence de PMA/ionomycine et la production de cytokines a été mesurée dans le surnageant des cultures (24h) par ELISA.

Nous avons ensuite investigué l'expression des facteurs de transcription caractéristiques des $\text{T}_{\text{H}1}$ et des $\text{T}_{\text{H}17}$, T-bet et $\text{ROR}\gamma\text{t}$ respectivement, dans les clones spécifiques de SFB et qui produisent de l' $\text{IFN-}\gamma$ mais pas d' IL-17 ($\text{T}_{\text{H}1}$) et ceux qui produisent de l' IL-17 ($\text{T}_{\text{H}17}$) ainsi que dans les clones contrôles obtenus des lymphocytes naïfs. En accord avec leur capacité à produire de l' $\text{IFN-}\gamma$, tous les clones ($\text{T}_{\text{H}1}$ et $\text{T}_{\text{H}17}$) expriment T-bet (Figure 41A). Les niveaux d'expression de T-bet sont cependant plus élevés dans les clones $\text{T}_{\text{H}1}$ par rapports aux clones $\text{T}_{\text{H}17}$ ainsi que ceux dérivés de cellules naïves. $\text{ROR}\gamma\text{t}$, qui contrôle l'expression de l' IL-17 , est exclusivement exprimé dans les clones $\text{T}_{\text{H}17}$ et absent des clones $\text{T}_{\text{H}1}$ et de ceux dérivés de cellules naïves (Figure 41b).

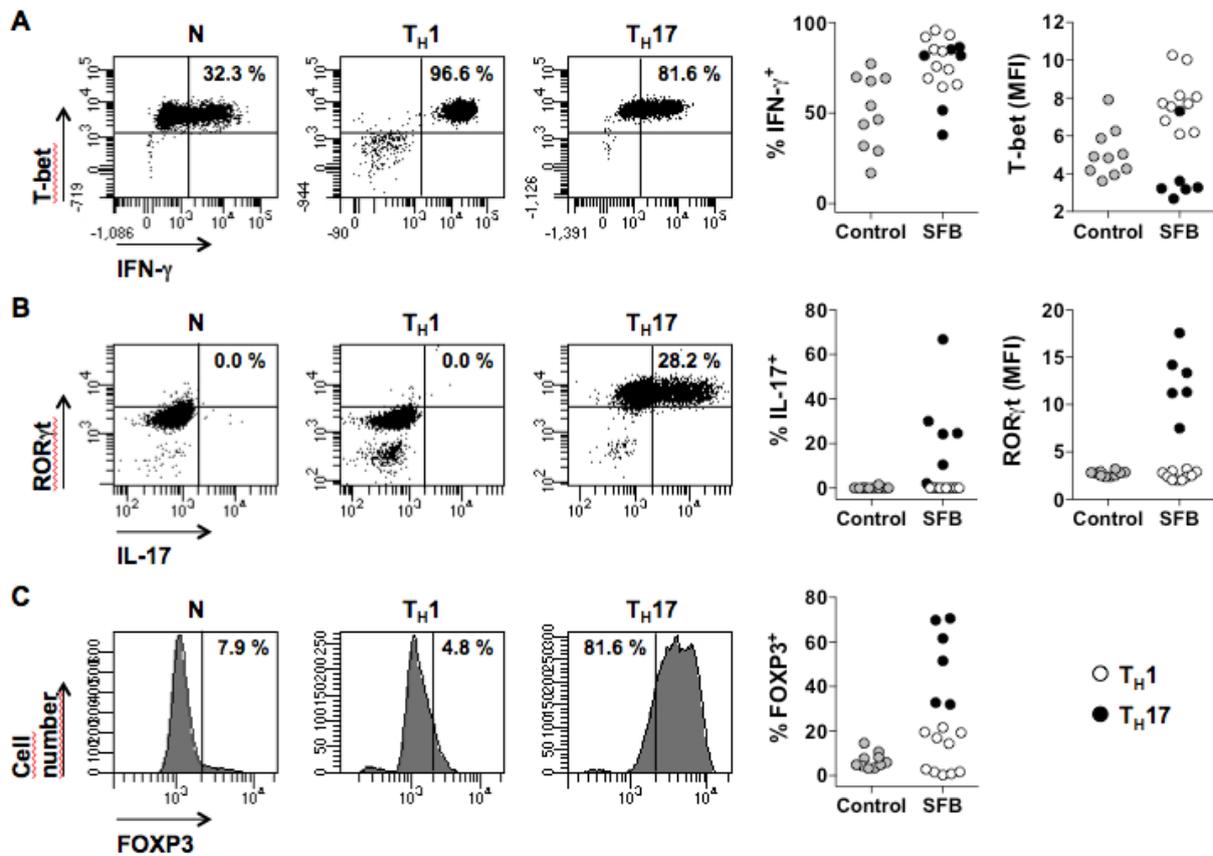


Figure 41. Profil d'expression de facteurs de transcription des clones T CD4 spécifiques de SFB. Les clones T_H1 et T_H17 spécifiques de SFB ainsi que les clones naïfs contrôles ont été stimulés en présence de PMA/ionomycine et la production de cytokines et l'expression de facteurs de transcription ont été mesurées par marquage intracellulaire/intranucléaire et analysées par cytométrie en flux. Des exemples de cytogramme sont présentés pour chaque paramètre mesuré et pour chaque type de clone et les résultats obtenus pour l'ensemble des clones sont résumés.

Le lien entre les T_H17 et les Treg[158], la présence d'une population de lymphocytes T CD4 humains circulants $IL-10^+IL-17^+FOXP3^+$ décrite par notre laboratoire[345] ainsi que la présence d'une population cellulaire $IL-10^+IL-17^+FOXP3^+ROR\gamma t^+$ décrite dans l'intestin de souris y compris les souris axéniques colonisées par les SFB[410], nous ont incités à évaluer l'expression de FOXP3 dans les clones. Alors que FOXP3 n'est pas exprimé dans les clones issus de cellules naïves et qu'il ne l'est pas non plus dans les clones T_H1 anti-SFB, tous les clones T_H17 spécifiques de SFB sont $FOXP3^+$ (Figure 41C). Nous avons ensuite caractérisé de façon plus approfondie les clones Treg/ T_H17 spécifiques de SFB. En accord avec l'expression de FOXP3, les clones T_H17 , mais pas les clones T_H1 ou les clones contrôles, expriment des niveaux élevés de CTLA-4 (Figure 42A). L'absence d'expression d'Helios, associé aux Treg naturels qui ne produisent pas de l'IL-17[144], dans ces

mêmes clones (Figure 42B) est compatible avec leur capacité à produire de l'IL-17. Finalement, nous avons mesuré les niveaux d'expression des ARNm de l'*IL4I1* et son expression spécifique dans les clones T_H17 (Figure 42C) renforce les données d'expression d'Helios et suggèrent donc fortement qu'il s'agit en fait de cellules Treg induites qui n'expriment pas Helios et qui produisent de l'IL-17.

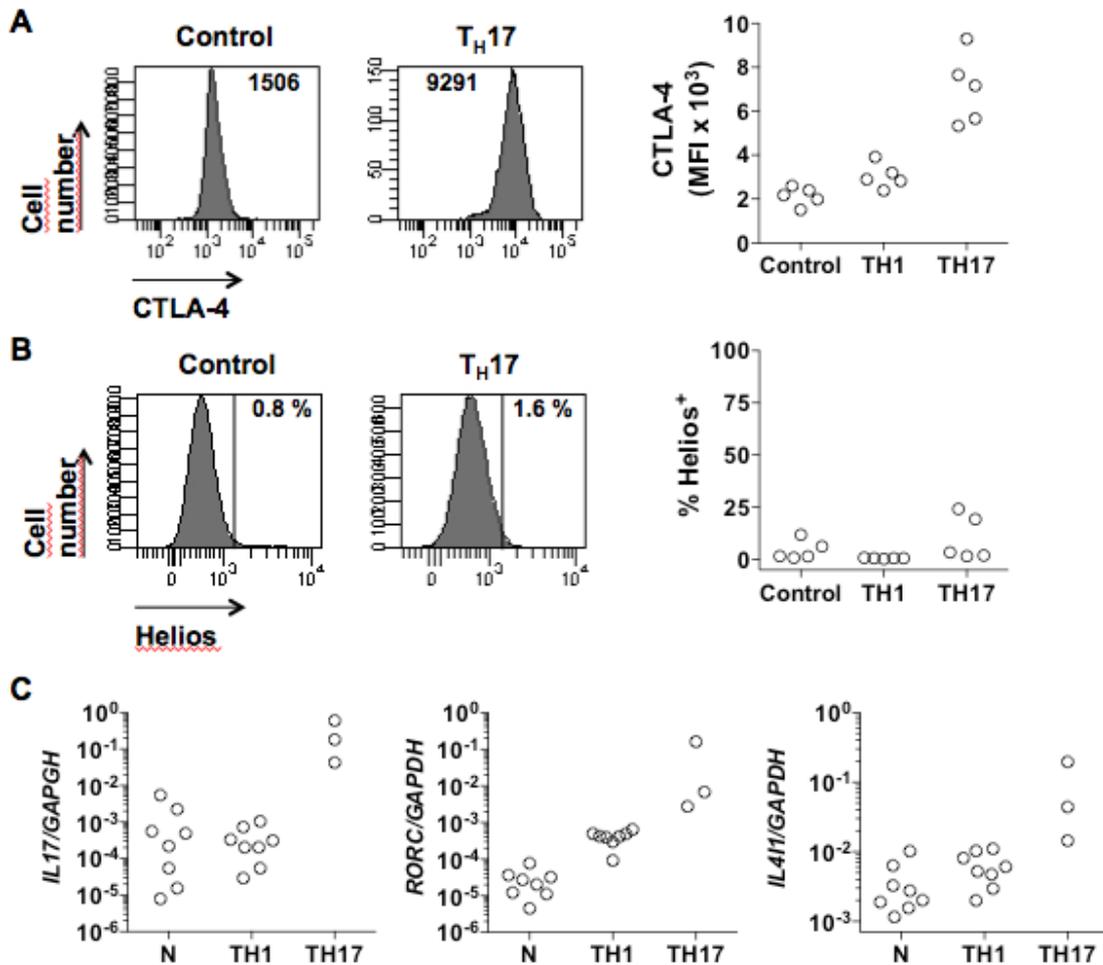


Figure 42. Caractérisation des clones Treg/ T_H17 spécifiques de SFB. A-B) Les clones T_H1 et T_H17 spécifiques de SFB ainsi que les clones naïfs contrôles ont été stimulés en présence de PMA/ionomycine et l'expression de CTLA-4 et de Helios a été mesurée par marquage intracellulaire/intranucléaire et analysée par cytométrie en flux. C) Après stimulation par PMA/ionomycine, les niveaux d'expression des ARNm *IL17*, *RORC* et *IL4I1* ont été mesurés par PCR quantitative.

Dans leur ensemble nos résultats montrent que la réponse T CD4 spécifique de SFB chez l'homme est composée de cellules qui produisent de l'IFN- γ , de l'IL-10 et/ou de l'IL-17 et sont en accord

avec les données obtenues dans les souris axéniques colonisées par les SFB[329]. De plus, les cellules spécifiques IL-10⁺IL-17⁺RORγt⁺FOXP3⁺Helios⁻ que nous avons identifiées partagent plusieurs des caractéristiques des cellules Treg qui se développent dans l'intestin en réponse au microbiote[410].

Evaluation des réponses lymphocytaires T CD4 spécifiques de SFB49 chez les patients atteints de maladies autoimmunes

Des données suggérant que le microbiote intestinal pourrait jouer un rôle dans les maladies autoimmunes chez l'homme commencent à s'annoncer dans la littérature[348,438]. Ces données sont appuyées par d'autres obtenues dans des modèles murins. Les SFB en particuliers ont été impliqués dans le développement de l'arthrite expérimentale dans le modèle de souris K/BxN[335]. Afin d'investiguer l'implication potentielle des SFB dans les maladies autoimmunes chez l'homme nous avons évalué les réponses spécifiques de la protéine SFB49 dans deux groupes de patients atteints soit de polyarthrite rhumatoïde (RA, rheumatoid arthritis) soit de spondylarthrite (AS, ankylosing spondylitis) ou d'arthrite psoriasique (PsA, psoriatic arthritis), ces deux dernières maladies étant génétiquement (lien à HLA-B27) et cliniquement liées. Comme les quantités de matériel biologique de patients sont limitées et afin d'avoir un contrôle interne dans cette série d'expériences, nous avons inclus un nombre équivalent de donneurs sains et nous avons, dans ce cas, stimulé un nombre moins important ($1 \text{ à } 3 \times 10^6$) de lymphocytes T CD4 avec le pool de peptides SFB49. Dans ces conditions, aucune réponse anti-SFB n'était détectable chez les donneurs sains (Fig. 43A). Ce résultat indique que la fréquence de lymphocytes spécifiques circulants est basse et nécessite un nombre plus important de précurseurs CD4 lors de la stimulation afin de la mettre en évidence (Fig. 37). Dans ces mêmes conditions, en revanche, les réponses anti-SFB49 sont détectables dans les échantillons de sang circulant de patients atteints de RA (6 patients sur 9 testés) (Fig. 43A) suggérant que la fréquence de lymphocytes T CD4 spécifiques de SFB est plus élevée chez ces patients. Cette différence ne semble pas être due à une activation globale de la réponse T CD4 chez ces patients puisqu'une stimulation non spécifique (PMA/ionomycine) des cultures ne met pas en évidence des différences dans les pourcentages de cellules cytokines⁺ entre les différents groupes (Fig. 43B). Le nombre de répondeurs est plus faible parmi les patients atteints d'AS ou de PsA (2 patients sur 11 testés) (Fig. 43A). Aucune réponse significative IL-17 ou IL-10 n'a été détectée dans les trois groupes. L'analyse de la réponse IL-10

par le teste de sécrétion-capture décrit ci-dessus a permis de mettre en évidence une réponse IL-10 dans une fraction des patients RA répondeurs (données non montrées).

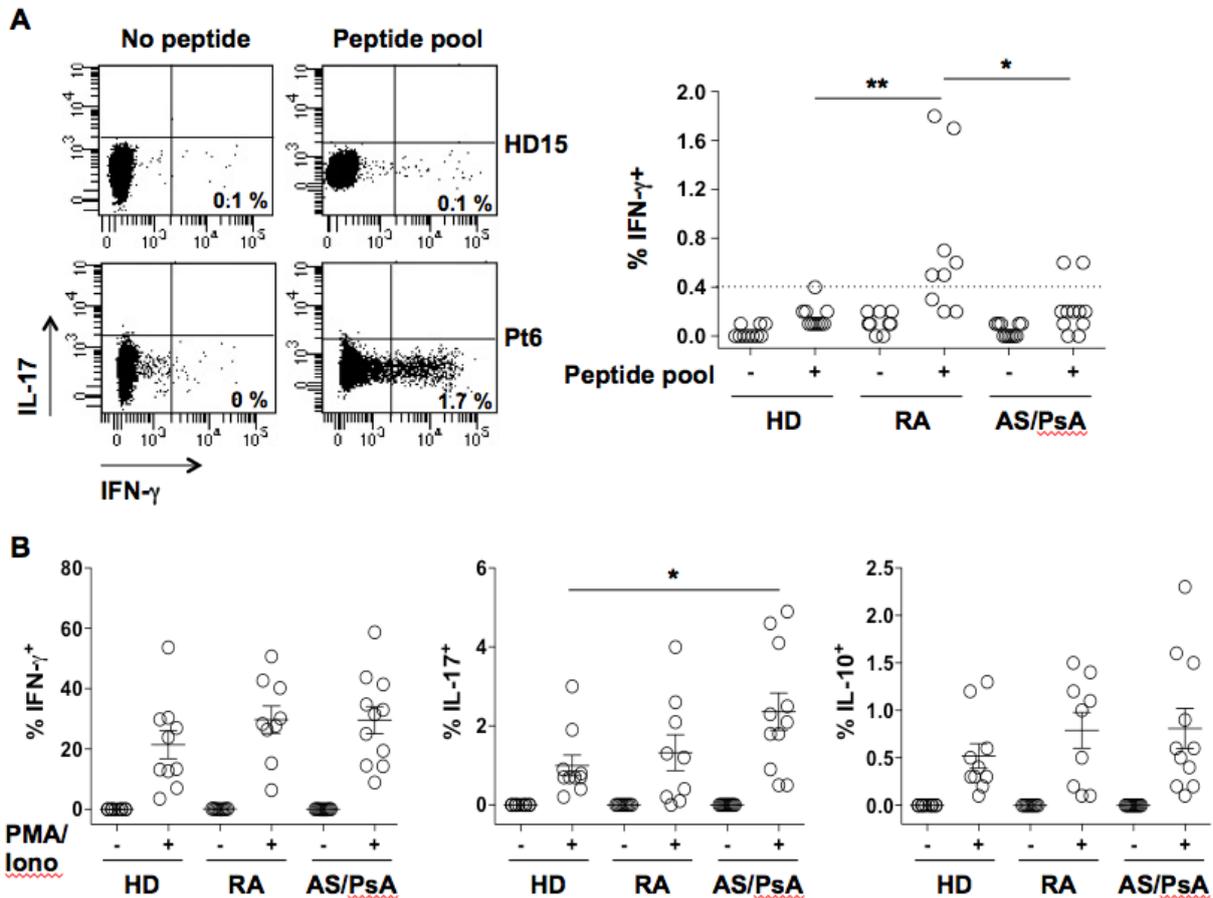


Figure 43. Évaluation des réponses T CD4 spécifiques de SFB chez les patients atteints de maladies autoimmunes. Les lymphocytes T CD4 de 9 patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (RA), de 11 patients atteints de spondylarthrite (AS) ou de rhumatisme psoriasique (PsA) et de 10 donneurs sains ont été stimulés in vitro pendant 12 jours en présence du pool de peptides SFB49 en présence de la fraction CD4⁺ irradiée. A) Les cultures ont été stimulées en absence et en présence du pool à J12 et la fréquence de cellules produisant de l'IFN- γ , de l'IL-10 et de l'IL-17 a été déterminée par marquage intracellulaire et analyse par cytométrie en flux. Des exemples de cytogrammes montrant le marquage IFN- γ et IL-17 pour un patient atteint de RA et un donneur sain sont montrés et les données obtenues pour l'ensemble des donneurs en terme de pourcentage de cellules IFN- γ ⁺ sont résumées. Les cultures ont été stimulées en absence ou en présence de PMA/ionomycine et analysées comme dans la partie A ci-dessus. Les données obtenues pour l'ensemble des donneurs en terme de pourcentage de cellules IFN- γ ⁺, IL-17⁺ et IL-10⁺ sont résumées. Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le test de Mann-Whitney. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

Des analyses statistiques par le test exact de Fisher montre que le pourcentage de répondeurs est statistiquement différent entre le groupe de patients atteints de RA par rapport à celui de donneurs sains ($p = 0,003$). Le pourcentage de répondeurs dans le groupe de patients atteints de PsA ou d'AS n'est pas statistiquement différent de celui des donneurs ($p = 0,47$). Cependant, la différence entre le groupe de patients atteint de RA et celui des patients PsA et AS, même si elle est fortement suggérée, n'est pas statistiquement significative ($p = 0,06$). Cela est très probablement dû au petit nombre d'individus dans chaque groupe. La taille de l'échantillon a également empêché l'analyse des corrélations possibles entre la détection d'une réponse anti-SFB et les paramètres cliniques des patients atteints de RA. Dans leur ensemble cependant, nos résultats suggèrent un rôle probable de la réponse anti-SFB dans la RA et l'élargissement de ces analyses à une plus grande cohorte sera nécessaire afin d'une part de confirmer ces premières données et, de l'autre, d'établir les corrélations avec les paramètres cliniques dans le but de comprendre le rôle de ces réponses dans le déroulement de la maladie.

V. 2. c. Matériels et méthodes

Echantillons de donneurs sains et de patients et préparation des populations cellulaires

Les échantillons de sang périphérique de donneurs sains ont été obtenus de l'Etablissement Français du Sang (EFS, Creteil) sous forme de résidus de cytophérèse ou de sang prélevé dans sur héparine. Les échantillons sanguins de patients atteints de maladies autoimmunes, prélevés sur héparine, ont été obtenus du Service de Rhumatologie des Hôpitaux Universitaires Paris-Sud après signature d'un consentement éclairé par le patient selon un protocole approuvé par le comité de protection des personnes. Les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC, peripheral blood mononuclear cell) ont été séparées par centrifugation dans un gradient de densité (LSM 1077). Les lymphocytes T CD4 ont été séparés des PBMC *ex vivo* par tri magnétique (Miltenyi Biotec). Le tri de sous-populations de lymphocytes T CD4 *ex vivo* a été réalisé par cytométrie en flux (FACSAria III, BD Biosciences) après marquage des cellules avec des anticorps monoclonaux (AcM) (BD Biosciences) spécifiques de CD4, CD45RA, CCR7 et, quand cela est indiqué, CCR6. Les populations triées ont été ré-analysées par cytométrie en flux et leur pureté était > 98%.

