



Université de Sherbrooke

**Effet immun du traitement à l'iode radioactif sur les lymphocytes T de type régulateur chez des patients atteints d'une hyperthyroïdie auto-immune**

Par  
Sarah Côté-Bigras  
Programme d'immunologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé  
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)  
en immunologie

Sherbrooke, Québec, Canada  
Avril, 2015

Membres du jury d'évaluation  
Diane Rottembourg, programme d'immunologie  
Marek Rola-Pleszczynski, programme d'immunologie  
Denis Gris, programme d'immunologie  
Jean Verreault, programme de résidence en médecine nucléaire

© Sarah Côté-Bigras, 2015

## RÉSUMÉ

### **Effet immun du traitement à l'iode radioactif sur les lymphocytes T de type régulateur chez des patients atteints d'une hyperthyroïdie auto-immune**

Par  
Sarah Côté-Bigras  
Programme d'immunologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M.Sc.) en immunologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Les lymphocytes T de type régulateur sont engagés dans la régulation de plusieurs réponses immunes physiologiques et pathologiques. Certains d'entre eux, comme les lymphocytes T régulateurs (Treg) et invariants *Natural Killer T* (iNKT), sont essentiels pour le maintien de la tolérance périphérique et la prévention de l'auto-immunité.

Les patients atteints de la maladie de Graves ont des auto-anticorps activant le récepteur de la TSH exprimé sur les cellules de la glande thyroïde et sur les fibroblastes de l'orbite. En conséquence, les deux principales manifestations cliniques de la maladie sont une hyperthyroïdie ainsi qu'une orbitopathie. Lorsque l'hyperthyroïdie est traitée par l'iode radioactif (IR), une apparition ou une exacerbation de l'atteinte auto-immune ophtalmique peut survenir. L'irradiation de la glande cause une augmentation et une persistance temporelle des auto-anticorps dans la circulation sanguine qui ne sont pas observées suivant d'autres traitements de l'hyperthyroïdie tels que les médicaments antithyroïdiens.

L'hypothèse proposée était que l'amplification de l'auto-immunité survenant après le traitement à l'IR résultait d'une perte de régulation des cellules T autoréactives par les lymphocytes T de type régulateur, puisque ceux-ci ont un rôle déterminant dans le contrôle de l'auto-immunité. L'objectif du projet de recherche était donc d'étudier les effets du traitement à l'IR sur les lymphocytes Treg et les lymphocytes iNKT des patients atteints de la maladie de Graves. Nous avons démontré que le traitement à l'IR induit un changement de la fréquence périphérique des lymphocytes Treg et des lymphocytes iNKT, ainsi que de la fonction des lymphocytes Treg. En effet, nous avons démontré une réduction de la fonction suppressive de ces lymphocytes, et ce, accompagnée d'une diminution de la production d'IL-10. Ainsi, la fenêtre temporelle suivant le traitement à l'IR s'est avérée un moment critique pour étudier une altération de ces lymphocytes qui corroborait l'amplification de l'auto-immunité décrite après le traitement. De plus, nous avons démontré qu'un prétraitement avec un antithyroïdien de synthèse prévient partiellement les altérations observées chez les lymphocytes Treg, supportant la propriété immunomodulatrice de ces médicaments. Ces résultats accentuent la perspective d'une régulation immunitaire déficiente suivant certains traitements de l'hyperthyroïdie auto-immune.

Mots clés : Lymphocyte T régulateur, lymphocyte invariant *Natural Killer T*, maladie de Graves, iode radioactif, antithyroïdien de synthèse

## TABLE DES MATIERES

<b>Résumé</b> .....	<b>ii</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>iv</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>vi</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>vii</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>viii</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>Les lymphocytes T de type régulateur et tolérance au soi</b> .....	<b>1</b>
Lymphocytes T régulateurs (Treg).....	1
Marqueurs phénotypiques.....	2
Fonction suppressive.....	4
Pathologies reliées aux lymphocytes Treg humains .....	8
Lymphocytes invariants Natural Killer T (iNKT).....	10
Marqueurs phénotypiques.....	11
Ligands lipidiques.....	11
Fonction régulatrice.....	12
Pathologies reliées aux lymphocytes iNKT humains.....	14
<b>L'hyperthyroïdie auto-immune : maladie de Graves</b> .....	<b>16</b>
Récepteur de la TSH.....	16
Orbitopathie .....	17
Lymphocytes T et production d'anticorps.....	18
Pathogenèse .....	22
Étiologie .....	23
Lymphocytes T de type régulateur.....	24
<b>L'hyperthyroïdie non auto-immune : goitre multinodulaire toxique</b> .....	<b>26</b>
<b>Le traitement de l'hyperthyroïdie</b> .....	<b>27</b>
Antithyroïdiens de synthèse.....	28
Effets sur le système immunitaire .....	28
Iode radioactif .....	29
Amplification de l'auto-immunité.....	30
Prétraitement avec un antithyroïdien de synthèse.....	31
<b>Hypothèse</b> .....	<b>32</b>
Objectifs .....	32

<b>Article.....</b>	<b>33</b>
<b>Discussion.....</b>	<b>59</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>69</b>
<b>Remerciements.....</b>	<b>71</b>
<b>Liste des références .....</b>	<b>73</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure 1. Frequency of peripheral Treg and iNKT in healthy subjects (HS), hyperthyroid controls (MNG), and Graves' disease patients (G) sorting out those taking antithyroid medication (G-ATD) or not (G-no ATD). .....	44
Figure 2. Proportion variation in frequency of peripheral Treg and iNKT before and after radioiodine therapy in hyperthyroid patients (G and MNG) and over the same time period in healthy subjects. ....	46
Figure 3. Treg suppressive capacity assessed before and after radioiodine therapy. ....	48
Figure 4. IL-10 and TGF- $\beta$ 1 levels were assessed in the supernatants of suppression assays before and after radioiodine therapy. ....	49
Figure 5. Neutralizing experiments using antibodies or recovered supernatants in Treg suppression assays. ....	50
Supplemental Figure 1. Gating strategy to define Treg and iNKT cell subsets. ....	40
Supplemental Figure 2. Representative suppression assay.....	47
Supplemental Figure 3. Proportion variation in frequency of peripheral Treg before and after radioiodine therapy in patients with Graves' disease. ....	51
Table 1. Cohorts' characteristics .....	38

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Marqueurs utilisés pour l'identification des lymphocytes Treg humains .....	3
Tableau 2. Cibles cellulaires de la fonction suppressive exercée par les lymphocytes Foxp3+ Treg .....	5
Tableau 3. Mécanismes de suppression des lymphocytes Treg.....	7
Tableau 4. Vue d'ensemble des lymphocytes Treg dans des maladies auto-immunes .....	9
Tableau 5. Caractéristiques des lymphocytes NKT humains .....	11
Tableau 6. Cytokines produites par les lymphocytes iNKT .....	13
Tableau 7. Lymphocytes iNKT et maladies auto-immunes .....	15
Tableau 8. Sous-populations de lymphocytes T CD4 effecteurs.....	20
Tableau 9. Facteurs immunologiques possibles dans l'étiologie de la maladie de Graves ..	24
Tableau 10. Avantages et désavantages des traitements de la maladie de Graves .....	27



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

$\alpha$ -GalCer	Alpha-galactosylceramide
Ac-RTSH	Anticorps ciblant le RTSH
ATS	Antithyroïdien de synthèse
CD...	Classes de différenciation, <i>cluster of differentiation</i>
CFSE	<i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
FOXP3	<i>Forkhead box P3</i>
GMN	Goitre multinodulaire
IL-...	Interleukine
iNKT	T invariant <i>Natural Killer</i> , <i>invariant natural Killer T</i>
IR	Iode radioactif
MG	Maladie de Graves
NK	<i>Natural Killer</i>
RTSH	Récepteur de la TSH
TCR	Récepteur des cellules T, <i>T cell receptor</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor-beta</i>
Treg	T régulateur
TSH	Thyréotropine, <i>Thyroid-stimulating hormone</i>