Stimulation antigénique in vitro et analyse des réponses T CD4

Les lymphocytes T CD4 triés ex vivo à partir des PBMC obtenues des résidus de cytophérèse (10^7 cellules) ou des prélèvements sanguins (10 ml de sang; 1 à 3×10^6 cellules) ont été stimulés avec le pool de peptides SFB49 (Tableau 1; Peptide 2.0 Inc.) ($1 \mu\text{M}$ de chaque peptide dans le pool) en présence de la fraction CD4⁻ (ration 1 CD4⁺: 2 CD4⁻) irradiée (35 Gray). Les cultures ont été maintenues en présence d'IL-2 humaine recombinantes (Novartis Pharma S.a.S, 50 UI/ml). A jour 12, une fraction des cultures a été stimulée en absence ou en présence du pool de peptides pendant 4 heures à 37°C. Une heure après le début de l'incubation la bréfeldine A était ajoutée (Sigma aldrich, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). A la fin de l'incubation un marquage membranaire était réalisé avec un AcM anti-CD4, les cellules étaient ensuite fixées (eBioscience, Inc.) et un marquage intracellulaire était réalisé avec des AcM anti-IFN- γ (BD Biosciences), IL-10 et IL-17. Les cellules marquées étaient par la suite analysées par cytométrie de flux (LSRFortessa BD Biosciences). Dans certaines expériences les cultures étaient stimulées en absence ou en présence de PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate; Sigma Aldrich; 100 ng/ml) et d'ionomycine (Sigma Aldrich; 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), marquées et analysées comme détaillé ci-dessus. Une partie des cultures des donneurs répondeurs a été divisée en 29 fractions afin des tester la réactivité aux peptides SFB 49 individuels. Après incubation pendant 24 heures en absence de peptides, en présence du pool de peptides ou en présence des peptides individuels, la concentration d'IFN- γ sécrétée dans le surnageant des cultures était mesurée par ELISA (Life Technologies).

Séparation des cellules spécifiques et obtention des populations clonales

Les cultures de donneurs répondeurs ont été stimulées en absence ou en présence du pool de peptides SFB49 pendant 3 heures à 37°C et les cellules produisant des cytokines ont été marquées en utilisant le protocole de sécrétion-capture (Miltenyi Biotec; IFN- γ /IL-10/IL-17 Secretion Assay-Detection kit). Brièvement, les cellules ont été marquées avec l'anticorps bispécifique anti-CD45/anti-cytokine d'intérêt à 4°C. Une incubation pendant 45 minutes à 37°C dans un grand volume de milieu de culture et en rotation continue a permis ensuite la sécrétion des cytokines et leur capture par les anticorps bispécifiques. Les cellules étaient par la suite marquées à 4°C avec des AcM fluorescents anti-cytokines et des AcM anti-CD4. Les échantillons étaient analysés par cytométrie en flux (FACS Aria III) afin de tirer les cellules cytokine⁺.

Les populations spécifiques IFN- γ ⁺ et IL-10⁺ ont été clonées par dilution limite en présence de PBMC allogéniques irradiées, de PHA (Phytohémagglutinine; Sigma Aldrich; 1 μ M) et d'IL-2 (150 UI/ml). Les clones obtenus étaient amplifiés par stimulation dans les mêmes conditions toutes les 2 à 3 semaines. Des lymphocytes T CD4 naïfs triés *ex vivo* ont été clonés selon le même protocole.

Caractérisation des populations clonales

La spécificité des clones obtenus à partir des cellules cytokines⁺ a été testée par stimulation en présence d'APC autologues et en absence ou en présence du pool de peptides. La quantité de cytokines sécrétées dans le surnageant de culture a été mesurée après 2 heures par ELISA (IFN- γ , Life Technologies; IL-10, Life Technologies; IL-17 R&D).

Les clones spécifiques ainsi que les clones contrôles obtenus des lymphocytes T naïfs ont été testés en terme de production de cytokines et d'expression de facteurs de transcription, après stimulation en absence ou en présence de PMA/ionomycine, par marquage intracellulaire/intranucléaire en utilisant le Kit de marquage FOXP3 (eBioscience) et des AcM anti-IFN- γ , -IL-10 (BD Pharmingen), -IL-17, -FOXP3 (eBioscience), -Helios (Biolegend), -T-bet (eBioscience) et -ROR γ t (eBioscience). La mesure de l'expression de CTLA-4 par les clones a été réalisée par marquage intracellulaire en utilisant un AcM spécifique (BD Pharmingen).

L'expression des ARNm *RORC*, *IL17* et *IL4I1* a été mesurée par PCR quantitative. Pour cela les ARN ont été préparés à partir des populations clonales après stimulation PMA/ionomycine pendant 24 heures en utilisant le kit RNeasy Micro (Qiagen). La synthèse des ADNc a été réalisée en utilisant le kit Promega Reverse Transcription System A3500 (Promega). La PCR quantitative a été réalisée en utilisant l'essai TaqMan et les sondes spécifiques suivantes : *RORC* (Hs010761112_m1), *IL17* Hs00174383_m1, *IL4I1* (Hs00541746_m1), *GAPDH* (Hs02758991_g1) (Assays-on-Demand Gene Expression probes; Applied Biosystems). La quantité relative d'ARN a été calculée selon la formule suivante : $2^{-(Ct \text{ gène de ménage (GAPDH)} - Ct \text{ test gène test})}$.

DISCUSSION

La population Treg dans son ensemble joue des rôles essentiels dans le préservation de l'homéostasie des tissus et cela dans les conditions « steady state », en assurant la tolérance aux tissus non endommagés contribuant à maintenir leur intégrité ainsi que la tolérance au microbiote, ou au cours des réponses immunitaires par exemple contre les infections qui menacent l'intégrité des tissus de l'organisme.

Le syndrome IPEX, une maladie monogénique liée à des mutations du gène FOXP3 et qui se manifeste par de multiples signes graves d'autoimmunité, et les syndromes IPEX-like, qui sont caractérisés par les mêmes manifestations d'autoimmunité et qui sont dus à des mutations dans des gènes importants pour la fonction des Treg (ex. : CD25, STAT5b)[439], soulignent le rôle central de cette population. En dehors du cas particulier des maladies génétiques, les variations dans la fréquence et les fonctions des Treg jouent un rôle dans le développement de plusieurs pathologies. Dans le cas des cancers, l'accumulation des Treg au site tumoral participe à l'instauration et au maintien d'un microenvironnement suppresseur qui facilite l'échappement des tumeurs de la réponse immunitaire antitumorale[440]. Au contraire, des variations dans les fréquences de Treg pourraient contribuer à l'inflammation et l'immunité exacerbées dans les maladies autoimmunes[441]. De même, les Treg jouent un rôle dans la balance entre tolérance et rejet des greffes[442] et dans la maladie du greffon contre l'hôte dans le cas particulier des greffes hématopoïétiques[150]. Afin d'assurer des fonctions adaptées à ces différentes situations, des sous-populations spécialisées de Treg se sont développées. Ces sous-populations incluent les iTreg et les nTreg[443] mais également des populations de Treg qui se sont spécialisées par les récepteurs d'adressage qu'elles expriment afin de leur permettre d'agir aux sites inflammatoires où leur fonction est requises[444]. Malgré cette spécialisation, les Treg partagent des caractéristiques primordiales pour leur activité et parmi les plus importantes sont leur activité suppressive vis à vis des lymphocytes et d'autres cellules de l'immunité notamment les APC ainsi que leur anergie qui les rend dépendantes des sources exogènes d'IL-2. Les mécanismes qui leur confèrent ces caractéristiques sont dominés par la fonction de leur facteur de transcription, FOXP3, mais impliquent également des mécanismes propres à chacune des sous-populations. La connaissance de ces mécanismes est essentielle pour la compréhension du rôle des Treg dans les différentes situations notamment pathologiques et pour leur exploitation thérapeutique.

La population des cellules T CD4 pro-inflammatoires T_H17 a été identifiée d'abord dans des modèles murins d'autoimmunité dont la physiopathologie ne pouvait pas être expliquée par l'intervention d'une réponse T_H1[445]. La population est également impliquée dans les maladies

autoimmunes chez l'homme et participe à la mise en place de l'inflammation chronique dans ces maladies. Dans le cas des tumeurs, les T_H17 et l'IL-17 semblent jouer des rôles pro- ou anti-tumoraux selon le modèle expérimental ou, chez l'homme, le type de tumoral étudié[446]. Ces fonctions diverses et opposées pourraient en partie être expliquées par le rôle proangiogénique de l'IL-17 en plus de son rôle proinflammatoire. Cependant, la complexité des fonctions de T_H17 pourrait également provenir des liens entre cette population et les Treg qui ont commencé à être appréciés rapidement après l'identification des T_H17 [447]. Plus récemment les études réalisées sur le rôle des T_H17 dans l'immunité intestinale notamment en relation au microbiote ont permis d'attribuer à cette population, et dans un sens plus large aux populations cellulaires $ROR\gamma^+$, une fonction de tolérance dans ce site vis à vis du microbiote[448]. Au niveau de l'intestin en particulier, la population de Treg $ROR\gamma^+$, qui présente de caractéristiques mixtes des populations, est plus fréquente que dans d'autres sites[157] et semble jouer un rôle important dans la tolérance dans ce site. La compréhension des liens entre les T_H17 et les Treg et des mécanismes qui régulent la balance entre ces populations est un élément important pour la mise en place de stratégies thérapeutiques visant à moduler ces deux populations.

Au cours de mon travail expérimental je me suis intéressée à deux aspects différents du lien entre les Treg et les T_H17 . Le premier concerne l'enzyme immunosuppressive IL4I1 qui était identifiée comme ayant un rôle dans le contrôle de la prolifération des T_H17 et dont j'ai mis évidence l'expression dans les iTreg. Le deuxième est lié au développement des iTreg et des T_H17 en réponse au microbiote intestinal.

Expression de l'enzyme immunosuppressive IL4I1 dans les Treg mémoires induites Helios⁻ Aiolos⁺

Dans la première partie de mon travail expérimental, nous nous sommes intéressés à l'expression différentielle de l'IL4I1 dans les iTreg et les nTreg. Ce travail était basé d'une part sur les travaux précédents de l'équipe qui avaient établi le lien entre les iTreg et les T_H17 [158] et de l'autre sur un travail qui venait d'être publié et qui décrivait pour la première fois que l'IL4I1, connue jusqu'alors pour son expression dans les DC et lymphocytes B, était exprimée dans les T_H17 [88]. Dans les travaux précédents de l'équipe, le lien entre les Treg humaines et les T_H17 avait été montré en premier en étudiant la population de Treg en fonction de son état de différenciation sans prendre en compte les populations de iTreg et nTreg. Dans ces travaux il a été montré : i) que les Treg naïves se différenciaient en T_H17 in vitro en présence de TGF- β et d'IL-1 β de façon préférentielle

par rapport au lymphocytes T CD4 conventionnels naïfs[162]; ii) que la population de Treg mémoires *ex vivo* comprend une fraction de cellules ROR γ t⁺IL-17⁺[158] iii) que les Treg mémoires se convertissent en T_H17 en conditions inflammatoire et que l'IL-1 β joue un rôle important dans ce phénomène[449]. Des travaux réalisés par d'autres groupes ont corroboré ces données[159,161]. Dans une deuxième série de travaux l'équipe a analysé le rôle du récepteur de type I de l'IL-1 (IL-1RI) dans la balance entre Treg et T_H17. Ces travaux ont montré que le récepteur est exprimé préférentiellement par les Treg mémoires[427] et, de façon intéressante, l'exploitation de son expression en combinaison avec celle d'autres marqueurs de surface, a permis d'isoler des populations pures de Treg Helios⁺ et Helios⁻ [144]. Dans cette dernière étude, l'équipe a montré que les Treg IL-17⁺ sont exclusivement Helios⁻. De plus, ils ont montré que les Treg Helios⁻ expriment Aiolos, un autre membre de la famille Ikaros qui avait été impliqué dans la différenciation de iTreg et des T_H17 chez la souris[145,428].

Ce travail, ensemble avec des expériences réalisées dans l'équipe montrant l'absence des Treg Helios⁻ dans le sang de cordon ombilical[143], nous ont confortés dans l'utilisation de Helios comme marqueur permettant de distinguer les nTreg et les iTreg, au moins en conditions « steady state » dans la périphérie. C'est sur ce système expérimental que je me suis donc basée afin d'étudier l'expression de l'IL411 dans les iTreg et les nTreg.

Mon intérêt dans cette enzyme était basé sur une étude qui a montré son expression dans les T_H17 humaines et son absence dans les T_H1[88]. L'enzyme a été mise en évidence dans cette étude lors de la comparaison du profil d'expression génique des clones T_H17 et T_H1 humains dans le but d'identifier les mécanismes responsables de la capacité moins importante des clones T_H17, par rapport aux clones T_H1, à produire de l'IL-2 après stimulation par leur TCR. L'étude a montré que l'expression de l'IL411 dans les T_H17 est dépendante de ROR γ t et qu'elle résulte dans une régulation négative de l'expression de la chaîne ζ du TCR et dans une production réduite d'IL-2 et une prolifération moins importante des cellules suite à la stimulation.

Comme l'expression de ROR γ t est dépendante du TGF- β , en combinaison avec des cytokines inflammatoires[162,450], nous avons émis l'hypothèse que l'IL411 pouvait être exprimée dans les iTreg dont le développement, contrairement aux nTreg, est dépendant du TGF- β [130,451,452]. En utilisant la stratégie de tri cellulaire mise au point par l'équipe et qui permet de séparer les Treg Helios⁺ et Helios⁻, nous avons montré que l'IL411 est exprimée exclusivement par les iTreg ce qui a validé notre hypothèse de départ. Nos résultats valident la stratégie de tri mise au point par

l'équipe[144] et montrent son intérêt pour l'étude fonctionnelle des iTreg et des nTreg chez l'homme. Ces résultats consolident ceux obtenus précédemment par notre équipe et par d'autres groupes quant aux liens développementaux et fonctionnels entre les iTreg et les T_H17. L'expression de l'IL4I1 dans les iTreg est de plus compatible avec l'expression de ROR γ t par une fraction importante de cellules dans cette population, comme nous l'avons montré dans notre étude. La population de iTreg que nous avons étudiée contient une fraction importante de cellules IL-17⁺ROR γ t⁺. Cependant elle contient également des sous-populations de cellules qui produisent de l'IL-10, une fraction moins importante de cellules IFN- γ ⁺ et, finalement, une fraction de cellules qui ne produisent pas de cytokines[453,454]. Il sera important d'investiguer dans des études futures si l'IL4I1 est exprimée dans toutes ces sous-populations ou seulement dans les iTreg IL-17⁺. En l'absence de méthodes permettant de séparer facilement ces sous-populations et avec la non disponibilité d'un anticorps anti-IL4I1, il était difficile de répondre à cette question.

Comme indiqué ci-dessus, l'IL4I1 dans les T_H17 semble contribuer à leur capacité réduite à produire de l'IL-2. Les Treg, qu'elles soient naturelles ou induites, sont anergiques ; elles ne produisent donc pas d'IL-2 en réponse la stimulation par le TCR. L'anergie dans les Treg dépend de FOXP3 qui se lie au promoteur du gène codant pour l'IL-2 et qui en réprime l'expression[455]. Il est intéressant de noter que notre équipe a montré que l'expression d'Eos est plus importante dans les nTreg que dans les iTreg. Il est possible que d'autres mécanismes participent dans les iTreg et les nTreg dans le renforcement du phénotype anergique et l'IL4I1 pourrait en faire partie dans le cas des iTreg. La vérification de cette hypothèse nécessitera la modulation de l'activité de l'IL4I1 ou de son expression, par des siRNA, et l'analyse de la production d'IL-2 par les iTreg.

Une étude plus récente publiée par le même groupe qui avait mis en évidence l'expression de l'IL4I1 dans les T_H17 montre que l'IL4I1, mais pas ROR γ t directement, permet l'expression de niveaux plus élevés de la protéine Tob1 qui fait partie de la famille de protéines anti-prolifération Tob/BTG (B-cell traslocation gene) et dont l'expression limite la progression du cycle cellulaire dans les T_H17 stimulées[89] Nous avons mesuré l'expression de Tob1 par PCR quantitative et nous avons montré qu'elle était, en accord avec nos résultats d'expression de l'IL4I1, plus élevée dans les iTreg que dans les nTreg.

L'expression de l'IL4I1 dans les Treg augmente lors de leur conversion en T_H17 dans des conditions inflammatoires

L'étude de la différenciation in vitro des T_H17 à partir des Treg naïves en présence de TGF- β et de cytokines inflammatoires et en particulier l'IL-1 β , a suggéré que les Treg mémoires qui expriment l'IL1RI pouvaient représenter un intermédiaire le long d'une voie de différenciation qui mène in vivo des Treg naïves aux T_H17[162,427]. En effet, dans ces études il a été montré que le TGF- β stimule spécifiquement l'expression de l'ILRI1 dans les Treg naïves[162]. De plus, l'analyse *ex vivo* de l'expression de l'ILR1 dans les Treg mémoires a montré qu'elle était plus importante dans la population CCR7⁺ mémoire centrale[427].

Je me suis donc basée sur ces données afin d'explorer les conséquences de la conversion des Treg en T_H17 in vitro, qui pourrait en réalité faire suite à cette voie de différenciation, sur l'expression de l'IL4I1. Nos données montrent que l'expression de l'IL4I1 augmente dans les Treg lorsqu'elles sont stimulées en présence d'IL-1 β et qu'elles se convertissent en T_H17. L'augmentation de l'expression de l'IL4I1 qui accompagne la conversion pourrait représenter un mécanisme de régulation négative dont le but est de limiter le danger résultant de la conversion d'une population suppressive en une population pro-inflammatoire. Nos données suggèrent aussi que les T_H17 qui se développent par la voie de différenciation qui implique le TGF- β expriment des niveaux élevés d'IL4I1. Il est intéressant de noter que des études récentes, chez la souris, montrent que la différenciation des T_H17 peut également avoir lieu en absence de TGF- β . Selon ces études, la voie de différenciation qui implique le TGF- β , en combinaison avec l'IL-6, produit des T_H17 qui sécrètent l'IL-17 et l'IL-10. Une deuxième voie qui n'implique pas le TGF- β mais l'IL-6, l'IL-1 β et l'IL-23 conduit à la différenciation de cellules qui co-sécrètent l'IL-17 et l'IFN- γ , expriment T-bet et qui semblent jouer des rôles pathogéniques dans des modèles d'EAE[77,90]. Il serait intéressant d'évaluer si l'IL4I1 est exprimé différemment dans ces deux types de cellules T_H17.

L'expression de l'IL4I1 dans différentes populations immunitaires contribue au contrôle de l'inflammation

L'IL4I1 a été identifiée en premier comme une protéine rapidement induite dans les lymphocytes B après stimulation par l'IL-4[253,254]. Une expression encore plus importante de l'enzyme a été ensuite mise en évidence dans les cellules dendritiques. Dans ces études il a été montré que l'IL4I1

est sécrétée et qu'elle inhibe la prolifération des lymphocytes T suite à une modulation négative de l'expression la chaîne ζ du complexe TCR/CD3[257]. Il a ensuite été montré que l'inhibition des réponses adaptatives par l'IL4I1 exprimée dans les cellules de l'immunité innée (cellules dendritiques et macrophages) pouvait contribuer à l'échappement tumoral *in vivo*[270]. Les études montrant l'expression de l'IL4I1 dans les T_H17, où dans ce cas par effet autocrine, l'enzyme limite la prolifération des ces cellules pro-inflammatoires ainsi que nos résultats ajoutent des évidences quant à un rôle immunosuppresseur de cet enzyme touchant différents aspects de la réponse immunitaire (Fig. 44). Des données plus récentes complètent cet ensemble en montrant que l'IL4I1 facilite la différenciation des iTreg *in vitro* à partir de lymphocytes T CD4 naïfs[266]. La modulation de l'activité de cette enzyme est donc susceptible d'avoir un intérêt thérapeutique soit pour lever l'immunosuppression liée à son expression dans les tumeurs soit au contraire pour renforcer son activité dans les maladies impliquant une inflammation chronique.

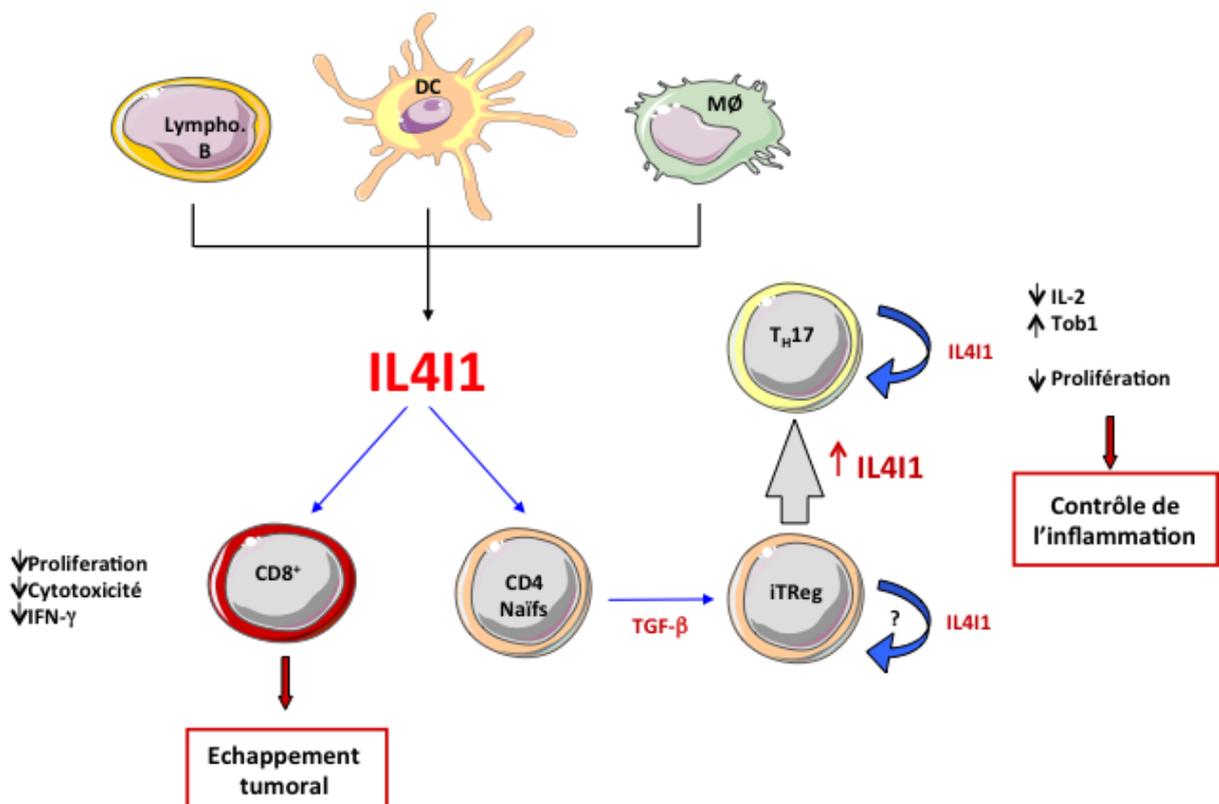


Figure 44 : Les différents rôles immunosuppresseurs de l'IL4I1.

Les réponses lymphocytaires T CD4 contre les épitopes de SFB sont détectables chez les donneurs sains

Le rôle du microbiote intestinal dans le développement des réponses immunitaires innées et adaptatives a surtout été exploré dans des modèles murins[456]. Dans ces études l'accent a en général été mis sur l'exploration du type des réponses immunitaires adaptatives modulées par le microbiote (T_H1 , T_H17 , T_R1 , Treg etc.) et des mécanismes qui régissent leur développement. Cependant, même s'il a été montré que les antigènes du microbiote pourraient être importants pour le développement optimal de ces réponses[336], peu d'études ont investigué la spécificité fine de des réponses immunitaires adaptatives spécifiques du microbiote.

Parmi les membres du microbiote intestinal, les SFB semblent, d'après les études réalisées chez la souris, jouer un rôle unique dans le développement de l'immunité intestinale[329]. En particulier en terme de réponses adaptatives, les SFB stimulent des réponses anticorps de type IgA[408] dont une partie est spécifique de la bactérie et semble donc dépendante des lymphocytes T ainsi que des réponses T CD4 en majorité IL-17⁺ mais aussi en partie IFN- γ ⁺, IL-10⁺ et FOXP3⁺[329]. Les réponses T CD4 qui se développent dans les souris colonisées par les SFB ne sont pas dans leur totalité spécifiques de la bactérie[408]. Cependant, l'oligoclonalité de ces réponses a permis le clonage des lymphocytes T spécifiques des SFB et l'analyse de leur spécificité fine[411]. Dans cette étude, les réponses T CD4 spécifiques ont permis l'identification de deux protéines immunodominantes qui semblent responsables de l'induction de la majeure partie de la réponse. Nous avons centré notre recherche d'une réponse immunitaire anti-SFB chez l'homme sur l'une de ces protéines (SFBNYU_004990, abrégé SFB49). Nos résultats montrent que des réponses spécifiques de cette protéine sont détectables dans une proportion de donneurs sains. Ces résultats sont compatibles avec des données de la littérature montrant que les mêmes protéines de certains commensaux et pathogènes sont immunogéniques à la fois chez la souris et chez l'homme. L'immunodominance à travers les espèces a été montrée dans le cas des réponses lymphocytaires T spécifiques des protéines immunodominantes de *Mycobacterium bovis* et de *Mycobacterium tuberculosis*[457] ainsi que de la pertactin P.69 de *Bordetella Pertussis*[458].

L'immunodominance des protéines est déterminée par plusieurs facteurs complexes[459]. Parmi les plus importants est la présence de séquences peptidiques ayant les motifs de liaison adéquats aux molécules du CMH ainsi que la présence des motifs permettant la génération des épitopes par la machinerie d'apprêtement de l'antigène. D'autres facteurs comme la structure

tridimensionnelle des protéines semblent également influencer les épitopes capables d'induire une réponse immunitaire[460]. Dans le cas des bactéries, il a été montré que les protéines extracellulaires (membranaires ou secrétées) sont plus à même d'induire des réponses T CD4 [461]. L'ensemble de ces facteurs conduit à réduire le nombre de protéines et de domaines immunodominants dans un microorganisme et il est probable qu'ils contribuent à la conservation de l'immunodominance, pour un microorganisme donnée, à travers plusieurs espèces hôtes. Pour certaines protéines immunogéniques, des réponses anticorps ont également été détectées dans plusieurs espèces. C'est par exemple le cas pour la flagelline CBir1 qui induit des réponses anticorps chez la souris et chez l'homme[462]. Il sera intéressant dans le cas de la protéine SFB49 de rechercher des réponses anticorps, notamment IgA, chez la souris et, si ces réponses sont détectées, de les rechercher chez les donneurs sains.

L'analyse des réponses anti-SFB49 a montré qu'une région principale de la protéine, qui contient aussi l'épitope murin, est reconnue par les lymphocytes T spécifiques de tous les donneurs testés. Cette région est celle qui contient le plus grand nombre de peptides prédits comme contenant des motifs de liaison à une ou plusieurs molécules HLA. Cette concentration des réponses immunitaires vers certains domaines de protéines a été décrite pour d'autres antigènes[463,464] et pourrait refléter une richesse en peptides capables de se lier au MHC ainsi que des propriétés facilitant son apprêtement dans les APC. De plus, l'immunodominance de certaines régions de protéine a été montrée comme étant dépendante du MHC, à savoir que les répondeurs ont en commun certains allèles HLA[465,466]. Nous avons observé, en utilisant des anticorps bloquants, que les réponses anti-SFB49 sont restreintes par HLA-DR (données non montrées). Nous sommes en train de réaliser le typage moléculaire des allèles HLA-DR exprimés par les donneurs répondeurs ou non afin d'examiner si certains allèles HLA en particulier sont associés à la réponse.

La réponse anti-SFB49 que nous avons détectée est dominée par des cellules qui produisent de l'IFN- γ ce qui apparaît en contradiction avec les réponses majoritaires T_H17 observées chez la souris [329,411]. Plusieurs éléments peuvent contribuer à expliquer cette contradiction. Les réponses anti-SFB chez la souris ont surtout été étudiées au niveau intestinal. Les lymphocytes anti-SFB49 dans la lamina propria de l'intestin grêle (SILP, small intestine lamina propria) était majoritairement de type T_H17 mais certains clones spécifiques avaient un profil T_H1 et sécrétaient de l'IFN- γ mais pas de l'IL-17[411]. Aussi, lorsque des cellules T CD4 transgéniques naïves, qui expriment un TCR spécifique d'un des épitopes de la deuxième protéine immunogénique de SFB

(SFBNYU_003340), étaient transférées à des souris colonisées par SFB, ces cellules se retrouvaient dans la SILP et exprimaient toutes ROR γ t [411], ce qui n'arrive pas lorsque les souris receveuses ne sont pas colonisées par SFB. Cependant, ces cellules se retrouvaient également dans les rates et les côlons des souris colonisées mais, dans ce cas, seulement 40% et 80% d'entre elles exprimaient ROR γ t. Ce résultat, en plus de montrer que les réponses anti-SFB à distance de l'intestin peuvent ne pas systématiquement être de type T_H17, suggère que ces réponses pourraient jouer un rôle dans l'immunité systémique et pas seulement intestinale.

Nous avons aussi montré qu'une partie des réponses anti-SFB49 est contenue dans la fraction de lymphocytes T CD4 mémoires CCR6⁺. Chez l'homme, il a été montré que les cellules T_H17 expriment CCR6[79]. Une partie des cellules T CD4 CCR6 chez l'homme expriment également CXCR3, le récepteur de chimiokine associé aux T_H1. Cette fraction contient des cellules qui co-produisent de l'IL-17 et de l'IFN- γ et d'autres qui produisent uniquement de l'IFN- γ [79]. Cette dernière population a été appelée ex-T_H17 ou T_H1* selon les auteurs et son origine est débattue. Certaines études proposent qu'il s'agit de cellules T_H17 qui se sont transdifférenciées en T_H1 sous l'effet de l'IL-12 et d'autres proposent qu'il s'agit d'une réponse bona fide T_H1 dont les conditions de priming ne sont pas encore définies[51,175]. Notre laboratoire a montré que la réponse à l'antigène de tumeurs Mage-A3 était mixte et composée de cellules T_H17 et T_H1[174]. Le suivi des clones spécifiques dans les sous-populations de lymphocytes T CD4 isolées selon l'expression de CXCR3 et CCR6 a permis de montrer qu'une partie de la réponse était primée comme T_H1 et les cellules obtenues étaient CCR6⁻CXCR3⁺. Une autre réponse initiée comme T_H17 se retrouve dans la fraction CCR6⁺CXCR3⁻, mais, de façon intéressante, les mêmes clonotypes se retrouvent dans la fraction CCR6⁺CXCR3⁺ et dans ce cas les cellules produisent de l'IFN- γ et sont à un stade plus tardif de différenciation. Sans exclure la possibilité que des réponses bona fide T_H1 CCR6⁺CXCR3⁺ existent, ces résultats montrent au niveau clonal et in vivo que les cellules T_H17 peuvent se convertir en T_H1 et dans ce cas elles expriment CCR6, comme cela pourrait être le cas pour une partie des cellules anti-SFB49 que nous avons analysées. Finalement, les résultats que nous avons obtenus avec les clones confortent le fait qu'au moins une partie des réponses anti-SFB49 que nous avons détectées sont, à l'origine, des réponses T_H17 ou Treg ROR γ t⁺ qui sont en lien avec le phénotype décrit des réponses anti-SFB chez la souris[329,410,411]. De plus, les clones anti-SFB49 de phénotype Treg/T_H17 expriment l'IL411, ce qui les inscrit dans la voie de différenciation des T_H17 qui implique le TGF- β et qui comporte un intermédiaire de différenciation commun aux iTreg et aux T_H17, comme discuté ci-dessous.

Les réponses lymphocytaires T CD4 contre les épitopes de SFB sont augmentées chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde

Plusieurs éléments nous ont incités à explorer la réponse anti-SFB chez les patients atteints de maladies autoimmunes systémiques: i) la présence des réponses mémoires que nous avons détectées chez les donneurs sains; ii) la présence de réponses anti-SFB chez la souris à des sites distants de la SILP[411]; et iii) les modèles murins d'autoimmunité qui suggèrent une participation des réponses anti-SFB dans les manifestations de la maladie[335,421,436].

Nous avons exploré ces réponses dans le sang périphérique de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (RA) et de spondylarthrite (AS) ou d'arthrite psoriasique (PsA). Les T_H17 semblent jouer un rôle important dans ces deux dernières pathologies[467] et ces pathologies sont liées, dans une partie des patients, à des manifestations d'inflammation intestinale[468]. Basé sur ces deux éléments, nous nous attendions à mettre en évidence des réponses anti-SFB dans ce groupe de patients mais nos résultats indiquent le contraire. En effet, nous avons mis en évidence une fréquence plus importante de réponses anti-SFB49 chez les patients atteints de RA mais pas chez ceux atteints d'AS ou de PsA. Un des facteurs génétiques prédisposant à la RA est l'expression de certains allèles HLA-DR[469] et il sera d'intérêt d'investiguer la restriction des réponses anti-SFB49 afin de vérifier si ces mêmes allèles corréleront avec des épitopes immunodominants. Pour cela, nous avons initié un typage moléculaire des allèles HLA-DR exprimés par tous les patients inclus dans l'étude et cette analyse est actuellement en cours.

Une étude parue très récemment montre que des réponses T CD4 de type T_H17 spécifiques de protéines dérivées de commensaux, comme les flagellines A4-fla2 et FlaX et la protéine YidX d'*E. coli*, sont détectables dans le sang périphérique de patients atteints de la maladie de Crohn[470]. Aussi, des anticorps contre la flagelline CBir1 sont détectés chez les patients atteints de cette maladie[471]. De façon intéressante, cette même protéine a été identifiée comme un antigène dominant donnant lieu à des réponses immunitaires innées et adaptatives dans un modèle murin de colite[471]. Ces résultats nous incitent à explorer les réponses sérologiques contre la protéine SFB49 chez les patients atteints de RA.

Nos données obtenues chez les patients sont préliminaires et nous sommes actuellement en train de tester un nombre plus important de patients atteints de RA. Sur cette cohorte nous allons

étudier de plus les corrélations entre la présence d'une réponse anti-SFB chez les patients et les paramètres clinico-pathologiques de la maladie.

Perspectives

L'étude que j'ai réalisée sur l'expression et le rôle de l'IL4I1 contribue à étendre la contribution de cette enzyme immunosuppressive en montrant son expression dans les Treg en plus des populations où elle avait été décrite, notamment les cellules dendritiques et les cellules T_H17. Nos résultats, ensemble avec ceux obtenus dans les autres études, suggèrent que la manipulation pharmacologique de cette enzyme pourrait avoir un intérêt thérapeutique dans des maladies impliquant les Treg et les T_H17. De plus, nos résultats ouvrent la possibilité de moduler spécifiquement les iTreg sans compromettre complètement la tolérance puisque les nTreg n'expriment pas cette enzyme. Le ciblage de cette enzyme nécessitera des études supplémentaires qui explorent toutes les conséquences de l'expression de cette enzyme dans les Treg ainsi que dans les autres cellules immunitaires.

Les résultats que nous avons obtenus en analysant la réponse immunitaire adaptative spécifique des SFB chez l'homme suggèrent fortement que ces bactéries sont en effet présentes chez l'homme et encouragent la recherche de preuves directes de leur présence dans l'intestin. Une piste qui s'ouvre avec nos données est la recherche de ces bactéries en se basant non seulement sur le gène de l'ARNr 16S mais aussi sur les gènes codant pour les protéines immunodominantes qui pourraient avoir été préservées dans les SFB colonisant différentes espèces. De façon plus générale, nos résultats encouragent la poursuite d'autres études ayant pour but d'identifier les réponses spécifiques de peptides ou de protéines définis des principaux commensaux. Les résultats obtenus dans ce type d'études ensemble avec les données obtenues par les études de génomique, qui explorent les associations entre les membres du microbiote et certaines maladies, ont le potentiel d'approfondir notre connaissance de l'interaction entre le microbiote et la réponse immunitaire chez l'homme ainsi que de la contribution de la dysbiose intestinale dans la physiopathologie de plusieurs catégories de maladies.

Bibliography

1. Kumar H, Kawai T, Akira S: **Pathogen recognition by the innate immune system.** *Int. Rev. Immunol.* 2011, **30**:16–34.
2. Medzhitov R: **Recognition of microorganisms and activation of the immune response.** *Nature* 2007, **449**:819–826.
3. Montaldo E, Vacca P, Moretta L, Mingari MC: **Development of human natural killer cells and other innate lymphoid cells.** *Semin. Immunol.* 2014, **26**:107–113.
4. Spits H, Cupedo T: **Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage relationships, and function.** *Annu. Rev. Immunol.* 2012, **30**:647–675.
5. Spits H, Artis D, Colonna M, Dieffenbach A, Di Santo JP, Eberl G, Koyasu S, Locksley RM, McKenzie ANJ, Mebius RE, et al.: **Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature.** *Nat. Rev. Immunol.* 2013, **13**:145–149.
6. Segura E, Valladeau-Guilemond J, Donnadieu M-H, Sastre-Garau X, Soumelis V, Amigorena S: **Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes.** *J. Exp. Med.* 2012, **209**:653–660.
7. Tada T, Takemori T, Okumura K, Nonaka M, Tokuhisa T: **Two distinct types of helper T cells involved in the secondary antibody response: independent and synergistic effects of I_a- and I_a⁺ helper T cells.** *J. Exp. Med.* 1978, **147**:446–458.
8. Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A: **The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting [Internet].** *Annu. Rev. Immunol.* 2013, **31**.
9. Schlitzer A, Ginhoux F: **Organization of the mouse and human DC network.** *Curr. Opin. Immunol.* 2014, **26**:90–99.
10. Swiecki M, Colonna M: **Unraveling the functions of plasmacytoid dendritic cells during viral infections, autoimmunity, and tolerance.** *Immunol. Rev.* 2010, **234**:142–162.
11. Collin M, McGovern N, Haniffa M: **Human dendritic cell subsets.** *Immunology* 2013, **140**:22–30.
12. Schlitzer A, Sivakamasundari V, Chen J, Sumatoh HRB, Schreuder J, Lum J, Malleret B, Zhang S, Larbi A, Zolezzi F, et al.: **Identification of cDC1- and cDC2-committed DC progenitors reveals early lineage priming at the common DC progenitor stage in the bone marrow.** *Nat. Immunol.* 2015, **16**:718–728.
13. Schlitzer A, McGovern N, Ginhoux F: **Dendritic cells and monocyte-derived cells: Two complementary and integrated functional systems.** *Semin. Cell Dev. Biol.* 2015, **41**:9–22.
14. León B, López-Bravo M, Ardavin C: **Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against Leishmania.** *Immunity* 2007, **26**:519–531.
15. Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P, Cremer S, Zysk M, Miltenyi S, Buck DW, Schmitz J: **BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood.** *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2000, **165**:6037–6046.
16. Klechevsky E, Morita R, Liu M, Cao Y, Coquery S, Thompson-Snipes L, Briere F, Chaussabel D, Zurawski G, Palucka AK, et al.: **Functional Specializations of Human Epidermal Langerhans Cells and CD14⁺ Dermal Dendritic Cells.** *Immunity* 2008, **29**:497–510.
17. Flajnik MF, Kasahara M: **Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures.** *Nat. Rev. Genet.* 2010, **11**:47–59.
18. Hamon MA, Quintin J: **Innate immune memory in mammals.** *Semin. Immunol.* 2016, **28**:351–358.
19. Fazilleau N, Mark L, McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG: **Follicular helper T cells: lineage and location.** *Immunity* 2009, **30**:324–335.
20. Hale JS, Ahmed R: **Memory T follicular helper CD4 T cells.** *Front. Immunol.* 2015, **6**:16.
21. Jung S, Unutmaz D, Wong P, Sano G-I, De los Santos K, Sparwasser T, Wu S, Vuthoori S, Ko K, Zavala F, et al.: **In vivo depletion of CD11c⁺ dendritic cells abrogates priming of CD8⁺ T cells by exogenous cell-associated antigens.** *Immunity* 2002, **17**:211–220.
22. Jongbloed SL, Kassianos AJ, McDonald KJ, Clark GJ, Ju X, Angel CE, Chen C-JJ, Dunbar PR, Wadley RB, Jeet V, et al.: **Human CD141⁺ (BDCA-3)⁺ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens.** *J. Exp. Med.* 2010, **207**:1247–1260.
23. del Rio M-L, Rodriguez-Barbosa J-I, Kremmer E, Förster R: **CD103⁻ and CD103⁺ bronchial lymph node dendritic cells are specialized in presenting and cross-presenting innocuous antigen to CD4⁺ and CD8⁺ T cells.** *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2007, **178**:6861–6866.