## INTRODUCTION

### **Les lymphocytes T de type régulateur et tolérance au soi**

Le système immunitaire est apte à discriminer entre une composante du soi, comme une protéine tissulaire, et une de nature étrangère, comme un pathogène, lui conférant la capacité d'établir et de maintenir la tolérance au soi. Celle-ci se définit par l'état normal du système immunitaire d'un individu à ne pas répondre à ses propres constituants tissulaires (Singh et Schwartz, 2006). Les lymphocytes T expriment à leur surface un récepteur de haute affinité, le TCR (*T cell receptor*), capable de reconnaître un antigène présenté par une cellule présentatrice d'antigène et d'instaurer une réponse spécifique contre celui-ci, leur conférant un rôle central dans la réponse immune adaptative (Jiang et Chess, 2006). Lorsque le TCR reconnaît une composante antigénique du soi, le lymphocyte T l'exprimant est décrit comme un lymphocyte T autoréactif (Andersen, 2014). Une réponse immune dirigée contre ses propres antigènes, appelés auto-antigènes, peut déclencher une maladie de type auto-immun si les mécanismes de tolérance n'éliminent ou n'inactivent pas les lymphocytes autoréactifs (Van Parijs et Abbas, 1998). Leur potentiel pathogénique est entre autres contrôlé par deux populations spécialisées de lymphocytes T de type régulateur dont le rôle est de maintenir la tolérance au soi : les lymphocytes invariants *Natural Killer T* (iNKT) (Nowak et Stein-Streilein, 2007) et T régulateurs (Treg) (Wing et Sakaguchi, 2010).

### ***Lymphocytes T régulateurs (Treg)***

Les lymphocytes Treg sont des cellules T CD4<sup>+</sup> spécialisées dans le maintien de la tolérance au soi et de l'homéostasie immunitaire en supprimant l'activation, la prolifération et les fonctions effectrices de plusieurs cellules immunitaires. Ils ont été décrits pour la première fois dans les années 1970 sous le nom de « cellules T suppressives » (Gershon, 1975). Deux décennies plus tard, les lymphocytes Treg ont été phénotypiquement identifiés

chez la souris comme étant des cellules T CD4<sup>+</sup> exprimant de façon constitutive la chaîne alpha du récepteur de l'IL-2, nommé CD25 (Sakaguchi *et al.*, 1995). Le transfert adoptif des cellules T dont la population CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> a été retirée a induit l'apparition spontanée de plusieurs maladies auto-immunes dans des souris sans thymus. Plusieurs études (Dieckmann *et al.*, 2001, Jonuleit *et al.*, 2001, Ng *et al.*, 2001) se sont donc intéressées aux lymphocytes CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg ainsi qu'à leur fonction suppressive. Ils sont également connus comme étant les lymphocytes Treg dits « naturels »; ils se développent dans le thymus et ont un répertoire varié de leur TCR (Bluestone et Abbas, 2003). Ils constituent une population polyclonale sollicitée principalement, mais non exclusivement, vers la reconnaissance d'auto-antigènes (Hsieh *et al.*, 2004). Ils peuvent ainsi reconnaître des antigènes du soi ciblés dans une maladie auto-immune (Reddy *et al.*, 2004), des antigènes associés à une tumeur (Nishikawa *et al.*, 2003) ou à une greffe allogénique (Nishimura *et al.*, 2004). Il existe également des lymphocytes Treg dits « adaptatifs » tels que (Sakaguchi *et al.*, 2010) :

- Tr1
- Th3
- CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>
- CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>

Ils sont différents des lymphocytes Treg « naturels », car ils n'expriment pas le phénotype CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> et ils ont quitté le thymus sans capacité régulatrice. Celle-ci s'est acquise en périphérie suivant une stimulation antigénique appropriée en présence de cytokines régulatrices, c'est-à-dire dans un environnement propice à leur différenciation (Jiang et Chess, 2006). Leur contribution dans le maintien de la tolérance au soi n'est pas encore bien définie (Miyara et Sakaguchi, 2011).

### *Marqueurs phénotypiques*

Alors que l'ensemble de la population de lymphocytes CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> exerce une fonction suppressive chez la souris, seuls les lymphocytes CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> ont cette capacité chez l'humain. Leur activité suppressive est amplifiée lorsque l'expression constitutive de

surface du CD25 est élevée (Baecher-Allan *et al.*, 2001, Makita *et al.*, 2004). Plusieurs marqueurs sont exprimés chez les lymphocytes Treg humains et résumés dans le tableau 1. La plupart de ces marqueurs sont exprimés à la suite de l'activation des lymphocytes T, indépendamment de leur capacité régulatrice, et ne sont donc pas spécifiques aux lymphocytes Treg. Un marqueur unique à cette population n'a toujours pas été découvert chez l'humain.