24. Desch AN, Randolph GJ, Murphy K, Gautier EL, Kedl RM, Lahoud MH, Caminschi I, Shortman K, Henson PM, Jakubzick CV: **CD103+ pulmonary dendritic cells preferentially acquire and present apoptotic cell-associated antigen.** *J. Exp. Med.* 2011, **208**:1789–1797.
25. Bedoui S, Whitney PG, Waithman J, Eidsmo L, Wakim L, Caminschi I, Allan RS, Wojtasiak M, Shortman K, Carbone FR, et al.: **Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells.** *Nat. Immunol.* 2009, **10**:488–495.
26. Voskoboinik I, Whisstock JC, Trapani JA: **Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology.** *Nat. Rev. Immunol.* 2015, **15**:388–400.
27. Holling TM, Schooten E, van Den Elsen PJ: **Function and regulation of MHC class II molecules in T-lymphocytes: of mice and men.** *Hum. Immunol.* 2004, **65**:282–290.
28. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL: **Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.** *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 1986, **136**:2348–2357.
29. Firestein GS, Roeder WD, Laxer JA, Townsend KS, Weaver CT, Hom JT, Linton J, Torbett BE, Glasebrook AL: **A new murine CD4+ T cell subset with an unrestricted cytokine profile.** *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 1989, **143**:518–525.
30. Gajewski TF, Joyce J, Fitch FW: **Antiproliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. III. Differential selection of TH1 and TH2 murine helper T lymphocyte clones using recombinant IL-2 and recombinant IFN-gamma.** *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 1989, **143**:15–22.
31. Le Gros G, Ben-Sasson SZ, Seder R, Finkelman FD, Paul WE: **Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells.** *J. Exp. Med.* 1990, **172**:921–929.
32. Zhu J, Guo L, Watson CJ, Hu-Li J, Paul WE: **Stat6 is necessary and sufficient for IL-4's role in Th2 differentiation and cell expansion.** *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2001, **166**:7276–7281.
33. Ho I-C, Tai T-S, Pai S-Y: **GATA3 and the T-cell lineage: essential functions before and after T-helper-2-cell differentiation.** *Nat. Rev. Immunol.* 2009, **9**:125–135.
34. Usui T, Preiss JC, Kanno Y, Yao ZJ, Bream JH, O'Shea JJ, Strober W: **T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription.** *J. Exp. Med.* 2006, **203**:755–766.
35. Zhu J, Yamane H, Cote-Sierra J, Guo L, Paul WE: **GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors.** *Cell Res.* 2006, **16**:3–10.
36. Zhu J, Guo L, Min B, Watson CJ, Hu-Li J, Young HA, Tsichlis PN, Paul WE: **Growth factor independent-1 induced by IL-4 regulates Th2 cell proliferation.** *Immunity* 2002, **16**:733–744.
37. Usui T, Nishikomori R, Kitani A, Strober W: **GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12Rbeta2 chain or T-bet.** *Immunity* 2003, **18**:415–428.
38. Zhu J, Yamane H, Paul WE: **Differentiation of effector CD4 T cell populations (*).** *Annu. Rev. Immunol.* 2010, **28**:445–489.
39. Jankovic D, Kullberg MC, Noben-Trauth N, Caspar P, Paul WE, Sher A: **Single cell analysis reveals that IL-4 receptor/Stat6 signaling is not required for the in vivo or in vitro development of CD4+ lymphocytes with a Th2 cytokine profile.** *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2000, **164**:3047–3055.
40. van Panhuys N, Klauschen F, Germain RN: **T-cell-receptor-dependent signal intensity dominantly controls CD4(+) T cell polarization In Vivo.** *Immunity* 2014, **41**:63–74.
41. Sokol CL, Chu N-Q, Yu S, Nish SA, Laufer TM, Medzhitov R: **Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response.** *Nat. Immunol.* 2009, **10**:713–720.
42. Yoshimoto T, Paul WE: **CD4pos, NK1.1pos T cells promptly produce interleukin 4 in response to in vivo challenge with anti-CD3.** *J. Exp. Med.* 1994, **179**:1285–1295.
43. Noben-Trauth N, Hu-Li J, Paul WE: **IL-4 secreted from individual naive CD4+ T cells acts in an autocrine manner to induce Th2 differentiation.** *Eur. J. Immunol.* 2002, **32**:1428–1433.
44. Scott P: **IFN-gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis.** *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 1991, **147**:3149–3155.
45. Manetti R, Parronchi P, Giudizi MG, Piccinni MP, Maggi E, Trinchieri G, Romagnani S: **Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells.** *J. Exp. Med.* 1993, **177**:1199–1204.

46. Mullen AC, High FA, Hutchins AS, Lee HW, Villarino AV, Livingston DM, Kung AL, Cereb N, Yao TP, Yang SY, et al.: **Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection.** *Science* 2001, **292**:1907–1910.
47. Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE: **IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages.** *Annu. Rev. Immunol.* 2007, **25**:821–852.
48. Hwang ES, Szabo SJ, Schwartzberg PL, Glimcher LH: **T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3.** *Science* 2005, **307**:430–433.
49. Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP, D'Ambrosio D, Lang R, Borsatti A, Sozzani S, Allavena P, Gray PA, Mantovani A, et al.: **Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s.** *J. Exp. Med.* 1998, **187**:129–134.
50. Gerber BO, Zanni MP, Ugucioni M, Loetscher M, Mackay CR, Pichler WJ, Yawalkar N, Baggiolini M, Moser B: **Functional expression of the eotaxin receptor CCR3 in T lymphocytes co-localizing with eosinophils.** *Curr. Biol. CB* 1997, **7**:836–843.
51. Sallusto F: **Heterogeneity of Human CD4(+) T Cells Against Microbes.** *Annu. Rev. Immunol.* 2016, **34**:317–334.
52. Wang RF: **The role of MHC class II-restricted tumor antigens and CD4+ T cells in antitumor immunity.** *Trends Immunol.* 2001, **22**:269–276.
53. Suzuki Y, Orellana MA, Schreiber RD, Remington JS: **Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*.** *Science* 1988, **240**:516–518.
54. Zhu J, Paul WE: **CD4 T cells: fates, functions, and faults.** *Blood* 2008, **112**:1557–1569.
55. Constantinescu CS, Wysocka M, Hilliard B, Ventura ES, Lavi E, Trinchieri G, Rostami A: **Antibodies against IL-12 prevent superantigen-induced and spontaneous relapses of experimental autoimmune encephalomyelitis.** *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 1998, **161**:5097–5104.
56. Leonard JP, Waldburger KE, Goldman SJ: **Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against interleukin 12.** *J. Exp. Med.* 1995, **181**:381–386.
57. Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, Vega F, Yu N, Wang J, Singh K, et al.: **Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12.** *Immunity* 2000, **13**:715–725.
58. Bettelli E, Sullivan B, Szabo SJ, Sobel RA, Glimcher LH, Kuchroo VK: **Loss of T-bet, but not STAT1, prevents the development of experimental autoimmune encephalomyelitis.** *J. Exp. Med.* 2004, **200**:79–87.
59. Ferber IA, Brocke S, Taylor-Edwards C, Ridgway W, Dinisco C, Steinman L, Dalton D, Fathman CG: **Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE).** *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 1996, **156**:5–7.
60. Kageyama Y, Koide Y, Yoshida A, Uchijima M, Arai T, Miyamoto S, Ozeki T, Hiyoshi M, Kushida K, Inoue T: **Reduced susceptibility to collagen-induced arthritis in mice deficient in IFN-gamma receptor.** *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 1998, **161**:1542–1548.
61. Matthys P, Vermeire K, Mitera T, Heremans H, Huang S, Billiau A: **Anti-IL-12 antibody prevents the development and progression of collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice.** *Eur. J. Immunol.* 1998, **28**:2143–2151.
62. Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA, Sedgwick JD, Cua DJ: **Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation.** *J. Exp. Med.* 2003, **198**:1951–1957.
63. Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T, et al.: **Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain.** *Nature* 2003, **421**:744–748.
64. Aggarwal S, Ghilardi N, Xie M-H, de Sauvage FJ, Gurney AL: **Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17.** *J. Biol. Chem.* 2003, **278**:1910–1914.
65. Stritesky GL, Yeh N, Kaplan MH: **IL-23 promotes maintenance but not commitment to the Th17 lineage.** *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2008, **181**:5948–5955.
66. Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, Akimzhanov A, Kang HS, Chung Y, Ma L, Shah B, Panopoulos AD, Schluns KS, et al.: **T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma.** *Immunity* 2008, **28**:29–39.
67. Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK: **Induction and effector functions of T(H)17 cells.** *Nature* 2008, **453**:1051–1057.
68. Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jäger A, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK: **IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells.** *Nature* 2007, **448**:484–487.

69. Korn T, Mitsdoerffer M, Croxford AL, Awasthi A, Dardalhon VA, Galileos G, Vollmar P, Stritesky GL, Kaplan MH, Waisman A, et al.: **IL-6 controls Th17 immunity in vivo by inhibiting the conversion of conventional T cells into Foxp3+ regulatory T cells.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008, **105**:18460–18465.
70. Yang L, Anderson DE, Baecher-Allan C, Hastings WD, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK, Hafler DA: **IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells.** *Nature* 2008, **454**:350–352.
71. Nurieva R, Yang XO, Martinez G, Zhang Y, Panopoulos AD, Ma L, Schluns K, Tian Q, Watowich SS, Jetten AM, et al.: **Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells.** *Nature* 2007, **448**:480–483.
72. Chung Y, Chang SH, Martinez GJ, Yang XO, Nurieva R, Kang HS, Ma L, Watowich SS, Jetten AM, Tian Q, et al.: **Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling.** *Immunity* 2009, **30**:576–587.
73. Chen Q, Yang W, Gupta S, Biswas P, Smith P, Bhagat G, Pernis AB: **IRF-4-binding protein inhibits interleukin-17 and interleukin-21 production by controlling the activity of IRF-4 transcription factor.** *Immunity* 2008, **29**:899–911.
74. Romagnani S, Maggi E, Liotta F, Cosmi L, Annunziato F: **Properties and origin of human Th17 cells.** *Mol. Immunol.* 2009, **47**:3–7.
75. Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F: **Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells.** *Nat. Immunol.* 2007, **8**:942–949.
76. Classen S, Zander T, Eggle D, Chemnitz JM, Brors B, Büchmann I, Popov A, Beyer M, Eils R, Debey S, et al.: **Human resting CD4+ T cells are constitutively inhibited by TGF beta under steady-state conditions.** *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2007, **178**:6931–6940.
77. Ghoreschi K, Laurence A, Yang X-P, Tato CM, McGeachy MJ, Konkel JE, Ramos HL, Wei L, Davidson TS, Bouladoux N, et al.: **Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-β signalling.** *Nature* 2010, **467**:967–971.
78. Zielinski CE, Mele F, Aschenbrenner D, Jarrossay D, Ronchi F, Gattorno M, Monticelli S, Lanzavecchia A, Sallusto F: **Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN-γ or IL-10 and are regulated by IL-1β.** *Nature* 2012, **484**:514–518.
79. Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, Lanzavecchia A, Sallusto F, Napolitani G: **Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells.** *Nat. Immunol.* 2007, **8**:639–646.
80. Yamazaki T, Yang XO, Chung Y, Fukunaga A, Nurieva R, Pappu B, Martin-Orozco N, Kang HS, Ma L, Panopoulos AD, et al.: **CCR6 regulates the migration of inflammatory and regulatory T cells.** *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2008, **181**:8391–8401.
81. Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Schwarzenberger P, Oliver P, Huang W, Zhang P, Zhang J, et al.: **Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXCL chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense.** *J. Exp. Med.* 2001, **194**:519–527.
82. Conti HR, Shen F, Nayyar N, Stocum E, Sun JN, Lindemann MJ, Ho AW, Hai JH, Yu JJ, Jung JW, et al.: **Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis.** *J. Exp. Med.* 2009, **206**:299–311.
83. Happel KI, Dubin PJ, Zheng M, Ghilardi N, Lockhart C, Quinton LJ, Odden AR, Shellito JE, Bagby GJ, Nelson S, et al.: **Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*.** *J. Exp. Med.* 2005, **202**:761–769.
84. Puel A, Cypowyj S, Maródi L, Abel L, Picard C, Casanova J-L: **Inborn errors of human IL-17 immunity underlie chronic mucocutaneous candidiasis.** *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2012, **12**:616–622.
85. Müller A, Lamprecht P: **[Interleukin-17 in chronic inflammatory and autoimmune diseases: rheumatoid arthritis, Crohn's disease and Wegener's granulomatosis].** *Z. Für Rheumatol.* 2008, **67**:72–74.
86. Wong CK, Ho CY, Li EK, Lam CW: **Elevation of proinflammatory cytokine (IL-18, IL-17, IL-12) and Th2 cytokine (IL-4) concentrations in patients with systemic lupus erythematosus.** *Lupus* 2000, **9**:589–593.
87. Nguyen CQ, Hu MH, Li Y, Stewart C, Peck AB: **Salivary gland tissue expression of interleukin-23 and interleukin-17 in Sjögren's syndrome: findings in humans and mice.** *Arthritis Rheum.* 2008, **58**:734–743.
88. Santarlasci V, Maggi L, Capone M, Querci V, Beltrame L, Cavalieri D, D'Aiuto E, Cimaz R, Nebbioso A, Liotta F, et al.: **Rarity of human T helper 17 cells is due to retinoic acid orphan receptor-dependent mechanisms that limit their expansion.** *Immunity* 2012, **36**:201–214.
89. Santarlasci V, Maggi L, Mazzoni A, Capone M, Querci V, Rossi MC, Beltrame L, Cavalieri D, De Palma R, Liotta F, et al.: **IL-4-induced gene 1 maintains high Tob1 expression that contributes to TCR unresponsiveness in human T helper 17 cells.** *Eur. J. Immunol.* 2014, **44**:654–661.
90. Wang C, Yosef N, Gaublotte J, Wu C, Lee Y, Clish CB, Kaminski J, Xiao S, Meyer Zu Horste G, Pawlak M, et al.: **CD5L/AIM Regulates Lipid Biosynthesis and Restrains Th17 Cell Pathogenicity.** *Cell* 2015, **163**:1413–1427.

91. Nishizuka Y, Sakakura T: **Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice.** *Science* 1969, **166**:753–755.
92. Bonomo A, Kehn PJ, Payer E, Rizzo L, Cheever AW, Shevach EM: **Pathogenesis of post-thymectomy autoimmunity. Role of syngeneic MLR-reactive T cells.** *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 1995, **154**:6602–6611.
93. Sakaguchi S, Takahashi T, Nishizuka Y: **Study on cellular events in postthymectomy autoimmune oophoritis in mice. I. Requirement of Lyt-1 effector cells for oocytes damage after adoptive transfer.** *J. Exp. Med.* 1982, **156**:1565–1576.
94. Asano M, Toda M, Sakaguchi N, Sakaguchi S: **Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation.** *J. Exp. Med.* 1996, **184**:387–396.
95. Gershon RK, Kondo K: **Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes.** *Immunology* 1970, **18**:723–737.
96. Gershon RK, Cohen P, Hencin R, Lieberhaber SA: **Suppressor T cells.** *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 1972, **108**:586–590.
97. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M: **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. Baltim. Md 1950* 1995, **155**:1151–1164.
98. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, Kuniyasu Y, Nomura T, Toda M, Takahashi T: **Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance.** *Immunol. Rev.* 2001, **182**:18–32.
99. Toms C, Powrie F: **Control of intestinal inflammation by regulatory T cells.** *Microbes Infect. Inst. Pasteur* 2001, **3**:929–935.
100. Somerset DA, Zheng Y, Kilby MD, Sansom DM, Drayson MT: **Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset.** *Immunology* 2004, **112**:38–43.
101. Baecher-Allan C, Viglietta V, Hafler DA: **Human CD4+CD25+ regulatory T cells.** *Semin. Immunol.* 2004, **16**:89–98.
102. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY: **Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells.** *Nat. Immunol.* 2003, **4**:330–336.
103. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepfer B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F: **Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf1, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse.** *Nat. Genet.* 2001, **27**:68–73.
104. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, Ochs HD: **The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3.** *Nat. Genet.* 2001, **27**:20–21.
105. Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, Casanova JL, Buist N, Levy-Lahad E, Mazzella M, Goulet O, Perroni L, et al.: **X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy.** *Nat. Genet.* 2001, **27**:18–20.
106. Walker MR, Kasprowitz DJ, Gersuk VH, Benard A, Van Landeghen M, Buckner JH, Ziegler SF: **Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells.** *J. Clin. Invest.* 2003, **112**:1437–1443.
107. Allan SE, Crome SQ, Crellin NK, Passerini L, Steiner TS, Bacchetta R, Roncarolo MG, Levings MK: **Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production.** *Int. Immunol.* 2007, **19**:345–354.
108. Tran DQ, Ramsey H, Shevach EM: **Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype.** *Blood* 2007, **110**:2983–2990.
109. Floess S, Freyer J, Siewert C, Baron U, Olek S, Polansky J, Schlawe K, Chang H-D, Bopp T, Schmitt E, et al.: **Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells.** *PLoS Biol.* 2007, **5**:e38.
110. Baron U, Floess S, Wiczorek G, Baumann K, Grützkau A, Dong J, Thiel A, Boeld TJ, Hoffmann P, Edinger M, et al.: **DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells.** *Eur. J. Immunol.* 2007, **37**:2378–2389.
111. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, et al.: **CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells.** *J. Exp. Med.* 2006, **203**:1701–1711.
112. Shevach EM: **Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression.** *Immunity* 2009, **30**:636–645.

113. Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ: **CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells.** *Nat. Immunol.* 2007, **8**:1353–1362.
114. Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP, Ley TJ: **Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death.** *Immunity* 2004, **21**:589–601.
115. Gondek DC, Lu L-F, Quezada SA, Sakaguchi S, Noelle RJ: **Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism.** *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2005, **174**:1783–1786.
116. Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T: **Regulatory T cells: how do they suppress immune responses?** *Int. Immunol.* 2009, **21**:1105–1111.
117. Chaturvedi V, Collison LW, Guy CS, Workman CJ, Vignali DAA: **Retraction. Human regulatory T cells require IL-35 to mediate suppression and infectious tolerance.** *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2013, **191**:2018.
118. Bardel E, Larousserie F, Charlot-Rabiega P, Coulomb-L'Herminé A, Devergne O: **Human CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells do not constitutively express IL-35.** *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2008, **181**:6898–6905.
119. Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, Höpner S, Centonze D, Bernardi G, Dell'Acqua ML, et al.: **Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression.** *Blood* 2007, **110**:1225–1232.
120. Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, Attridge K, Manzotti C, Schmidt EM, Baker J, Jeffery LE, Kaur S, Briggs Z, et al.: **Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4.** *Science* 2011, **332**:600–603.
121. Grohmann U, Orabona C, Fallarino F, Vacca C, Calcinaro F, Falorni A, Candeloro P, Belladonna ML, Bianchi R, Fioretti MC, et al.: **CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo.** *Nat. Immunol.* 2002, **3**:1097–1101.
122. Wing K, Sakaguchi S: **Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity.** *Nat. Immunol.* 2010, **11**:7–13.
123. Piccirillo CA, Shevach EM: **Naturally-occurring CD4+CD25+ immunoregulatory T cells: central players in the arena of peripheral tolerance.** *Semin. Immunol.* 2004, **16**:81–88.
124. Lee H-M, Bautista JL, Hsieh C-S: **Thymic and peripheral differentiation of regulatory T cells.** *Adv. Immunol.* 2011, **112**:25–71.
125. Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ: **Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor?** *Immunity* 2009, **30**:626–635.
126. Lathrop SK, Bloom SM, Rao SM, Nutsch K, Lio C-W, Santacruz N, Peterson DA, Stappenbeck TS, Hsieh C-S: **Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota.** *Nature* 2011, **478**:250–254.
127. Lio C-WJ, Hsieh C-S: **Becoming self-aware: the thymic education of regulatory T cells.** *Curr. Opin. Immunol.* 2011, **23**:213–219.
128. Lio C-WJ, Hsieh C-S: **A two-step process for thymic regulatory T cell development.** *Immunity* 2008, **28**:100–111.
129. Sauer S, Bruno L, Hertweck A, Finlay D, Leleu M, Spivakov M, Knight ZA, Cobb BS, Cantrell D, O'Connor E, et al.: **T cell receptor signaling controls Foxp3 expression via PI3K, Akt, and mTOR.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008, **105**:7797–7802.
130. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei K-J, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM: **Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3.** *J. Exp. Med.* 2003, **198**:1875–1886.
131. Coombes JL, Siddiqui KRR, Arancibia-Cárcamo CV, Hall J, Sun C-M, Belkaid Y, Powrie F: **A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism.** *J. Exp. Med.* 2007, **204**:1757–1764.
132. Bilate AM, Lafaille JJ: **Induced CD4+Foxp3+ regulatory T cells in immune tolerance.** *Annu. Rev. Immunol.* 2012, **30**:733–758.
133. Zheng Y, Josefowicz S, Chaudhry A, Peng XP, Forbush K, Rudensky AY: **Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate.** *Nature* 2010, **463**:808–812.
134. Samstein RM, Josefowicz SZ, Arvey A, Treuting PM, Rudensky AY: **Extrathymic generation of regulatory T cells in placental mammals mitigates maternal-fetal conflict.** *Cell* 2012, **150**:29–38.
135. Cebula A, Seweryn M, Rempala GA, Pabla SS, McIndoe RA, Denning TL, Bry L, Kraj P, Kisielow P, Ignatowicz L: **Thymus-derived regulatory T cells contribute to tolerance to commensal microbiota.** *Nature* 2013, **497**:258–262.

136. Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, Nakanishi Y, Uetake C, Kato K, Kato T, et al.: **Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells.** *Nature* 2013, **504**:446–450.
137. Arpaia N, Campbell C, Fan X, Dikiy S, van der Veeken J, deRoos P, Liu H, Cross JR, Pfeffer K, Coffey PJ, et al.: **Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation.** *Nature* 2013, **504**:451–455.
138. Weiss JM, Bilate AM, Gobert M, Ding Y, Curotto de Lafaille MA, Parkhurst CN, Xiong H, Dolpady J, Frey AB, Ruocco MG, et al.: **Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3+ T reg cells.** *J. Exp. Med.* 2012, **209**:1723–1742, S1.
139. Yadav M, Louvet C, Davini D, Gardner JM, Martinez-Llordella M, Bailey-Bucktrout S, Anthony BA, Sverdrup FM, Head R, Kuster DJ, et al.: **Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo.** *J. Exp. Med.* 2012, **209**:1713–1722, S1-19.
140. Milpied P, Renand A, Bruneau J, Mendes-da-Cruz DA, Jacquelin S, Asnafi V, Rubio M-T, MacIntyre E, Lepelletier Y, Hermine O: **Neuropilin-1 is not a marker of human Foxp3+ Treg.** *Eur. J. Immunol.* 2009, **39**:1466–1471.
141. Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, Wohlfert EA, Murray PE, Belkaid Y, Shevach EM: **Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells.** *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2010, **184**:3433–3441.
142. Gottschalk RA, Corse E, Allison JP: **Expression of Helios in peripherally induced Foxp3+ regulatory T cells.** *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2012, **188**:976–980.
143. Ayyoub M, Raffin C, Valmori D: **Comment on “helios+ and helios- cells coexist within the natural FOXP3+ T regulatory cell subset in humans.”** *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2013, **190**:4439–4440.
144. Raffin C, Pignon P, Celse C, Debien E, Valmori D, Ayyoub M: **Human memory Helios- FOXP3+ regulatory T cells (Tregs) encompass induced Tregs that express Aiolos and respond to IL-1 β by downregulating their suppressor functions.** *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2013, **191**:4619–4627.
145. Gandhi R, Kumar D, Burns EJ, Nadeau M, Dake B, Laroni A, Kozoriz D, Weiner HL, Quintana FJ: **Activation of the aryl hydrocarbon receptor induces human type 1 regulatory T cell-like and Foxp3(+) regulatory T cells.** *Nat. Immunol.* 2010, **11**:846–853.
146. Valmori D, Merlo A, Souleimanian NE, Hesdorffer CS, Ayyoub M: **A peripheral circulating compartment of natural naive CD4 Tregs.** *J. Clin. Invest.* 2005, **115**:1953–1962.
147. Hoffmann P, Eder R, Boeld TJ, Doser K, Pisheska B, Andreesen R, Edinger M: **Only the CD45RA+ subpopulation of CD4+CD25high T cells gives rise to homogeneous regulatory T-cell lines upon in vitro expansion.** *Blood* 2006, **108**:4260–4267.
148. Seddiki N, Santner-Nanan B, Tangye SG, Alexander SI, Solomon M, Lee S, Nanan R, Fazekas de Saint Groth B: **Persistence of naive CD45RA+ regulatory T cells in adult life.** *Blood* 2006, **107**:2830–2838.
149. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, Parizot C, Taflin C, Heike T, Valeyre D, et al.: **Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor.** *Immunity* 2009, **30**:899–911.
150. Edinger M, Hoffmann P: **Regulatory T cells in stem cell transplantation: strategies and first clinical experiences.** *Curr. Opin. Immunol.* 2011, **23**:679–684.
151. Tosello V, Odunsi K, Souleimanian NE, Lele S, Shrikant P, Old LJ, Valmori D, Ayyoub M: **Differential expression of CCR7 defines two distinct subsets of human memory CD4+CD25+ Tregs.** *Clin. Immunol. Orlando Fla* 2008, **126**:291–302.
152. Himmel ME, MacDonald KG, Garcia RV, Steiner TS, Levings MK: **Helios+ and Helios- cells coexist within the natural FOXP3+ T regulatory cell subset in humans.** *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2013, **190**:2001–2008.
153. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK: **Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells.** *Nature* 2006, **441**:235–238.
154. Zhou L, Lopes JE, Chong MMW, Ivanov II, Min R, Victora GD, Shen Y, Du J, Rubtsov YP, Rudensky AY, et al.: **TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function.** *Nature* 2008, **453**:236–240.
155. Yang XO, Nurieva R, Martinez GJ, Kang HS, Chung Y, Pappu BP, Shah B, Chang SH, Schluns KS, Watowich SS, et al.: **Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs.** *Immunity* 2008, **29**:44–56.
156. Kryczek I, Wei S, Zou L, Altuwaijri S, Szeliga W, Kolls J, Chang A, Zou W: **Cutting edge: Th17 and regulatory T cell dynamics and the regulation by IL-2 in the tumor microenvironment.** *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2007, **178**:6730–6733.

157. Lochner M, Peduto L, Cherrier M, Sawa S, Langa F, Varona R, Riethmacher D, Si-Tahar M, Di Santo JP, Eberl G: **In vivo equilibrium of proinflammatory IL-17+ and regulatory IL-10+ Foxp3+ RORgamma t+ T cells.** *J. Exp. Med.* 2008, **205**:1381–1393.
158. Ayyoub M, Deknuydt F, Raimbaud I, Dousset C, Leveque L, Bioley G, Valmori D: **Human memory FOXP3+ Tregs secrete IL-17 ex vivo and constitutively express the T(H)17 lineage-specific transcription factor RORgamma t.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009, **106**:8635–8640.
159. Voo KS, Wang Y-H, Santori FR, Boggiano C, Wang Y-H, Arima K, Bover L, Hanabuchi S, Khalili J, Marinova E, et al.: **Identification of IL-17-producing FOXP3+ regulatory T cells in humans.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009, **106**:4793–4798.
160. Deknuydt F, Bioley G, Valmori D, Ayyoub M: **IL-1beta and IL-2 convert human Treg into T(H)17 cells.** *Clin. Immunol. Orlando Fla* 2009, **131**:298–307.
161. Koenen HJPM, Smeets RL, Vink PM, van Rijssen E, Boots AMH, Joosten I: **Human CD25highFoxp3pos regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells.** *Blood* 2008, **112**:2340–2352.
162. Valmori D, Raffin C, Raimbaud I, Ayyoub M: **Human RORyt+ TH17 cells preferentially differentiate from naive FOXP3+Treg in the presence of lineage-specific polarizing factors.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010, **107**:19402–19407.
163. Zorn E, Nelson EA, Mohseni M, Porcheray F, Kim H, Litsa D, Bellucci R, Raderschall E, Canning C, Soiffer RJ, et al.: **IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo.** *Blood* 2006, **108**:1571–1579.
164. Murawski MR, Litherland SA, Clare-Salzler MJ, Davoodi-Semiromi A: **Upregulation of Foxp3 expression in mouse and human Treg is IL-2/STAT5 dependent: implications for the NOD STAT5B mutation in diabetes pathogenesis.** *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006, **1079**:198–204.
165. Komatsu N, Mariotti-Ferrandiz ME, Wang Y, Malissen B, Waldmann H, Hori S: **Heterogeneity of natural Foxp3+ T cells: a committed regulatory T-cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009, **106**:1903–1908.
166. Komatsu N, Okamoto K, Sawa S, Nakashima T, Oh-hora M, Kodama T, Tanaka S, Bluestone JA, Takayanagi H: **Pathogenic conversion of Foxp3+ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis.** *Nat. Med.* 2014, **20**:62–68.
167. Dang EV, Barbi J, Yang H-Y, Jinasena D, Yu H, Zheng Y, Bordman Z, Fu J, Kim Y, Yen H-R, et al.: **Control of TH17/Treg Balance by Hypoxia-inducible Factor 1.** *Cell* 2011, **146**:772–784.
168. Shi LZ, Wang R, Huang G, Vogel P, Neale G, Green DR, Chi H: **HIF1alpha-dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells.** *J. Exp. Med.* 2011, **208**:1367–1376.
169. Gagliani N, Amezcuca Vesely MC, Iseppon A, Brockmann L, Xu H, Palm NW, de Zoete MR, Licona-Limón P, Paiva RS, Ching T, et al.: **Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation.** *Nature* 2015, **523**:221–225.
170. Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B, Parente E, Fili L, Ferri S, Frosali F, et al.: **Phenotypic and functional features of human Th17 cells.** *J. Exp. Med.* 2007, **204**:1849–1861.
171. Maggi L, Santarlasci V, Capone M, Peired A, Frosali F, Crome SQ, Querci V, Fambrini M, Liotta F, Levings MK, et al.: **CD161 is a marker of all human IL-17-producing T-cell subsets and is induced by RORC.** *Eur. J. Immunol.* 2010, **40**:2174–2181.
172. Cosmi L, De Palma R, Santarlasci V, Maggi L, Capone M, Frosali F, Rodolico G, Querci V, Abbate G, Angeli R, et al.: **Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor.** *J. Exp. Med.* 2008, **205**:1903–1916.
173. Cosmi L, Cimaz R, Maggi L, Santarlasci V, Capone M, Borriello F, Frosali F, Querci V, Simonini G, Barra G, et al.: **Evidence of the transient nature of the Th17 phenotype of CD4+CD161+ T cells in the synovial fluid of patients with juvenile idiopathic arthritis.** *Arthritis Rheum.* 2011, **63**:2504–2515.
174. Hamaï A, Pignon P, Raimbaud I, Duperrier-Amouriaux K, Senellart H, Hiret S, Douillard J-Y, Bennouna J, Ayyoub M, Valmori D: **Human T(H)17 immune cells specific for the tumor antigen MAGE-A3 convert to IFN-γ-secreting cells as they differentiate into effector T cells in vivo.** *Cancer Res.* 2012, **72**:1059–1063.
175. Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S: **Human Th1 dichotomy: origin, phenotype and biologic activities.** *Immunology* 2014, doi:10.1111/imm.12399.
176. Harbour SN, Maynard CL, Zindl CL, Schoeb TR, Weaver CT: **Th17 cells give rise to Th1 cells that are required for the pathogenesis of colitis.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2015, **112**:7061–7066.
177. Lee Y, Awasthi A, Yosef N, Quintana FJ, Xiao S, Peters A, Wu C, Kleinewietfeld M, Kunder S, Hafler DA, et al.: **Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells.** *Nat. Immunol.* 2012, **13**:991–999.

178. Gaublotte JT, Yosef N, Lee Y, Gertner RS, Yang LV, Wu C, Pandolfi PP, Mak T, Satija R, Shalek AK, et al.: **Single-Cell Genomics Unveils Critical Regulators of Th17 Cell Pathogenicity.** *Cell* 2015, **163**:1400–1412.
179. El-Behi M, Ciric B, Dai H, Yan Y, Cullimore M, Safavi F, Zhang G-X, Dittel BN, Rostami A: **The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF.** *Nat. Immunol.* 2011, **12**:568–575.
180. Codarri L, Gyölvézi G, Tosevski V, Hesske L, Fontana A, Magnenat L, Suter T, Becher B: **ROR γ t drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation.** *Nat. Immunol.* 2011, **12**:560–567.
181. Mufazalov IA, Schelmbauer C, Regen T, Kuschmann J, Wanke F, Gabriel LA, Hauptmann J, Müller W, Pinteaux E, Kurschus FC, et al.: **IL-1 signaling is critical for expansion but not generation of autoreactive GM-CSF+ Th17 cells.** *EMBO J.* 2016, doi:10.15252/embj.201694615.
182. Cao Y, Goods BA, Raddassi K, Nepom GT, Kwok WW, Love JC, Hafler DA: **Functional inflammatory profiles distinguish myelin-reactive T cells from patients with multiple sclerosis.** *Sci. Transl. Med.* 2015, **7**:287ra74.
183. Noster R, Riedel R, Mashreghi M-F, Radbruch H, Harms L, Haftmann C, Chang H-D, Radbruch A, Zielinski CE: **IL-17 and GM-CSF expression are antagonistically regulated by human T helper cells.** *Sci. Transl. Med.* 2014, **6**:241ra80.
184. Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, Galileos G, Gao W, Sobel RA, Mitsdoerffer M, Strom TB, Elyaman W, Ho I-C, et al.: **IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells.** *Nat. Immunol.* 2008, **9**:1347–1355.
185. Veldhoen M, Uyttenhove C, van Snick J, Helmby H, Westendorf A, Buer J, Martin B, Wilhelm C, Stockinger B: **Transforming growth factor-beta “reprograms” the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset.** *Nat. Immunol.* 2008, **9**:1341–1346.
186. Chang H-C, Sehra S, Goswami R, Yao W, Yu Q, Stritesky GL, Jabeen R, McKinley C, Ahyi A-N, Han L, et al.: **The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation.** *Nat. Immunol.* 2010, **11**:527–534.
187. Duhon T, Geiger R, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F: **Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells.** *Nat. Immunol.* 2009, **10**:857–863.
188. Trifari S, Kaplan CD, Tran EH, Crellin NK, Spits H: **Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells.** *Nat. Immunol.* 2009, **10**:864–871.
189. Seo G-Y, Youn J, Kim P-H: **IL-21 ensures TGF-beta 1-induced IgA isotype expression in mouse Peyer’s patches.** *J. Leukoc. Biol.* 2009, **85**:744–750.
190. Zaretsky AG, Taylor JJ, King IL, Marshall FA, Mohrs M, Pearce EJ: **T follicular helper cells differentiate from Th2 cells in response to helminth antigens.** *J. Exp. Med.* 2009, **206**:991–999.
191. Yu D, Rao S, Tsai LM, Lee SK, He Y, Sutcliffe EL, Srivastava M, Linterman M, Zheng L, Simpson N, et al.: **The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment.** *Immunity* 2009, **31**:457–468.
192. Vieira PL, Christensen JR, Minaee S, O’Neill EJ, Barrat FJ, Boonstra A, Barthlott T, Stockinger B, Wraith DC, O’Garra A: **IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells.** *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2004, **172**:5986–5993.
193. Passerini L, Di Nunzio S, Gregori S, Gambineri E, Cecconi M, Seidel MG, Cazzola G, Perroni L, Tommasini A, Vignola S, et al.: **Functional type 1 regulatory T cells develop regardless of FOXP3 mutations in patients with IPEX syndrome.** *Eur. J. Immunol.* 2011, **41**:1120–1131.
194. Apetoh L, Quintana FJ, Pot C, Joller N, Xiao S, Kumar D, Burns EJ, Sherr DH, Weiner HL, Kuchroo VK: **The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27.** *Nat. Immunol.* 2010, **11**:854–861.
195. Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL: **Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis.** *Science* 1994, **265**:1237–1240.
196. Miller A, Lider O, Roberts AB, Sporn MB, Weiner HL: **Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both in vitro and in vivo immune responses by the release of transforming growth factor beta after antigen-specific triggering.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1992, **89**:421–425.
197. Collison LW, Chaturvedi V, Henderson AL, Giacomini PR, Guy C, Bankoti J, Finkelstein D, Forbes K, Workman CJ, Brown SA, et al.: **IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population.** *Nat. Immunol.* 2010, **11**:1093–1101.
198. Liu Y, Carlsson R, Comabella M, Wang J, Kosicki M, Carrion B, Hasan M, Wu X, Montalban X, Dziegiel MH, et al.: **FoxA1 directs the lineage and immunosuppressive properties of a novel regulatory T cell population in EAE and MS.** *Nat. Med.* 2014, **20**:272–282.

199. Tsalikis J, Croitoru DO, Philpott DJ, Girardin SE: **Nutrient sensing and metabolic stress pathways in innate immunity.** *Cell. Microbiol.* 2013, **15**:1632–1641.
200. Munn DH, Sharma MD, Baban B, Harding HP, Zhang Y, Ron D, Mellor AL: **GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase.** *Immunity* 2005, **22**:633–642.
201. Platten M, Wick W, Van den Eynde BJ: **Tryptophan catabolism in cancer: beyond IDO and tryptophan depletion.** *Cancer Res.* 2012, **72**:5435–5440.
202. Hashimoto T, Perlot T, Rehman A, Trichereau J, Ishiguro H, Paolino M, Sigl V, Hanada T, Hanada R, Lipinski S, et al.: **ACE2 links amino acid malnutrition to microbial ecology and intestinal inflammation.** *Nature* 2012, **487**:477–481.
203. Sparkes RS, Dizikes GJ, Klisak I, Grody WW, Mohandas T, Heinzmann C, Zollman S, Lusic AJ, Cederbaum SD: **The gene for human liver arginase (ARG1) is assigned to chromosome band 6q23.** *Am. J. Hum. Genet.* 1986, **39**:186–193.
204. Gotoh T, Araki M, Mori M: **Chromosomal localization of the human arginase II gene and tissue distribution of its mRNA.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997, **233**:487–491.
205. Schneider E, Dy M: **Activation of macrophages.** *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 1985, **8**:135–146.
206. Munder M, Mollinedo F, Calafat J, Canchado J, Gil-Lamaignere C, Fuentes JM, Luckner C, Doschko G, Soler G, Eichmann K, et al.: **Arginase I is constitutively expressed in human granulocytes and participates in fungicidal activity.** *Blood* 2005, **105**:2549–2556.
207. Rutschman R, Lang R, Hesse M, Ihle JN, Wynn TA, Murray PJ: **Cutting edge: Stat6-dependent substrate depletion regulates nitric oxide production.** *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2001, **166**:2173–2177.
208. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG: **Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition.** *Biochem. J.* 2001, **357**:593–615.
209. Nathan C, Xie QW: **Regulation of biosynthesis of nitric oxide.** *J. Biol. Chem.* 1994, **269**:13725–13728.
210. Bogdan C: **Nitric oxide and the immune response.** *Nat. Immunol.* 2001, **2**:907–916.
211. Bronte V, Zanovello P: **Regulation of immune responses by L-arginine metabolism.** *Nat. Rev. Immunol.* 2005, **5**:641–654.
212. Lorsbach RB, Murphy WJ, Lowenstein CJ, Snyder SH, Russell SW: **Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. Molecular basis for the synergy between interferon-gamma and lipopolysaccharide.** *J. Biol. Chem.* 1993, **268**:1908–1913.
213. Connelly L, Palacios-Callender M, Ameixa C, Moncada S, Hobbs AJ: **Biphasic regulation of NF-kappa B activity underlies the pro- and anti-inflammatory actions of nitric oxide.** *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2001, **166**:3873–3881.
214. Munder M, Schneider H, Luckner C, Giese T, Langhans C-D, Fuentes JM, Kropf P, Mueller I, Kolb A, Modolell M, et al.: **Suppression of T-cell functions by human granulocyte arginase.** *Blood* 2006, **108**:1627–1634.
215. Rodriguez PC, Zea AH, DeSalvo J, Culotta KS, Zabaleta J, Quiceno DG, Ochoa JB, Ochoa AC: **L-arginine consumption by macrophages modulates the expression of CD3 zeta chain in T lymphocytes.** *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2003, **171**:1232–1239.
216. Baniyash M: **TCR zeta-chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response.** *Nat. Rev. Immunol.* 2004, **4**:675–687.
217. Rodriguez PC, Quiceno DG, Ochoa AC: **L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression.** *Blood* 2007, **109**:1568–1573.
218. ZHANG N, DENG J, WU F, LU X, HUANG L, ZHAO M: **Expression of arginase I and inducible nitric oxide synthase in the peripheral blood and lymph nodes of HIV-positive patients.** *Mol. Med. Rep.* 2016, **13**:731–743.
219. Pernow J, Jung C: **Arginase as a potential target in the treatment of cardiovascular disease: reversal of arginine steal?** *Cardiovasc. Res.* 2013, **98**:334–343.
220. Philip R, Campbell E, Wheatley DN: **Arginine deprivation, growth inhibition and tumour cell death: 2. Enzymatic degradation of arginine in normal and malignant cell cultures.** *Br. J. Cancer* 2003, **88**:613–623.
221. Rodriguez PC, Quiceno DG, Zabaleta J, Ortiz B, Zea AH, Piazuelo MB, Delgado A, Correa P, Brayer J, Sotomayor EM, et al.: **Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses.** *Cancer Res.* 2004, **64**:5839–5849.
222. Fukumura D, Kashiwagi S, Jain RK: **The role of nitric oxide in tumour progression.** *Nat. Rev. Cancer* 2006, **6**:521–534.