**Tableau 1. Marqueurs utilisés pour l'identification des lymphocytes Treg humains**

(Dejaco *et al.*, 2006, Seddiki *et al.*, 2006)

Marqueurs
CD4
CD25
FOXP3
CD127
CTLA4
CD62L
OX40
GITR
TGF- $\beta$ membranaire
CD95
PD-L1
Intégrine $\alpha_4\beta_7/\alpha_4\beta_1$

**Légende :** CTLA4, *cytotoxic T lymphocyte antigen 4*; FOXP3, *forkhead box P3*; GITR, *glucocorticoid-induced TNF-receptor-related protein*; PD-L1, *programmed cell death-ligand 1*.

À ce jour, les marqueurs communément utilisés pour identifier les lymphocytes Treg « naturels » chez l'humain sont l'expression élevée du CD25, l'expression positive du FOXP3, ainsi que la faible expression, voire négative, du CD127 (Grant *et al.*, 2014). CD25 (chaîne alpha du récepteur de l'IL-2) est plus fortement exprimé sur les lymphocytes Treg périphériques que sur les cellules T non régulatrices récemment activées (Dejaco *et al.*, 2006). L'IL-2 est nécessaire pour le développement et l'homéostasie des lymphocytes Treg (Sakaguchi, 2004). Les souris déficientes en IL-2 (Papiernik *et al.*, 1998), ou en son récepteur (Malek *et al.*, 2002), ont un nombre réduit de lymphocytes Treg et développent un phénotype léthal caractérisé par une anémie hémolytique auto-immune (Sadlack *et al.*, 1995, Suzuki *et al.*, 1995). Quant au FOXP3 (*forkhead box P3*), il fait partie de la famille des facteurs de transcription qui partagent un domaine de liaison à l'ADN de type *winged*

*helix-forkhead* (Fontenot et Rudensky, 2005). Peu d'informations sont connues quant à la fonction de FOXP3 au niveau moléculaire, mais celui-ci agit en tant que répresseur de la transcription (Schubert *et al.*, 2001). Un rôle central du gène FOXP3 dans le maintien de la tolérance au soi a été démontré chez l'humain (Wildin *et al.*, 2002) comme chez la souris (Brunkow *et al.*, 2001), où une mutation récessive de ce gène mène à l'apparition d'atteintes auto-immunes et inflammatoires semblables aux maladies survenant à la suite de l'exclusion des lymphocytes CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> chez la souris. Il a également été démontré que l'expression ectopique de ce facteur de transcription confère une fonction régulatrice aux cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> naïves et induit l'expression de surface cellulaire du CD25 chez l'humain (Yagi *et al.*, 2004). Ainsi, FOXP3 est un régulateur clé du développement et de la fonction des lymphocytes CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg (Fontenot *et al.*, 2003, Hori *et al.*, 2003). De la sorte, le phénotype CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup>, qui représente environ 1-2 % des cellules périphériques T CD4<sup>+</sup>, est utilisé pour identifier les lymphocytes Treg chez l'humain (Miyara *et al.*, 2014, Nishikawa et Sakaguchi, 2014). Le marqueur de surface CD127 (chaîne alpha du récepteur de l'IL-7) est, quant à lui, une alternative au marqueur intracellulaire FOXP3 pour la purification de cette population. L'expression de CD127 corrèle inversement avec celle de FOXP3 ainsi que la fonction suppressive des lymphocytes Treg (Liu *et al.*, 2006, Seddiki *et al.*, 2006).

### *Fonction suppressive*

Les lymphocytes Treg suppriment la prolifération de cellules T naïves et leur différenciation en cellules T effectrices *in vivo* (Fontenot et Rudensky, 2005). Ils peuvent également supprimer l'activité effectrice de plusieurs autres cellules (tableau 2). Leur capacité suppressive peut être analysée *ex vivo* dans une expérience appelée l'essai de suppression (McMurchy et Levings, 2012, Thornton et Shevach, 1998). Dans cet essai *in vitro*, les lymphocytes Treg inhibent la production de cytokines et la prolifération de lymphocytes T dits « répondeurs » lorsque les deux populations sont mises en coculture et stimulées, soit par un antigène en présence de cellules présentatrices d'antigène, ou de façon polyclonale (Collison et Vignali, 2011). Suivant leur activation *in vitro*, les lymphocytes Treg ont la propriété d'être anergiques; ils ne sont pas capables de proliférer,

ou très peu, ni de produire de l'IL-2 (Fontenot et Rudensky, 2005). Toutefois, ils sont capables d'exercer leur fonction suppressive envers les lymphocytes T « répondeurs » en prolifération, même si leurs TCRs respectifs ne partagent pas la même reconnaissance antigénique (Takahashi *et al.*, 1998). La prolifération des lymphocytes T « répondeurs » peut ensuite être mesurée par analyse de la dilution du fluorochrome CFSE dans les cellules (McMurchy et Levings, 2012). La différence dans l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T « répondeurs » cultivées en absence et en présence des lymphocytes Treg reflète la capacité suppressive de ceux-ci. Quant à la présence de cytokines, il est possible de mesurer leurs concentrations dans les surnageants de culture recueillis à la fin de l'expérience.