223. Lahdenranta J, Hagendoorn J, Padera TP, Hoshida T, Nelson G, Kashiwagi S, Jain RK, Fukumura D: **Endothelial nitric oxide synthase mediates lymphangiogenesis and lymphatic metastasis.** *Cancer Res.* 2009, **69**:2801–2808.
224. Klotz T, Bloch W, Volberg C, Engelmann U, Addicks K: **Selective expression of inducible nitric oxide synthase in human prostate carcinoma.** *Cancer* 1998, **82**:1897–1903.
225. Xu W, Liu L, Smith GC, Charles I G: **Nitric oxide upregulates expression of DNA-PKs to protect cells from DNA-damaging anti-tumour agents.** *Nat. Cell Biol.* 2000, **2**:339–345.
226. Mocellin S, Bronte V, Nitti D: **Nitric oxide, a double edged sword in cancer biology: searching for therapeutic opportunities.** *Med. Res. Rev.* 2007, **27**:317–352.
227. Pericle F, Kirken RA, Bronte V, Sconocchia G, DaSilva L, Segal DM: **Immunocompromised tumor-bearing mice show a selective loss of STAT5a/b expression in T and B lymphocytes.** *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 1997, **159**:2580–2585.
228. Taylor MW, Feng GS: **Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism.** *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 1991, **5**:2516–2522.
229. Takikawa O, Yoshida R, Kido R, Hayaishi O: **Tryptophan degradation in mice initiated by indoleamine 2,3-dioxygenase.** *J. Biol. Chem.* 1986, **261**:3648–3653.
230. Yoshida R, Urade Y, Tokuda M, Hayaishi O: **Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase in mouse lung during virus infection.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1979, **76**:4084–4086.
231. Carlin JM, Borden EC, Sondel PM, Byrne GI: **Interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human mononuclear phagocytes.** *J. Leukoc. Biol.* 1989, **45**:29–34.
232. Bianchi M, Bertini R, Ghezzi P: **Induction of indoleamine dioxygenase by interferon in mice: a study with different recombinant interferons and various cytokines.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988, **152**:237–242.
233. Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C, Mellor AL: **Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism.** *Science* 1998, **281**:1191–1193.
234. Fallarino F, Vacca C, Orabona C, Belladonna ML, Bianchi R, Marshall B, Keskin DB, Mellor AL, Fioretti MC, Grohmann U, et al.: **Functional expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by murine CD8 alpha(+) dendritic cells.** *Int. Immunol.* 2002, **14**:65–68.
235. Yuasa HJ, Hasegawa T, Nakamura T, Suzuki T: **Bacterial expression and characterization of molluscan IDO-like myoglobin.** *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 2007, **146**:461–469.
236. Fallarino F, Grohmann U, Puccetti P: **Indoleamine 2,3-dioxygenase: from catalyst to signaling function.** *Eur. J. Immunol.* 2012, **42**:1932–1937.
237. Mezrich JD, Fechner JH, Zhang X, Johnson BP, Burlingham WJ, Bradfield CA: **An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells.** *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2010, **185**:3190–3198.
238. Opitz CA, Litzenburger UM, Sahn F, Ott M, Tritschler I, Trump S, Schumacher T, Jestaedt L, Schrenk D, Weller M, et al.: **An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor.** *Nature* 2011, **478**:197–203.
239. Orabona C, Pallotta MT, Volpi C, Fallarino F, Vacca C, Bianchi R, Belladonna ML, Fioretti MC, Grohmann U, Puccetti P: **SOCS3 drives proteasomal degradation of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and antagonizes IDO-dependent tolerogenesis.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008, **105**:20828–20833.
240. Friberg M, Jennings R, Alsarraj M, Dessureault S, Cantor A, Extermann M, Mellor AL, Munn DH, Antonia SJ: **Indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to tumor cell evasion of T cell-mediated rejection.** *Int. J. Cancer* 2002, **101**:151–155.
241. Astigiano S, Morandi B, Costa R, Mastracci L, D'Agostino A, Ratto GB, Melioli G, Frumento G: **Eosinophil granulocytes account for indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated immune escape in human non-small cell lung cancer.** *Neoplasia N. Y. N* 2005, **7**:390–396.
242. Brody JR, Costantino CL, Berger AC, Sato T, Lisanti MP, Yeo CJ, Emmons RV, Witkiewicz AK: **Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in metastatic malignant melanoma recruits regulatory T cells to avoid immune detection and affects survival.** *Cell Cycle Georget. Tex* 2009, **8**:1930–1934.
243. Uyttenhove C, Pilotte L, Théate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, Boon T, Van den Eynde BJ: **Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase.** *Nat. Med.* 2003, **9**:1269–1274.

244. Witkiewicz A, Williams TK, Cozzitorto J, Durkan B, Showalter SL, Yeo CJ, Brody JR: **Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma recruits regulatory T cells to avoid immune detection.** *J. Am. Coll. Surg.* 2008, **206**:849-854-856.
245. Nakamura T, Shima T, Saeki A, Hidaka T, Nakashima A, Takikawa O, Saito S: **Expression of indoleamine 2, 3-dioxygenase and the recruitment of Foxp3-expressing regulatory T cells in the development and progression of uterine cervical cancer.** *Cancer Sci.* 2007, **98**:874-881.
246. Sharma MD, Hou D-Y, Liu Y, Koni PA, Metz R, Chandler P, Mellor AL, He Y, Munn DH: **Indoleamine 2,3-dioxygenase controls conversion of Foxp3+ Tregs to TH17-like cells in tumor-draining lymph nodes.** *Blood* 2009, **113**:6102-6111.
247. Ponnudurai G, Chung MC, Tan NH: **Purification and properties of the L-amino acid oxidase from Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*) venom.** *Arch. Biochem. Biophys.* 1994, **313**:373-378.
248. Sakurai Y, Takatsuka H, Yoshioka A, Matsui T, Suzuki M, Titani K, Fujimura Y: **Inhibition of human platelet aggregation by L-amino acid oxidase purified from *Naja naja kaouthia* venom.** *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology* 2001, **39**:1827-1833.
249. Jung SK, Mai A, Iwamoto M, Arizono N, Fujimoto D, Sakamaki K, Yonehara S: **Purification and cloning of an apoptosis-inducing protein derived from fish infected with *Anisakis simplex*, a causative nematode of human anisakiasis.** *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2000, **165**:1491-1497.
250. Nagaoka K, Aoki F, Hayashi M, Muroi Y, Sakurai T, Itoh K, Ikawa M, Okabe M, Imakawa K, Sakai S: **L-amino acid oxidase plays a crucial role in host defense in the mammary glands.** *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 2009, **23**:2514-2520.
251. Sun Y, Nonobe E, Kobayashi Y, Kuraishi T, Aoki F, Yamamoto K, Sakai S: **Characterization and expression of L-amino acid oxidase of mouse milk.** *J. Biol. Chem.* 2002, **277**:19080-19086.
252. Raibekas AA, Massey V: **Primary structure of the snake venom L-amino acid oxidase shows high homology with the mouse B cell interleukin 4-induced Fig1 protein.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998, **248**:476-478.
253. Chu CC, Paul WE: **Fig1, an interleukin 4-induced mouse B cell gene isolated by cDNA representational difference analysis.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997, **94**:2507-2512.
254. Chavan SS, Tian W, Hsueh K, Jawaheer D, Gregersen PK, Chu CC: **Characterization of the human homolog of the IL-4 induced gene-1 (Fig1).** *Biochim. Biophys. Acta* 2002, **1576**:70-80.
255. Molinier-Frenkel V, Mestivier D, Castellano F: **Alterations of the immunosuppressive IL4I1 enzyme activity induced by naturally occurring SNP/mutations.** *Genes Immun.* 2016, **17**:148-152.
256. Wiemann S, Kolb-Kokocinski A, Poustka A: **Alternative pre-mRNA processing regulates cell-type specific expression of the IL4I1 and NUP62 genes.** *BMC Biol.* 2005, **3**:16.
257. Boulland M-L, Marquet J, Molinier-Frenkel V, Möller P, Guiter C, Lasoudris F, Copie-Bergman C, Baia M, Gaulard P, Leroy K, et al.: **Human IL4I1 is a secreted L-phenylalanine oxidase expressed by mature dendritic cells that inhibits T-lymphocyte proliferation.** *Blood* 2007, **110**:220-227.
258. Copie-Bergman C, Boulland M-L, Dehoule C, Möller P, Farcet J-P, Dyer MJS, Haïoun C, Roméo P-H, Gaulard P, Leroy K: **Interleukin 4-induced gene 1 is activated in primary mediastinal large B-cell lymphoma.** *Blood* 2003, **101**:2756-2761.
259. Kono K, Salazar-Onfray F, Petersson M, Hansson J, Masucci G, Wasserman K, Nakazawa T, Anderson P, Kiessling R: **Hydrogen peroxide secreted by tumor-derived macrophages down-modulates signal-transducing zeta molecules and inhibits tumor-specific T cell-and natural killer cell-mediated cytotoxicity.** *Eur. J. Immunol.* 1996, **26**:1308-1313.
260. Otsuji M, Kimura Y, Aoe T, Okamoto Y, Saito T: **Oxidative stress by tumor-derived macrophages suppresses the expression of CD3 zeta chain of T-cell receptor complex and antigen-specific T-cell responses.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996, **93**:13119-13124.
261. Schmielau J, Finn OJ: **Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients.** *Cancer Res.* 2001, **61**:4756-4760.
262. Takahashi A, Hanson MG, Norell HR, Havelka AM, Kono K, Malmberg K-J, Kiessling R: **Preferential cell death of CD8+ effector memory (CCR7-CD45RA-) T cells by hydrogen peroxide-induced oxidative stress.** *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2005, **174**:6080-6087.
263. Hao S, Sharp JW, Ross-Inta CM, McDaniel BJ, Anthony TG, Wek RC, Cavener DR, McGrath BC, Rudell JB, Koehnle TJ, et al.: **Uncharged tRNA and sensing of amino acid deficiency in mammalian piriform cortex.** *Science* 2005, **307**:1776-1778.
264. Maurin A-C, Jousse C, Averous J, Parry L, Bruhat A, Cherasse Y, Zeng H, Zhang Y, Harding HP, Ron D, et al.: **The GCN2 kinase biases feeding behavior to maintain amino acid homeostasis in omnivores.** *Cell Metab.* 2005, **1**:273-277.

265. Cobbold SP, Adams E, Farquhar CA, Nolan KF, Howie D, Lui KO, Fairchild PJ, Mellor AL, Ron D, Waldmann H: **Infectious tolerance via the consumption of essential amino acids and mTOR signaling.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009, **106**:12055–12060.
266. Cousin C, Aubatin A, Le Gouvello S, Apetoh L, Castellano F, Molinier-Frenkel V: **The immunosuppressive enzyme IL411 promotes FoxP3(+) regulatory T lymphocyte differentiation.** *Eur. J. Immunol.* 2015, **45**:1772–1782.
267. Guiter C, Dusanter-Fourt I, Copie-Bergman C, Boulland M-L, Le Gouvello S, Gaulard P, Leroy K, Castellano F: **Constitutive STAT6 activation in primary mediastinal large B-cell lymphoma.** *Blood* 2004, **104**:543–549.
268. Carbonnelle-Puscian A, Copie-Bergman C, Baia M, Martin-Garcia N, Allory Y, Haioun C, Crémades A, Abd-Alsamad I, Farcet J-P, Gaulard P, et al.: **The novel immunosuppressive enzyme IL411 is expressed by neoplastic cells of several B-cell lymphomas and by tumor-associated macrophages.** *Leukemia* 2009, **23**:952–960.
269. Finak G, Bertos N, Pepin F, Sadekova S, Souleimanova M, Zhao H, Chen H, Omeroglu G, Meterissian S, Omeroglu A, et al.: **Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer.** *Nat. Med.* 2008, **14**:518–527.
270. Lasoudris F, Cousin C, Prevost-Blondel A, Martin-Garcia N, Abd-Alsamad I, Ortonne N, Farcet J-P, Castellano F, Molinier-Frenkel V: **IL411: an inhibitor of the CD8⁺ antitumor T-cell response in vivo.** *Eur. J. Immunol.* 2011, **41**:1629–1638.
271. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, Knight R: **Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010, **107**:11971–11975.
272. Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB: **Gut microbiota in health and disease.** *Physiol. Rev.* 2010, **90**:859–904.
273. Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R: **The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view.** *Cell* 2012, **148**:1258–1270.
274. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, et al.: **A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing.** *Nature* 2010, **464**:59–65.
275. Human Microbiome Project Consortium: **Structure, function and diversity of the healthy human microbiome.** *Nature* 2012, **486**:207–214.
276. Sommer F, Bäckhed F: **The gut microbiota—masters of host development and physiology.** *Nat. Rev. Microbiol.* 2013, **11**:227–238.
277. Xu J, Gordon JI: **Honor thy symbionts.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003, **100**:10452–10459.
278. Sender R, Fuchs S, Milo R: **Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans.** *Cell* 2016, **164**:337–340.
279. Smith K, McCoy KD, Macpherson AJ: **Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota.** *Semin. Immunol.* 2007, **19**:59–69.
280. Shin SC, Kim S-H, You H, Kim B, Kim AC, Lee K-A, Yoon J-H, Ryu J-H, Lee W-J: **Drosophila microbiome modulates host developmental and metabolic homeostasis via insulin signaling.** *Science* 2011, **334**:670–674.
281. Wagner CL, Taylor SN, Johnson D: **Host factors in amniotic fluid and breast milk that contribute to gut maturation.** *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2008, **34**:191–204.
282. Reinhardt C, Bergentall M, Greiner TU, Schaffner F, Ostergren-Lundén G, Petersen LC, Ruf W, Bäckhed F: **Tissue factor and PAR1 promote microbiota-induced intestinal vascular remodelling.** *Nature* 2012, **483**:627–631.
283. Stappenbeck TS, Hooper LV, Gordon JI: **Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002, **99**:15451–15455.
284. Tremaroli V, Bäckhed F: **Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism.** *Nature* 2012, **489**:242–249.
285. Macfarlane S, Macfarlane GT: **Regulation of short-chain fatty acid production.** *Proc. Nutr. Soc.* 2003, **62**:67–72.
286. Falony G, Vlachou A, Verbrugghe K, De Vuyst L: **Cross-feeding between *Bifidobacterium longum* BB536 and acetate-converting, butyrate-producing colon bacteria during growth on oligofructose.** *Appl. Environ. Microbiol.* 2006, **72**:7835–7841.
287. Lefebvre P, Cariou B, Lien F, Kuipers F, Staels B: **Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation.** *Physiol. Rev.* 2009, **89**:147–191.
288. Martin F-PJ, Dumas M-E, Wang Y, Legido-Quigley C, Yap IKS, Tang H, Zirah S, Murphy GM, Cloarec O, Lindon JC, et al.: **A top-down systems biology view of microbiome-mammalian metabolic interactions in a mouse model.** *Mol. Syst. Biol.* 2007, **3**:112.

289. Lepage P, Leclerc MC, Joossens M, Mondot S, Blottière HM, Raes J, Ehrlich D, Doré J: **A metagenomic insight into our gut's microbiome.** *Gut* 2013, **62**:146–158.
290. Säemann MD, Böhmig GA, Zlabinger GJ: **Short-chain fatty acids: bacterial mediators of a balanced host-microbial relationship in the human gut.** *Wien. Klin. Wochenschr.* 2002, **114**:289–300.
291. Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ, Brummer R-J: **Review article: the role of butyrate on colonic function.** *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2008, **27**:104–119.
292. Berndt BE, Zhang M, Owyang SY, Cole TS, Wang TW, Luther J, Veniaminova NA, Merchant JL, Chen C-C, Huffnagle GB, et al.: **Butyrate increases IL-23 production by stimulated dendritic cells.** *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2012, **303**:G1384–1392.
293. Singh N, Gurav A, Sivaprakasam S, Brady E, Padia R, Shi H, Thangaraju M, Prasad PD, Manicassamy S, Munn DH, et al.: **Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis.** *Immunity* 2014, **40**:128–139.
294. Martinez-Medina M, Denizot J, Dreux N, Robin F, Billard E, Bonnet R, Darfeuille-Michaud A, Barnich N: **Western diet induces dysbiosis with increased E coli in CEABAC10 mice, alters host barrier function favouring AIEC colonisation.** *Gut* 2014, **63**:116–124.
295. Huang EY, Devkota S, Moscoso D, Chang EB, Leone VA: **The role of diet in triggering human inflammatory disorders in the modern age.** *Microbes Infect. Inst. Pasteur* 2013, **15**:765–774.
296. Pendyala S, Walker JM, Holt PR: **A high-fat diet is associated with endotoxemia that originates from the gut.** *Gastroenterology* 2012, **142**:1100–1101.e2.
297. Marlow G, Ellett S, Ferguson IR, Zhu S, Karunasinghe N, Jesuthasan AC, Han DY, Fraser AG, Ferguson LR: **Transcriptomics to study the effect of a Mediterranean-inspired diet on inflammation in Crohn's disease patients.** *Hum. Genomics* 2013, **7**:24.
298. Nord CE: **The effect of antimicrobial agents on the ecology of the human intestinal microflora.** *Vet. Microbiol.* 1993, **35**:193–197.
299. Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, Silverberg MS, Goyette P, Huett A, Green T, Kuballa P, Barmada MM, Datta LW, et al.: **Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis.** *Nat. Genet.* 2007, **39**:596–604.
300. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R: **Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis.** *Cell* 2004, **118**:229–241.
301. Tamboli CP, Neut C, Desreumaux P, Colombel JF: **Dysbiosis in inflammatory bowel disease.** *Gut* 2004, **53**:1–4.
302. Schwabe RF, Jobin C: **The microbiome and cancer.** *Nat. Rev. Cancer* 2013, **13**:800–812.
303. Louis P, Hold GL, Flint HJ: **The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer.** *Nat. Rev. Microbiol.* 2014, **12**:661–672.
304. Sobhani I, Tap J, Roudot-Thoraval F, Roperch JP, Letulle S, Langella P, Corthier G, Tran Van Nhieu J, Furet JP: **Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients.** *PLoS One* 2011, **6**:e16393.
305. Jobin C: **[Microbial dysbiosis, a new risk factor in colorectal cancer?].** *Médecine Sci. MS* 2013, **29**:582–585.
306. Blumberg R, Powrie F: **Microbiota, disease, and back to health: a metastable journey.** *Sci. Transl. Med.* 2012, **4**:137rv7.
307. Zitvogel L, Galluzzi L, Viaud S, Vétizou M, Daillère R, Merad M, Kroemer G: **Cancer and the gut microbiota: an unexpected link.** *Sci. Transl. Med.* 2015, **7**:271ps1.
308. Zhang H-L, Yu L-X, Yang W, Tang L, Lin Y, Wu H, Zhai B, Tan Y-X, Shan L, Liu Q, et al.: **Profound impact of gut homeostasis on chemically-induced pro-tumorigenic inflammation and hepatocarcinogenesis in rats.** *J. Hepatol.* 2012, **57**:803–812.
309. Johansson MEV, Phillipson M, Petersson J, Velcich A, Holm L, Hansson GC: **The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008, **105**:15064–15069.
310. Turner JR: **Intestinal mucosal barrier function in health and disease.** *Nat. Rev. Immunol.* 2009, **9**:799–809.
311. Slack E, Hapfelmeier S, Stecher B, Velykoredko Y, Stoel M, Lawson MAE, Geuking MB, Beutler B, Tedder TF, Hardt W-D, et al.: **Innate and adaptive immunity cooperate flexibly to maintain host-microbiota mutualism.** *Science* 2009, **325**:617–620.
312. Hooper LV, Macpherson AJ: **Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota.** *Nat. Rev. Immunol.* 2010, **10**:159–169.

313. Araki A, Kanai T, Ishikura T, Makita S, Uraushihara K, Iiyama R, Totsuka T, Takeda K, Akira S, Watanabe M: **MyD88-deficient mice develop severe intestinal inflammation in dextran sodium sulfate colitis.** *J. Gastroenterol.* 2005, **40**:16–23.
314. Cerutti A: **The regulation of IgA class switching.** *Nat. Rev. Immunol.* 2008, **8**:421–434.
315. Tezuka H, Abe Y, Iwata M, Takeuchi H, Ishikawa H, Matsushita M, Shiohara T, Akira S, Ohteki T: **Regulation of IgA production by naturally occurring TNF/iNOS-producing dendritic cells.** *Nature* 2007, **448**:929–933.
316. Uematsu S, Fujimoto K, Jang MH, Yang B-G, Jung Y-J, Nishiyama M, Sato S, Tsujimura T, Yamamoto M, Yokota Y, et al.: **Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5.** *Nat. Immunol.* 2008, **9**:769–776.
317. Hirota K, Turner J-E, Villa M, Duarte JH, Demengeot J, Steinmetz OM, Stockinger B: **Plasticity of Th17 cells in Peyer's patches is responsible for the induction of T cell-dependent IgA responses.** *Nat. Immunol.* 2013, **14**:372–379.
318. Honda K, Littman DR: **The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease.** *Nature* 2016, **535**:75–84.
319. Inohara N, Chamillard M, McDonald C, Nuñez G: **NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease.** *Annu. Rev. Biochem.* 2005, **74**:355–383.
320. Kobayashi KS, Chamillard M, Ogura Y, Henegariu O, Inohara N, Nuñez G, Flavell RA: **Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract.** *Science* 2005, **307**:731–734.
321. Atarashi K, Nishimura J, Shima T, Umesaki Y, Yamamoto M, Onoue M, Yagita H, Ishii N, Evans R, Honda K, et al.: **ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation.** *Nature* 2008, **455**:808–812.
322. Ivanov II, Frutos R de L, Manel N, Yoshinaga K, Rifkin DB, Sartor RB, Finlay BB, Littman DR: **Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine.** *Cell Host Microbe* 2008, **4**:337–349.
323. Hall JA, Bouladoux N, Sun CM, Wohlfert EA, Blank RB, Zhu Q, Grigg ME, Berzofsky JA, Belkaid Y: **Commensal DNA limits regulatory T cell conversion and is a natural adjuvant of intestinal immune responses.** *Immunity* 2008, **29**:637–649.
324. Kofoed EM, Vance RE: **Innate immune recognition of bacterial ligands by NAIPs determines inflammasome specificity.** *Nature* 2011, **477**:592–595.
325. Zhao Y, Yang J, Shi J, Gong Y-N, Lu Q, Xu H, Liu L, Shao F: **The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus.** *Nature* 2011, **477**:596–600.
326. Torchinsky MB, Garaude J, Martin AP, Blander JM: **Innate immune recognition of infected apoptotic cells directs T(H)17 cell differentiation.** *Nature* 2009, **458**:78–82.
327. Ivanov II, Atarashi K, Manel N, Brodie EL, Shima T, Karaoz U, Wei D, Goldfarb KC, Santee CA, Lynch SV, et al.: **Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria.** *Cell* 2009, **139**:485–498.
328. Hirota K, Duarte JH, Veldhoen M, Hornsby E, Li Y, Cua DJ, Ahlfors H, Wilhelm C, Tolaini M, Menzel U, et al.: **Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses.** *Nat. Immunol.* 2011, **12**:255–263.
329. Gaboriau-Routhiau V, Rakotobe S, Lécuyer E, Mulder I, Lan A, Bridonneau C, Rochet V, Pisi A, De Paepe M, Brandi G, et al.: **The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses.** *Immunity* 2009, **31**:677–689.
330. Yamauchi KE, Snel J: **Transmission electron microscopic demonstration of phagocytosis and intracellular processing of segmented filamentous bacteria by intestinal epithelial cells of the chick ileum.** *Infect. Immun.* 2000, **68**:6496–6504.
331. Caselli M, Holton J, Boldrini P, Vaira D, Calò G: **Morphology of segmented filamentous bacteria and their patterns of contact with the follicle-associated epithelium of the mouse terminal ileum: implications for the relationship with the immune system.** *Gut Microbes* 2010, **1**:367–372.
332. Umesaki Y, Okada Y, Matsumoto S, Imaoka A, Setoyama H: **Segmented filamentous bacteria are indigenous intestinal bacteria that activate intraepithelial lymphocytes and induce MHC class II molecules and fucosyl asialo GM1 glycolipids on the small intestinal epithelial cells in the ex-germ-free mouse.** *Microbiol. Immunol.* 1995, **39**:555–562.
333. Shima T, Fukushima K, Setoyama H, Imaoka A, Matsumoto S, Hara T, Suda K, Umesaki Y: **Differential effects of two probiotic strains with different bacteriological properties on intestinal gene expression, with special reference to indigenous bacteria.** *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2008, **52**:69–77.
334. Esplugues E, Huber S, Gagliani N, Hauser AE, Town T, Wan YY, O'Connor W, Rongvaux A, Van Rooijen N, Hagerman AM, et al.: **Control of TH17 cells occurs in the small intestine.** *Nature* 2011, **475**:514–518.

335. Wu H-J, Ivanov II, Darce J, Hattori K, Shima T, Umesaki Y, Littman DR, Benoist C, Mathis D: **Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells.** *Immunity* 2010, **32**:815–827.
336. Lochner M, Bérard M, Sawa S, Hauer S, Gaboriau-Routhiau V, Fernandez TD, Snel J, Bousso P, Cerf-Bensussan N, Eberl G: **Restricted microbiota and absence of cognate TCR antigen leads to an unbalanced generation of Th17 cells.** *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2011, **186**:1531–1537.
337. Marks BR, Nowyhed HN, Choi J-Y, Poholek AC, Odegard JM, Flavell RA, Craft J: **Thymic self-reactivity selects natural interleukin 17-producing T cells that can regulate peripheral inflammation.** *Nat. Immunol.* 2009, **10**:1125–1132.
338. Atarashi K, Tanoue T, Shima T, Imaoka A, Kuwahara T, Momose Y, Cheng G, Yamasaki S, Saito T, Ohba Y, et al.: **Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species.** *Science* 2011, **331**:337–341.
339. Sun C-M, Hall JA, Blank RB, Bouladoux N, Oukka M, Mora JR, Belkaid Y: **Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid.** *J. Exp. Med.* 2007, **204**:1775–1785.
340. Curotto de Lafaille MA, Kutchukhidze N, Shen S, Ding Y, Yee H, Lafaille JJ: **Adaptive Foxp3+ regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation.** *Immunity* 2008, **29**:114–126.
341. Geuking MB, Cahenzli J, Lawson MAE, Ng DCK, Slack E, Hapfelmeier S, McCoy KD, Macpherson AJ: **Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses.** *Immunity* 2011, **34**:794–806.
342. Round JL, Mazmanian SK: **Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010, **107**:12204–12209.
343. D'Angelo M, Billings PC, Pacifici M, Leboy PS, Kirsch T: **Authentic matrix vesicles contain active metalloproteases (MMP). a role for matrix vesicle-associated MMP-13 in activation of transforming growth factor-beta.** *J. Biol. Chem.* 2001, **276**:11347–11353.
344. Matteoli G, Mazzini E, Iliev ID, Mileti E, Fallarino F, Puccetti P, Chieppa M, Rescigno M: **Gut CD103+ dendritic cells express indoleamine 2,3-dioxygenase which influences T regulatory/T effector cell balance and oral tolerance induction.** *Gut* 2010, **59**:595–604.
345. Saito K, Pignon P, Ayyoub M, Valmori D: **Modulation of Cytokine Secretion Allows CD4 T Cells Secreting IL-10 and IL-17 to Simultaneously Participate in Maintaining Tolerance and Immunity.** *PLoS One* 2015, **10**:e0145788.
346. Chervonsky AV: **Influence of microbial environment on autoimmunity.** *Nat. Immunol.* 2010, **11**:28–35.
347. Yurkovetskiy LA, Pickard JM, Chervonsky AV: **Microbiota and autoimmunity: exploring new avenues.** *Cell Host Microbe* 2015, **17**:548–552.
348. Rosenbaum JT, Asquith MJ: **The Microbiome: a Revolution in Treatment for Rheumatic Diseases?** *Curr. Rheumatol. Rep.* 2016, **18**:62.
349. Scher JU, Littman DR, Abramson SB: **Microbiome in Inflammatory Arthritis and Human Rheumatic Diseases.** *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* 2016, **68**:35–45.
350. Markle JG, Fish EN: **Sex matters in immunity.** *Trends Immunol.* 2014, **35**:97–104.
351. Yurkovetskiy L, Burrows M, Khan AA, Graham L, Volchkov P, Becker L, Antonopoulos D, Umesaki Y, Chervonsky AV: **Gender bias in autoimmunity is influenced by microbiota.** *Immunity* 2013, **39**:400–412.
352. Yatsunenkov T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Baldassano RN, Anokhin AP, et al.: **Human gut microbiome viewed across age and geography.** *Nature* 2012, **486**:222–227.
353. Loftus EV: **Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences.** *Gastroenterology* 2004, **126**:1504–1517.
354. de Souza HSP, Fiocchi C: **Immunopathogenesis of IBD: current state of the art.** *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2016, **13**:13–27.
355. Secondulfo M, Iafusco D, Carratù R, deMagistris L, Sapone A, Generoso M, Mezzogiomo A, Sasso FC, Carteni M, De Rosa R, et al.: **Ultrastructural mucosal alterations and increased intestinal permeability in non-celiac, type I diabetic patients.** *Dig. Liver Dis. Off. J. Ital. Soc. Gastroenterol. Ital. Assoc. Study Liver* 2004, **36**:35–45.
356. Frank DN, Robertson CE, Hamm CM, Kpadeh Z, Zhang T, Chen H, Zhu W, Sartor RB, Boedeker EC, Harpaz N, et al.: **Disease phenotype and genotype are associated with shifts in intestinal-associated microbiota in inflammatory bowel diseases.** *Inflamm. Bowel Dis.* 2011, **17**:179–184.
357. Morgan XC, Tickle TL, Sokol H, Gevers D, Devaney KL, Ward DV, Reyes JA, Shah SA, LeLeiko N, Snapper SB, et al.: **Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment.** *Genome Biol.* 2012, **13**:R79.

358. Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser A-L, Barnich N, Bringer M-A, Swidsinski A, Beaugerie L, Colombel J-F: **High prevalence of adherent-invasive Escherichia coli associated with ileal mucosa in Crohn's disease.** *Gastroenterology* 2004, **127**:412–421.
359. Sokol H, Lepage P, Seksik P, Doré J, Marteau P: **Temperature gradient gel electrophoresis of fecal 16S rRNA reveals active Escherichia coli in the microbiota of patients with ulcerative colitis.** *J. Clin. Microbiol.* 2006, **44**:3172–3177.
360. Ohkusa T, Sato N, Ogihara T, Morita K, Ogawa M, Okayasu I: **Fusobacterium varium localized in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis stimulates species-specific antibody.** *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2002, **17**:849–853.
361. Ohkusa T, Yoshida T, Sato N, Watanabe S, Tajiri H, Okayasu I: **Commensal bacteria can enter colonic epithelial cells and induce proinflammatory cytokine secretion: a possible pathogenic mechanism of ulcerative colitis.** *J. Med. Microbiol.* 2009, **58**:535–545.
362. Vaarala O: **Human intestinal microbiota and type 1 diabetes.** *Curr. Diab. Rep.* 2013, **13**:601–607.
363. de Goffau MC, Fuentes S, van den Bogert B, Honkanen H, de Vos WM, Welling GW, Hyöty H, Harmsen HJM: **Aberrant gut microbiota composition at the onset of type 1 diabetes in young children.** *Diabetologia* 2014, **57**:1569–1577.
364. Murri M, Leiva I, Gomez-Zumaquero JM, Tinahones FJ, Cardona F, Soriguer F, Queipo-Ortuño MI: **Gut microbiota in children with type 1 diabetes differs from that in healthy children: a case-control study.** *BMC Med.* 2013, **11**:46.
365. Giongo A, Gano KA, Crabb DB, Mukherjee N, Novelo LL, Casella G, Drew JC, Ilonen J, Knip M, Hyöty H, et al.: **Toward defining the autoimmune microbiome for type 1 diabetes.** *ISME J.* 2011, **5**:82–91.
366. Cardwell CR, Stene LC, Joner G, Cinek O, Svensson J, Goldacre MJ, Parslow RC, Pozzilli P, Brigis G, Stoyanov D, et al.: **Caesarean section is associated with an increased risk of childhood-onset type 1 diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies.** *Diabetologia* 2008, **51**:726–735.
367. Phillips J, Gill N, Sikdar K, Penney S, Newhook LA: **History of cesarean section associated with childhood onset of T1DM in Newfoundland and Labrador, Canada.** *J. Environ. Public Health* 2012, **2012**:635097.
368. Hammer RE, Maika SD, Richardson JA, Tang JP, Taurog JD: **Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human beta 2m: an animal model of HLA-B27-associated human disorders.** *Cell* 1990, **63**:1099–1112.
369. Taurog JD, Richardson JA, Croft JT, Simmons WA, Zhou M, Fernández-Sueiro JL, Balish E, Hammer RE: **The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats.** *J. Exp. Med.* 1994, **180**:2359–2364.
370. Rath HC, Herfarth HH, Ikeda JS, Grenther WB, Hamm TE, Balish E, Taurog JD, Hammer RE, Wilson KH, Sartor RB: **Normal luminal bacteria, especially Bacteroides species, mediate chronic colitis, gastritis, and arthritis in HLA-B27/human beta2 microglobulin transgenic rats.** *J. Clin. Invest.* 1996, **98**:945–953.
371. Lin P, Bach M, Asquith M, Lee AY, Akileswaran L, Stauffer P, Davin S, Pan Y, Cambronnie ED, Dorris M, et al.: **HLA-B27 and human β 2-microglobulin affect the gut microbiota of transgenic rats.** *PLoS One* 2014, **9**:e105684.
372. Stebbings S, Munro K, Simon MA, Tannock G, Highton J, Harmsen H, Welling G, Seksik P, Dore J, Grame G, et al.: **Comparison of the faecal microflora of patients with ankylosing spondylitis and controls using molecular methods of analysis.** *Rheumatol. Oxf. Engl.* 2002, **41**:1395–1401.
373. Gibson GR, Cummings JH, Macfarlane GT: **Growth and activities of sulphate-reducing bacteria in gut contents of healthy subjects and patients with ulcerative colitis.** *FEMS Microbiol. Lett.* 1991, **86**:103–112.
374. Carter JD: **Bacterial agents in spondyloarthritis: a destiny from diversity?** *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 2010, **24**:701–714.
375. McInnes IB, Schett G: **The pathogenesis of rheumatoid arthritis.** *N. Engl. J. Med.* 2011, **365**:2205–2219.
376. Scher JU, Abramson SB: **The microbiome and rheumatoid arthritis.** *Nat. Rev. Rheumatol.* 2011, **7**:569–578.
377. Nielen MMJ, van Schaardenburg D, Reesink HW, Twisk JWR, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Gast T, Habibuw MR, Vandenbroucke JP, Dijkman BAC: **Increased levels of C-reactive protein in serum from blood donors before the onset of rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum.* 2004, **50**:2423–2427.
378. de Aquino SG, Abdollahi-Roodsaz S, Koenders MI, van de Loo FAJ, Puijnt GJM, Marijnissen RJ, Walgreen B, Helsen MM, van den Bersselaar LA, de Molon RS, et al.: **Periodontal pathogens directly promote autoimmune experimental arthritis by inducing a TLR2- and IL-1-driven Th17 response.** *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2014, **192**:4103–4111.
379. Scher JU, Ubeda C, Equinda M, Khanin R, Buischi Y, Viale A, Lipuma L, Attur M, Pillinger MH, Weissmann G, et al.: **Periodontal disease and the oral microbiota in new-onset rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum.* 2012, **64**:3083–3094.

380. Wolff B, Berger T, Frese C, Max R, Blank N, Lorenz H-M, Wolff D: **Oral status in patients with early rheumatoid arthritis: a prospective, case-control study.** *Rheumatol. Oxf. Engl.* 2014, **53**:526–531.
381. Al-Katma MK, Bissada NF, Bordeaux JM, Sue J, Askari AD: **Control of periodontal infection reduces the severity of active rheumatoid arthritis.** *J. Clin. Rheumatol. Pract. Rep. Rheum. Musculoskelet. Dis.* 2007, **13**:134–137.
382. Okada M, Kobayashi T, Ito S, Yokoyama T, Abe A, Murasawa A, Yoshie H: **Periodontal treatment decreases levels of antibodies to Porphyromonas gingivalis and citrulline in patients with rheumatoid arthritis and periodontitis.** *J. Periodontol.* 2013, **84**:e74–84.
383. Ortiz P, Bissada NF, Palomo L, Han YW, Al-Zahrani MS, Panneerselvam A, Askari A: **Periodontal therapy reduces the severity of active rheumatoid arthritis in patients treated with or without tumor necrosis factor inhibitors.** *J. Periodontol.* 2009, **80**:535–540.
384. Marchesan JT, Gerow EA, Schaff R, Taut AD, Shin S-Y, Sugai J, Brand D, Burberry A, Jorns J, Lundy SK, et al.: **Porphyromonas gingivalis oral infection exacerbates the development and severity of collagen-induced arthritis.** *Arthritis Res. Ther.* 2013, **15**:R186.
385. Vaahтовuo J, Munukka E, Korkeamäki M, Luukkainen R, Toivanen P: **Fecal microbiota in early rheumatoid arthritis.** *J. Rheumatol.* 2008, **35**:1500–1505.
386. Scher JU, Sczesnak A, Longman RS, Segata N, Ubeda C, Bielski C, Rostron T, Cerundolo V, Pamer EG, Abramson SB, et al.: **Expansion of intestinal Prevotella copri correlates with enhanced susceptibility to arthritis.** *eLife* 2013, **2**:e01202.
387. Klaasen HL, Koopman JP, Poelma FG, Beynen AC: **Intestinal, segmented, filamentous bacteria.** *FEMS Microbiol. Rev.* 1992, **8**:165–180.
388. Klaasen HL, Koopman JP, Van den Brink ME, Bakker MH, Poelma FG, Beynen AC: **Intestinal, segmented, filamentous bacteria in a wide range of vertebrate species.** *Lab. Anim.* 1993, **27**:141–150.
389. Schnupf P, Gaboriau-Routhiau V, Cerf-Bensussan N: **Host interactions with Segmented Filamentous Bacteria: an unusual trade-off that drives the post-natal maturation of the gut immune system.** *Semin. Immunol.* 2013, **25**:342–351.
390. Thompson CL, Vier R, Mikaelyan A, Wienemann T, Brune A: **“Candidatus Arthromitus” revised: segmented filamentous bacteria in arthropod guts are members of Lachnospiraceae.** *Environ. Microbiol.* 2012, **14**:1454–1465.
391. Kuwahara T, Ogura Y, Oshima K, Kurokawa K, Ooka T, Hirakawa H, Itoh T, Nakayama-Imaohji H, Ichimura M, Itoh K, et al.: **The lifestyle of the segmented filamentous bacterium: a non-culturable gut-associated immunostimulating microbe inferred by whole-genome sequencing.** *DNA Res. Int. J. Rapid Publ. Rep. Genes Genomes* 2011, **18**:291–303.
392. Prakash T, Oshima K, Morita H, Fukuda S, Imaoka A, Kumar N, Sharma VK, Kim S-W, Takahashi M, Saitou N, et al.: **Complete genome sequences of rat and mouse segmented filamentous bacteria, a potent inducer of th17 cell differentiation.** *Cell Host Microbe* 2011, **10**:273–284.
393. Sczesnak A, Segata N, Qin X, Gevers D, Petrosino JF, Huttenhower C, Littman DR, Ivanov II: **The genome of th17 cell-inducing segmented filamentous bacteria reveals extensive auxotrophy and adaptations to the intestinal environment.** *Cell Host Microbe* 2011, **10**:260–272.
394. Chase DG, Erlandsen SL: **Evidence for a complex life cycle and endospore formation in the attached, filamentous, segmented bacterium from murine ileum.** *J. Bacteriol.* 1976, **127**:572–583.
395. Ferguson DJ, Birch-Andersen A: **Electron microscopy of a filamentous, segmented bacterium attached to the small intestine of mice from a laboratory animal colony in Denmark.** *Acta Pathol. Microbiol. Scand. [B]* 1979, **87**:247–252.
396. Davis CP, Savage DC: **Habitat, succession, attachment, and morphology of segmented, filamentous microbes indigenous to the murine gastrointestinal tract.** *Infect. Immun.* 1974, **10**:948–956.
397. Jepson MA, Clark MA, Simmons NL, Hirst BH: **Actin accumulation at sites of attachment of indigenous apathogenic segmented filamentous bacteria to mouse ileal epithelial cells.** *Infect. Immun.* 1993, **61**:4001–4004.
398. Snel J, Hermsen CC, Smits HJ, Bos NA, Eling WM, Cebra JJ, Heidt PJ: **Interactions between gut-associated lymphoid tissue and colonization levels of indigenous, segmented, filamentous bacteria in the small intestine of mice.** *Can. J. Microbiol.* 1998, **44**:1177–1182.
399. Angert ER: **Alternatives to binary fission in bacteria.** *Nat. Rev. Microbiol.* 2005, **3**:214–224.
400. Snellen JE, Savage DC: **Freeze-fracture study of the filamentous, segmented microorganism attached to the murine small bowel.** *J. Bacteriol.* 1978, **134**:1099–1107.
401. Davis CP, Savage DC: **Effect of penicillin on the succession, attachment, and morphology of segmented, filamentous microbes in the murine small bowel.** *Infect. Immun.* 1976, **13**:180–188.