**Tableau 2. Cibles cellulaires de la fonction suppressive exercée par les lymphocytes Foxp3+ Treg**

(Shevach, 2009)

- Lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup>
- Cellules dendritiques
- Lymphocytes B
- Macrophages
- Ostéoblastes
- Mastocytes
- Lymphocytes NK
- Lymphocytes NKT

Chez l'humain, l'étude fonctionnelle des lymphocytes Treg se limite à l'essai de suppression *in vitro*. En guise d'exemple, elle peut fournir des informations sur l'immunocompétence des patients atteints d'une maladie auto-immune en comparaison à celle des individus sains (Thiruppathi *et al.*, 2012).

Plusieurs mécanismes de suppression sont exercés par les lymphocytes Treg *in vitro* et *in vivo*, lesquels sont décrits dans le tableau 3. Ils englobent la perturbation métabolique des cellules cibles, la modulation des cytokines du microenvironnement, la modification fonctionnelle des cellules dendritiques et la cytolyse (Vignali *et al.*, 2008). Les mécanismes de suppression sont fréquemment répartis en deux groupes : ceux qui requièrent un contact cellulaire, et ceux qui sont exercés par des cytokines. Les mécanismes effecteurs précis

exercés par les lymphocytes Treg *in vivo* chez l'humain ne sont pas encore connus, mais il est probable qu'ils varient selon la situation, c'est-à-dire l'intensité et le site de la réponse immunitaire (Sakaguchi, 2004). Dans l'essai de suppression, il est possible d'identifier les mécanismes de suppression dominants exercés par les lymphocytes Treg à l'étude. L'évaluation de la suppression requérant un contact cellulaire peut être analysée par essai *Transwell* en séparant les deux populations de la coculture par une membrane perméable (Collison et Vignali, 2011). Il est également possible d'évaluer le rôle de diverses molécules clés dans la suppression en ajoutant par exemple un anticorps capable de les neutraliser (Bergmann *et al.*, 2007).

**Tableau 3. Mécanismes de suppression des lymphocytes Treg**(Sakaguchi *et al.*, 2010)

Molécule(s) clé(s)	Fonction	Références	
		Souris	Humain
<b>Mécanismes de suppression requérant un contact cellulaire</b>			
CTLA4	Régulation négative de la fonction de costimulation des CPAs	(Wing <i>et al.</i> , 2008)	—
	Interaction avec CD80 et CD86 sur les cellules T	(Paust <i>et al.</i> , 2004)	—
CD73–CD39	Hydrolyse de l'ATP inflammatoire extracellulaire	(Deaglio <i>et al.</i> , 2007)	—
LAG3	Induction d'une signalisation inhibitrice aux molécules du CMH de classe II	(Huang <i>et al.</i> , 2004)	—
Granzyme B (souris) et granzyme A (humain)	Lyse des cellules T	(Cao <i>et al.</i> , 2007, Gondek <i>et al.</i> , 2005)	(Grossman <i>et al.</i> , 2004)
CD95–CD95 ligand	Induction de l'apoptose des cellules T	—	(Strauss <i>et al.</i> , 2009)
<b>Mécanismes de suppression exercés par des cytokines</b>			
TGFβ et LAP	Induction de FOXP3 des cellules T	(Andersson <i>et al.</i> , 2008, Chen <i>et al.</i> , 2003)	—
IL-10	Atténuation de la fonction des CD	—	(Ito <i>et al.</i> , 2008)
	Conversion des cellules T en cellules de type Tr1	(Belkaid, 2007, Roncarolo <i>et al.</i> , 2006)	(Roncarolo <i>et al.</i> , 2006)
Galectine 1	Arrêt du cycle cellulaire et apoptose des cellules T	(Garin <i>et al.</i> , 2007)	—
CD25	Adsorption de l'IL-2	(Pandiyan <i>et al.</i> , 2007)	—
IL-35	L'induction de l'expression d'IL-35 chez des cellules T par les lymphocytes Treg mène à l'amplification de la suppression (IL-35 n'est pas exprimée par les lymphocytes Treg humains)	(Collison <i>et al.</i> , 2007)	(Bardel <i>et al.</i> , 2008)

**Légende** : CD, cellules dendritiques; CPA, cellules présentatrices d'antigène; CTLA4, *cytotoxic T lymphocyte antigen 4*; FOXP3, *forkhead box P3*; IL, interleukine; LAG3, *lymphocyte activation gene 3*; LAP, *latency-associated peptide*; TGFβ, *transforming growth factor β*.



### *Pathologies reliées aux lymphocytes Treg humains*

L'habileté des lymphocytes Treg à contrôler la réponse immune leur attribue un rôle central dans la prévention des maladies auto-immunes, de l'immunopathologie et des allergies, ainsi que dans le maintien de la tolérance aux allogreffes et de la tolérance maternelle et fœtale durant la grossesse (Baecher-Allan et Hafler, 2006). Par contre, cette habileté peut contribuer à favoriser la progression d'un cancer en supprimant la réponse immune antitumorale (Nishikawa et Sakaguchi, 2010). Puisque la majorité des antigènes identifiés comme étant associés aux tumeurs sont des auto-antigènes (Kawakami et Rosenberg, 1997), il est probable que les lymphocytes Treg « naturels » entravent l'immunosurveillance contre les cellules tumorales chez les patients cancéreux en supprimant les cellules T effectrices spécialisées dans la lutte contre la tumeur. Il a été démontré que le retrait des lymphocytes  $CD4^+CD25^+$  Treg avant l'induction d'une tumeur induit une réponse immunitaire efficace contre celle-ci chez des souris qui autrement n'exercent pas une telle réponse (Shimizu *et al.*, 1999).

Un mécanisme central sous-jacent l'apparition de maladies auto-immunes pourrait être la fréquence anormale ou le dysfonctionnement des lymphocytes Treg (tableau 4). Chez l'humain, il a été démontré qu'un nombre inadéquat de lymphocytes Treg mène à l'auto-immunité. L'absence de cette population, due à une mutation du gène codant pour FOXP3 chez les patients atteints du syndrome IPEX (immunodérégulation, polyendocrinopathie, entéropathie, lié au chromosome X), mène à l'apparition d'atteintes auto-immunes (Wildin *et al.*, 2002). Une réduction du nombre de ces lymphocytes dans le sang périphérique est observée chez les patients atteints de certaines maladies auto-immunes comme le lupus érythémateux systémique ou la colite ulcéreuse. Une augmentation numérique est également observée dans les tissus atteints de patients souffrants d'arthrite rhumatoïde et de psoriasis par exemple. Dans ces derniers cas, l'augmentation numérique suggère que le possible défaut des lymphocytes Treg pourrait plutôt être relié à leur fonction, soit insuffisante ou altérée (Buckner, 2010). Cette hypothèse est supportée par la majorité d'études fonctionnelles démontrant un défaut dans

la capacité des lymphocytes Treg à supprimer la prolifération des cellules T effectrices chez des individus atteints d'une maladie auto-immune.

Somme toute, un point critique dans le déploiement d'une réponse immunitaire efficace est l'équilibre entre les lymphocytes Treg et les cellules T effectrices. Une dominance des lymphocytes Treg est requise pour la suppression de la réponse immune et l'induction de la tolérance, alors qu'une dominance relative des cellules T effectrices doit être atteinte pour favoriser la réponse immune, par exemple dans la lutte tumorale (Miyara et Sakaguchi, 2011). Ainsi, il est crucial de développer une meilleure connaissance des facteurs qui ont un impact sur le nombre ou la fonction de ces cellules lors d'une réponse immune.