402. Tannock GW, Miller JR, Savage DC: **Host specificity of filamentous, segmented microorganisms adherent to the small bowel epithelium in mice and rats.** *Appl. Environ. Microbiol.* 1984, **47**:441–442.
403. Sano T, Huang W, Hall JA, Yang Y, Chen A, Gavzy SJ, Lee J-Y, Ziel JW, Miraldi ER, Domingos AI, et al.: **An IL-23R/IL-22 Circuit Regulates Epithelial Serum Amyloid A to Promote Local Effector Th17 Responses.** *Cell* 2015, **163**:381–393.
404. Atarashi K, Tanoue T, Ando M, Kamada N, Nagano Y, Narushima S, Suda W, Imaoka A, Setoyama H, Nagamori T, et al.: **Th17 Cell Induction by Adhesion of Microbes to Intestinal Epithelial Cells.** *Cell* 2015, **163**:367–380.
405. Pamp SJ, Harrington ED, Quake SR, Relman DA, Blainey PC: **Single-cell sequencing provides clues about the host interactions of segmented filamentous bacteria (SFB).** *Genome Res.* 2012, **22**:1107–1119.
406. Klaasen HL, Van der Heijden PJ, Stok W, Poelma FG, Koopman JP, Van den Brink ME, Bakker MH, Eling WM, Beynen AC: **Apathogenic, intestinal, segmented, filamentous bacteria stimulate the mucosal immune system of mice.** *Infect. Immun.* 1993, **61**:303–306.
407. Talham GL, Jiang HQ, Bos NA, Cebra JJ: **Segmented filamentous bacteria are potent stimuli of a physiologically normal state of the murine gut mucosal immune system.** *Infect. Immun.* 1999, **67**:1992–2000.
408. Lécuyer E, Rakotobe S, Lengliné-Garnier H, Lebreton C, Picard M, Juste C, Fritzen R, Eberl G, McCoy KD, Macpherson AJ, et al.: **Segmented filamentous bacterium uses secondary and tertiary lymphoid tissues to induce gut IgA and specific T helper 17 cell responses.** *Immunity* 2014, **40**:608–620.
409. Bunker JJ, Flynn TM, Koval JC, Shaw DG, Meisel M, McDonald BD, Ishizuka IE, Dent AL, Wilson PC, Jabri B, et al.: **Innate and Adaptive Humoral Responses Coat Distinct Commensal Bacteria with Immunoglobulin A.** *Immunity* 2015, **43**:541–553.
410. Ohnmacht C, Park J-H, Cording S, Wing JB, Atarashi K, Obata Y, Gaboriau-Routhiau V, Marques R, Dulauroy S, Fedoseeva M, et al.: **MUCOSAL IMMUNOLOGY. The microbiota regulates type 2 immunity through ROR γ ^T T cells.** *Science* 2015, **349**:989–993.
411. Yang Y, Torchinsky MB, Gobert M, Xiong H, Xu M, Linehan JL, Alonzo F, Ng C, Chen A, Lin X, et al.: **Focused specificity of intestinal TH17 cells towards commensal bacterial antigens.** *Nature* 2014, **510**:152–156.
412. Umesaki Y, Setoyama H, Matsumoto S, Imaoka A, Itoh K: **Differential roles of segmented filamentous bacteria and clostridia in development of the intestinal immune system.** *Infect. Immun.* 1999, **67**:3504–3511.
413. Chung H, Pamp SJ, Hill JA, Surana NK, Edelman SM, Troy EB, Reading NC, Villablanca EJ, Wang S, Mora JR, et al.: **Gut immune maturation depends on colonization with a host-specific microbiota.** *Cell* 2012, **149**:1578–1593.
414. Vaishnav S, Yamamoto M, Severson KM, Ruhn KA, Yu X, Koren O, Ley R, Wakeland EK, Hooper LV: **The antibacterial lectin RegIII γ promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine.** *Science* 2011, **334**:255–258.
415. Keilbaugh SA, Shin ME, Banchereau RF, McVay LD, Boyko N, Artis D, Cebra JJ, Wu GD: **Activation of RegIII β / γ and interferon γ expression in the intestinal tract of SCID mice: an innate response to bacterial colonisation of the gut.** *Gut* 2005, **54**:623–629.
416. Zheng Y, Valdez PA, Danilenko DM, Hu Y, Sa SM, Gong Q, Abbas AR, Modrusan Z, Ghilardi N, de Sauvage FJ, et al.: **Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens.** *Nat. Med.* 2008, **14**:282–289.
417. Qiu J, Guo X, Chen Z-ME, He L, Sonnenberg GF, Artis D, Fu Y-X, Zhou L: **Group 3 innate lymphoid cells inhibit T-cell-mediated intestinal inflammation through aryl hydrocarbon receptor signaling and regulation of microflora.** *Immunity* 2013, **39**:386–399.
418. Upadhyay V, Poroyko V, Kim T, Devkota S, Fu S, Liu D, Tumanov AV, Koroleva EP, Deng L, Nagler C, et al.: **Lymphotoxin regulates commensal responses to enable diet-induced obesity.** *Nat. Immunol.* 2012, **13**:947–953.
419. Jiang HQ, Bos NA, Cebra JJ: **Timing, localization, and persistence of colonization by segmented filamentous bacteria in the neonatal mouse gut depend on immune status of mothers and pups.** *Infect. Immun.* 2001, **69**:3611–3617.
420. Suzuki K, Meek B, Doi Y, Muramatsu M, Chiba T, Honjo T, Fagarasan S: **Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA-deficient gut.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004, **101**:1981–1986.
421. Lee YK, Menezes JS, Umesaki Y, Mazmanian SK: **Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011, **108 Suppl 1**:4615–4622.
422. Teng F, Klinger CN, Felix KM, Bradley CP, Wu E, Tran NL, Umesaki Y, Wu H-JJ: **Gut Microbiota Drive Autoimmune Arthritis by Promoting Differentiation and Migration of Peyer's Patch T Follicular Helper Cells.** *Immunity* 2016, **44**:875–888.
423. Caselli M, Cassol F, Gentili V, Di Luca D: **Genome sequences of segmented filamentous bacteria in animals: implications for human research.** *Gut Microbes* 2012, **3**:401–405.

424. Caselli M, Tosini D, Gafà R, Gasbarrini A, Lanza G: **Segmented filamentous bacteria-like organisms in histological slides of ileo-cecal valves in patients with ulcerative colitis.** *Am. J. Gastroenterol.* 2013, **108**:860–861.
425. Yin Y, Wang Y, Zhu L, Liu W, Liao N, Jiang M, Zhu B, Yu HD, Xiang C, Wang X: **Comparative analysis of the distribution of segmented filamentous bacteria in humans, mice and chickens.** *ISME J.* 2013, **7**:615–621.
426. Rodriguez-Palacios A, Kodani T, Kaydo L, Pietropaoli D, Corridoni D, Howell S, Katz J, Xin W, Pizarro TT, Cominelli F: **Stereomicroscopic 3D-pattern profiling of murine and human intestinal inflammation reveals unique structural phenotypes.** *Nat. Commun.* 2015, **6**:7577.
427. Raffin C, Raimbaud I, Valmori D, Ayyoub M: **Ex vivo IL-1 receptor type I expression in human CD4+ T cells identifies an early intermediate in the differentiation of Th17 from FOXP3+ naive regulatory T cells.** *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2011, **187**:5196–5202.
428. Quintana FJ, Jin H, Burns EJ, Nadeau M, Yeste A, Kumar D, Rangachari M, Zhu C, Xiao S, Seavitt J, et al.: **Aiolos promotes TH17 differentiation by directly silencing IL2 expression.** *Nat. Immunol.* 2012, **13**:770–777.
429. Chalmin F, Mignot G, Bruchard M, Chevriaux A, Végran F, Hichami A, Ladoire S, Derangère V, Vincent J, Masson D, et al.: **Stat3 and Gfi-1 transcription factors control Th17 cell immunosuppressive activity via the regulation of ectonucleotidase expression.** *Immunity* 2012, **36**:362–373.
430. Martin F, Apetoh L, Ghiringhelli F: **Controversies on the role of Th17 in cancer: a TGF- β -dependent immunosuppressive activity?** *Trends Mol. Med.* 2012, **18**:742–749.
431. Marquet J, Lasoudris F, Cousin C, Puiffe M-L, Martin-Garcia N, Baud V, Chereau F, Farcet J-P, Molinier-Frenkel V, Castellano F: **Dichotomy between factors inducing the immunosuppressive enzyme IL-4-induced gene 1 (IL4I1) in B lymphocytes and mononuclear phagocytes.** *Eur. J. Immunol.* 2010, **40**:2557–2568.
432. Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, Suda W, Nagano Y, Nishikawa H, Fukuda S, Saito T, Narushima S, Hase K, et al.: **Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota.** *Nature* 2013, **500**:232–236.
433. Snel J, Heinen PP, Blok HJ, Carman RJ, Duncan AJ, Allen PC, Collins MD: **Comparison of 16S rRNA sequences of segmented filamentous bacteria isolated from mice, rats, and chickens and proposal of “Candidatus Arthromitus.”** *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1995, **45**:780–782.
434. Goto Y, Panea C, Nakato G, Cebula A, Lee C, Diez MG, Laufer TM, Ignatowicz L, Ivanov II: **Segmented filamentous bacteria antigens presented by intestinal dendritic cells drive mucosal Th17 cell differentiation.** *Immunity* 2014, **40**:594–607.
435. Flannigan KL, Ngo VL, Geem D, Harusato A, Hirota SA, Parkos CA, Lukacs NW, Nusrat A, Gaboriau-Routhiau V, Cerf-Bensussan N, et al.: **IL-17A-mediated neutrophil recruitment limits expansion of segmented filamentous bacteria.** *Mucosal Immunol.* 2016, doi:10.1038/mi.2016.80.
436. Block KE, Zheng Z, Dent AL, Kee BL, Huang H: **Gut Microbiota Regulates K/BxN Autoimmune Arthritis through Follicular Helper T but Not Th17 Cells.** *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2016, **196**:1550–1557.
437. Muris A-H, Damoiseaux J, Smolders J, Cohen Tervaert JW, Hupperts R, Thewissen M: **Intracellular IL-10 detection in T cells by flowcytometry: the use of protein transport inhibitors revisited.** *J. Immunol. Methods* 2012, **381**:59–65.
438. Asquith M, Rosenbaum JT: **The interaction between host genetics and the microbiome in the pathogenesis of spondyloarthropathies.** *Curr. Opin. Rheumatol.* 2016, **28**:405–412.
439. Verbsky JW, Chatila TA: **Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked (IPEX) and IPEX-related disorders: an evolving web of heritable autoimmune diseases.** *Curr. Opin. Pediatr.* 2013, **25**:708–714.
440. Nishikawa H, Sakaguchi S: **Regulatory T cells in cancer immunotherapy.** *Curr. Opin. Immunol.* 2014, **27**:1–7.
441. Miyara M, Gorochov G, Ehrenstein M, Musset L, Sakaguchi S, Amoura Z: **Human FoxP3+ regulatory T cells in systemic autoimmune diseases.** *Autoimmun. Rev.* 2011, **10**:744–755.
442. Safinia N, Scotta C, Vaikunthanathan T, Lechler RI, Lombardi G: **Regulatory T Cells: Serious Contenders in the Promise for Immunological Tolerance in Transplantation.** *Front. Immunol.* 2015, **6**:438.
443. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA: **FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system.** *Nat. Rev. Immunol.* 2010, **10**:490–500.
444. Campbell DJ: **Control of Regulatory T Cell Migration, Function, and Homeostasis.** *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2015, **195**:2507–2513.
445. Harrington LE, Mangan PR, Weaver CT: **Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage.** *Curr. Opin. Immunol.* 2006, **18**:349–356.

446. Bailey SR, Nelson MH, Himes RA, Li Z, Mehrotra S, Paulos CM: **Th17 cells in cancer: the ultimate identity crisis.** *Front. Immunol.* 2014, **5**:276.
447. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM: **Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties.** *Immunity* 2006, **24**:677–688.
448. Ohnmacht C: **Tolerance to the Intestinal Microbiota Mediated by ROR(γ)(+) Cells.** *Trends Immunol.* 2016, **37**:477–486.
449. Deknuydt F, Bioley G, Valmori D, Ayyoub M: **IL-1beta and IL-2 convert human Treg into T(H)17 cells.** *Clin. Immunol. Orlando Fla* 2009, **131**:298–307.
450. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR: **The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells.** *Cell* 2006, **126**:1121–1133.
451. Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle PR, Neurath MF: **Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7.** *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2004, **172**:5149–5153.
452. Fahlén L, Read S, Gorelik L, Hurst SD, Coffman RL, Flavell RA, Powrie F: **T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells.** *J. Exp. Med.* 2005, **201**:737–746.
453. Scarlata C-M, Celse C, Pignon P, Ayyoub M, Valmori D: **Differential expression of the immunosuppressive enzyme IL4I1 in human induced Aiolos+, but not natural Helios+, FOXP3+ Treg cells.** *Eur. J. Immunol.* 2015, **45**:474–479.
454. Raffin C, Pignon P, Celse C, Debien E, Valmori D, Ayyoub M: **Human memory Helios- FOXP3+ regulatory T cells (Tregs) encompass induced Tregs that express Aiolos and respond to IL-1 β by downregulating their suppressor functions.** *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2013, **191**:4619–4627.
455. Wu Y, Borde M, Heissmeyer V, Feuerer M, Lapan AD, Stroud JC, Bates DL, Guo L, Han A, Ziegler SF, et al.: **FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT.** *Cell* 2006, **126**:375–387.
456. Duan J, Kasper DL: **Regulation of T cells by gut commensal microbiota.** *Curr. Opin. Rheumatol.* 2011, **23**:372–376.
457. Huygen K: **The Immunodominant T-Cell Epitopes of the Mycolyl-Transferases of the Antigen 85 Complex of M. tuberculosis.** *Front. Immunol.* 2014, **5**:321.
458. Stenger RM, Poelen MCM, Moret EE, Kuipers B, Bruijns SCM, Hoogerhout P, Hijnen M, King AJ, Mooi FR, Boog CJP, et al.: **Immunodominance in mouse and human CD4+ T-cell responses specific for the Bordetella pertussis virulence factor P.69 pertactin.** *Infect. Immun.* 2009, **77**:896–903.
459. Yewdell JW: **Confronting complexity: real-world immunodominance in antiviral CD8+ T cell responses.** *Immunity* 2006, **25**:533–543.
460. Li T, Steede NK, Nguyen H-NP, Freytag LC, McLachlan JB, Mettu RR, Robinson JE, Landry SJ: **Comprehensive analysis of contributions from protein conformational stability and major histocompatibility complex class II-peptide binding affinity to CD4+ epitope immunogenicity in HIV-1 envelope glycoprotein.** *J. Virol.* 2014, **88**:9605–9615.
461. Prickett S, Gray PM, Colpitts SL, Scott P, Kaye PM, Smith DF: **In vivo recognition of ovalbumin expressed by transgenic Leishmania is determined by its subcellular localization.** *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2006, **176**:4826–4833.
462. Targan SR, Landers CJ, Yang H, Lodes MJ, Cong Y, Papadakis KA, Vasiliauskas E, Elson CO, Hershberg RM: **Antibodies to CBir1 flagellin define a unique response that is associated independently with complicated Crohn's disease.** *Gastroenterology* 2005, **128**:2020–2028.
463. Ayyoub M, Souleimanian NE, Godefroy E, Scotto L, Hesdorffer CS, Old LJ, Valmori D: **A phenotype based approach for the immune monitoring of NY-ESO-1-specific CD4+ T cell responses in cancer patients.** *Clin. Immunol. Orlando Fla* 2006, **118**:188–194.
464. Valmori D, Lévy F, Godefroy E, Scotto L, Souleimanian NE, Karbach J, Tosello V, Hesdorffer CS, Old LJ, Jager E, et al.: **Epitope clustering in regions undergoing efficient proteasomal processing defines immunodominant CTL regions of a tumor antigen.** *Clin. Immunol. Orlando Fla* 2007, **122**:163–172.
465. Bioley G, Guillaume P, Luescher I, Yeh A, Dupont B, Bhardwaj N, Mears G, Old LJ, Valmori D, Ayyoub M: **HLA class I - associated immunodominance affects CTL responsiveness to an ESO recombinant protein tumor antigen vaccine.** *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2009, **15**:299–306.
466. Lewinsohn DA, Winata E, Swarbrick GM, Tanner KE, Cook MS, Null MD, Cansler ME, Sette A, Sidney J, Lewinsohn DM: **Immunodominant tuberculosis CD8 antigens preferentially restricted by HLA-B.** *PLoS Pathog.* 2007, **3**:1240–1249.
467. Paine A, Ritchlin CT: **Targeting the interleukin-23/17 axis in axial spondyloarthritis.** *Curr. Opin. Rheumatol.* 2016, **28**:359–367.

468. Li W-Q, Han J-L, Chan AT, Qureshi AA: **Psoriasis, psoriatic arthritis and increased risk of incident Crohn's disease in US women.** *Ann. Rheum. Dis.* 2013, **72**:1200–1205.
469. Miyadera H, Tokunaga K: **Associations of human leukocyte antigens with autoimmune diseases: challenges in identifying the mechanism.** *J. Hum. Genet.* 2015, **60**:697–702.
470. Calderón-Gómez E, Bassolas-Molina H, Mora-Buch R, Dotti I, Planell N, Esteller M, Gallego M, Martí M, Garcia-Martín C, Martínez-Torró C, et al.: **Commensal-Specific CD4(+) Cells From Patients With Crohn's Disease Have a T-Helper 17 Inflammatory Profile.** *Gastroenterology* 2016, **151**:489–500.e3.
471. Shen C, Landers CJ, Derkowski C, Elson CO, Targan SR: **Enhanced CBir1-specific innate and adaptive immune responses in Crohn's disease.** *Inflamm. Bowel Dis.* 2008, **14**:1641–1651.

Thèse de Doctorat

Clara Maria SCARLATA

Les lymphocytes TH17 et T régulateurs humains : mécanismes de développement partagés et relation avec le microbiote intestinal

Human TH17 and regulatory T cells: shared developmental mechanisms and relationship with the intestinal microbiota

Résumé

Deux populations de lymphocytes T CD4 régulateurs (Treg), les naturels (nTreg) et induits (iTreg), assurent la tolérance au soi et aux microorganismes commensaux et le contrôle des réponses immunitaires exagérées. Au cours de ma thèse j'ai investigué les mécanismes qui permettraient de cibler de façon différentielle une des populations Treg ainsi que le rôle du microbiote intestinal dans l'ontogénie des iTreg. Les iTreg ont des liens avec la population de lymphocytes T CD4 pro-inflammatoires TH17. Cela m'a amenée à examiner l'expression du gène IL411 codant pour une L-phénylalanine oxydase qui inhibe la prolifération des lymphocytes T et exprimé dans les TH17. J'ai montré que parmi les Treg l'IL411 était exprimé préférentiellement dans les iTreg et qu'en conditions inflammatoires son expression augmentait et accompagnait la conversion des Treg en TH17. Le profil différentiel d'expression de l'IL411 pourrait fournir une base pour le ciblage spécifique des iTreg. Alors que les nTreg se développent dans le thymus, des modèles murins indiquent que le microbiote intestinal joue un rôle important dans l'ontogénie des iTreg et des TH17. Afin d'étudier l'influence du microbiote intestinal sur le développement des iTreg et des TH17 chez l'homme, je me suis intéressée aux bactéries filamenteuses segmentées (SFB) qui jouent un rôle important dans le développement de l'immunité intestinale chez la souris. Nous avons mis en évidence des réponses T CD4 spécifiques de SFB dont une fraction exprimait les facteurs de transcription et les cytokines caractéristiques des Treg et des TH17. De plus, nos données suggèrent que ces réponses pourraient jouer un rôle dans la polyarthrite rhumatoïde.

Mots clés

iTreg ; TH17; IL411; SFB; Polyarthrite rhumatoïde; ROR γ T; FOXP3

Abstract

Two populations of regulatory CD4 T cells (Treg), natural Treg (nTreg) and induced Treg (iTreg), ensure tolerance to self and to commensal microorganisms as well as control of exaggerated immune responses. During my PhD research, I investigated mechanisms that could allow for the differential targeting of these Treg populations as well as the role of intestinal microbiota in iTreg ontogeny. iTreg have close ties to TH17, a population of pro-inflammatory CD4 T cells. This led me to examine the expression of the IL411 gene, which encodes an L-phenylalanine oxidase able to inhibit T cell proliferation and that is expressed in TH17 cells. We showed that among Treg IL411 was preferentially expressed in iTreg and that in inflammatory conditions its expression was enhanced and accompanied Treg conversion into TH17. The differential expression profile of IL411 could provide opportunities for the specific targeting of the iTreg population. Whereas nTreg develop in the thymus, data obtained in mouse models indicate that the intestinal microbiota plays a prominent role in the ontogeny of iTreg as well as in the development of TH17. In order to address the influence of the gut microbiota on the development of human iTreg and TH17, I focused on segmented filamentous bacteria (SFB) that play a central role in the development of intestinal immunity in mice. We detected SFB specific CD4 T cell responses in healthy individuals and a fraction of cells expressed Treg and TH17 signature transcription factors and cytokines. In addition, our data suggest that these responses could play a role in rheumatoid arthritis.

Key Words

iTreg ; TH17; IL411; SFB; Rheumatoid arthritis; ROR γ T; FOXP3