**Tableau 4. Vue d'ensemble des lymphocytes Treg dans des maladies auto-immunes**  
(Buckner, 2010)

Maladie	Nombre de lymphocytes Treg (pourcentage de lymphocytes CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>hi</sup> ou CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> )		Fonction des lymphocytes Treg
	Sang périphérique	Tissu	
Diabète de type 1	Normal	ND	Diminuée
Sclérose en plaques	Normal; sous- populations de lymphocytes Treg altérés	Augmenté dans le SNC	Diminuée
Lupus érythémateux systémique	Diminué	ND	Diminuée
Polyarthrite rhumatoïde	Augmenté	Augmenté dans les liquides synoviaux	Diminuée
Maladies inflammatoires de l'intestin	Diminué dans la colite ulcéreuse; normal dans la maladie de Crohn	Augmenté dans la <i>lamina propria</i> et ganglions lymphatiques mésentériques	Normale
Psoriasis	Augmenté	Augmenté dans la peau	Diminuée

**Légende** : FOXP3, *forkhead box P3*; ND, non défini; SNC, système nerveux central.

### ***Lymphocytes invariants Natural Killer T (iNKT)***

Les lymphocytes iNKT, tout comme les lymphocytes Treg « naturels », sont une population spécialisée de lymphocytes T de type régulateur exerçant des fonctions régulatrices (Jiang et Chess, 2006). Ils forment une sous-population unique parmi les lymphocytes *Natural Killer T* (NKT) en raison de leur rôle crucial dans la régulation antitumorale, l'induction de la tolérance et la prévention de l'auto-immunité (Nowak et Stein-Streilein, 2007).

Les lymphocytes NKT ont été initialement décrits chez la souris par la co-expression du récepteur des lymphocytes T, soit le TCR composé des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ , et du marqueur NK1.1, soit une glycoprotéine de la superfamille des lectines de type C exprimée sur les lymphocytes *Natural Killer* (Jonuleit *et al.*) (Lanier *et al.*, 1994). Les lymphocytes NKT sont un groupe hétérogène de lymphocytes dont leur TCR est restreint à la détection des molécules présentées par les complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) de classe *I-like* tels CD1a, b, c, d, et MR1 exprimés sur des cellules présentatrices d'antigène (Moody *et al.*, 2005). Les cellules dendritiques, macrophages, cellules B, thymocytes, adipocytes et hépatocytes ont tous la capacité de présenter des antigènes non protéiques, comme des lipides et des glycolipides, par les molécules de CMH de classe *I-like* et d'induire l'activation des lymphocytes NKT (Kumar et Delovitch, 2014). Ces derniers moduleront la réponse immunitaire en sécrétant de grandes quantités de cytokines influençant tout autant la réponse innée qu'adaptative. Chez l'humain, les lymphocytes NKT représentent environ 25 % des cellules T périphériques et ont majoritairement un phénotype de type mémoire (CD45RO<sup>+</sup>) (Lanier *et al.*, 1994). Les lymphocytes *invariants Natural Killer T* (iNKT) humains ne sont qu'une faible proportion des lymphocytes NKT, car ils représentent tout au plus 2 % des cellules T du sang périphérique (Gumperz *et al.*, 2002). Les différentes caractéristiques des lymphocytes iNKT et NKT humains sont résumées dans le tableau 5.

**Tableau 5. Caractéristiques des lymphocytes NKT humains**

(Takahashi et Kurokawa, 2009)

	Lymphocytes iNKT	Lymphocytes NKT
Répertoire de la chaîne $\alpha$ du TCR	V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18 invariant	Hétérogène
Répertoire de la chaîne $\beta$ du TCR	V $\beta$ 11	Hétérogène
CD4/CD8	CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> , CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup>
Reconnaissance de l'antigène	Restreinte au CD1d	Restreinte aux CMH de classe I-like
Production de cytokines	CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> , CD8 <sup>+</sup> (majoritairement Th1) CD4 <sup>+</sup> (Th1, Th2)	CD8 <sup>+</sup> (Th1) CD4 <sup>+</sup> (Th1, Th2)
Activité antitumorale	++	— ~ +

**Légende** : CMH, complexe majeur d'histocompatibilité; Th, *T helper*; TCR, *T cell receptor**Marqueurs phénotypiques*

Les lymphocytes iNKT peuvent être doubles négatifs CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> ou simples positifs CD4<sup>+</sup>, ou CD8<sup>+</sup> (O'Reilly *et al.*, 2011). Les lymphocytes iNKT ont la particularité d'exprimer une chaîne  $\alpha$  du TCR qui soit invariante : V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18. Celle-ci est associée à la chaîne  $\beta$  du TCR : V $\beta$ 11 (Dellabona *et al.*, 1994). Ainsi, ces lymphocytes sont identifiés par la co-expression du TCR V $\alpha$ 24/V $\beta$ 11. Ce TCR est limité à la détection de ligands lipidiques présentés par la molécule CD1d des cellules présentatrices d'antigène (Brigl et Brenner, 2004). Par contre, la nature et la source des lipides liant ces molécules sont encore peu connues.

*Ligands lipidiques*

Le lipide  $\alpha$ -GalCer ( $\alpha$ -galactosylceramide) a été le premier ligand découvert des lymphocytes iNKT (Kawano *et al.*, 1997). Il a originellement été découvert dans la recherche d'une activité antitumorale de divers composés dérivés d'éponges marines (Kobayashi *et al.*, 1995). Plusieurs essais fonctionnels ont permis de générer le premier tétramère CD1d, où le complexe  $\alpha$ -GalCer-CD1d est spécifiquement reconnu par le TCR invariant des lymphocytes iNKT chez la souris et chez l'humain (Zeissig *et al.*, 2013). Ce

ligand n'a pas été associé à une fonction physiologique chez les lymphocytes iNKT, mais il a servi de prémisses à l'hypothèse que les TCR invariants de cette population ont évolué pour reconnaître des lipides (Bendelac *et al.*, 2007). Ainsi, d'autres ligands des lymphocytes iNKT de nature étrangère ont été identifiés tels des lipides microbiens retrouvés chez *Borrelia burgdorferi* (Ben-Menachem *et al.*, 2003) et *Mycobacterium tuberculosis* (Fischer *et al.*, 2004). En outre, les lymphocytes iNKT ont la capacité d'être activés par des ligands lipidiques de nature physiologique présentés par les molécules CD1d (Park *et al.*, 1998), tel l'iGb3 (isoglobotrihexosylceramide) (Zhou *et al.*, 2004). En conséquence, malgré l'expression restreinte des chaînes de leur TCR, les lymphocytes iNKT sont capables d'être activés par plusieurs ligands lipidiques différents afin d'exercer leur fonction de régulation de la réponse immune.

### *Fonction régulatrice*

Les fonctions des lymphocytes iNKT humains sont très similaires à celles observées chez la souris. Après leur activation, les lymphocytes iNKT ont la capacité de produire plusieurs cytokines qui peuvent activer ou supprimer la réponse immune (tableau 6). Ces cytokines peuvent également contribuer à déterminer le profil Th1/Th2 de la réponse, puisque l'activation des lymphocytes iNKT mène rapidement à la sécrétion d'une grande quantité d'IFN- $\gamma$ , une cytokine de type Th1, ainsi que d'IL-4, une cytokine de type Th2 (Lee *et al.*, 2002). La rapidité de cette réponse immune est une propriété que ces lymphocytes partagent avec les cellules du système immunitaire inné. Les cytokines produites par les lymphocytes iNKT pourront, à leur tour, activer plusieurs types cellulaires tels que (Kronenberg et Gapin, 2002) :

- Lymphocytes NK
- Lymphocytes T
- Lymphocytes B
- Macrophages
- Cellules dendritiques myéloïdes

En retour, ces cellules pourront sécréter d'autres cytokines qui moduleront la réponse immunitaire, provoquant un ensemble complexe de réactions physiologiques (Van Kaer, 2005). Les lymphocytes iNKT produisent également des chimiokines comme l'éotaxine, RANTES, MIP-1 $\alpha$  et MIP-1 $\beta$  (Chang *et al.*, 2007), et des molécules cytolytiques comme FasL, perforine et granzyme B (Kaneko *et al.*, 2000). Ces dernières leur confèrent la capacité d'exercer une activité cytolytique contre des cellules tumorales par exemple.

### Tableau 6. Cytokines produites par les lymphocytes iNKT

(Gumperz *et al.*, 2002) (Bendelac *et al.*, 2007)

<ul style="list-style-type: none"> <li>• IL-2</li> <li>• IL-4</li> <li>• IL-5</li> <li>• IL-6</li> <li>• IL-10</li> <li>• IL-13</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• IL-17</li> <li>• IL-21</li> <li>• IFN-<math>\gamma</math></li> <li>• TNF-<math>\alpha</math></li> <li>• TGF-<math>\beta</math></li> <li>• GM-CSF</li> </ul>
--	--

La production de cytokines comme l'IL-10 et l'IL-13 par les lymphocytes iNKT contribue à la suppression de la réponse immunitaire dans divers modèles expérimentaux (Godfrey et Kronenberg, 2004). Un modèle de tolérance systémique nommé ACAID (*anterior chamber-associated immune deviation*) a été démontré comme étant dépendant des lymphocytes iNKT (Sonoda *et al.*, 2001, Streilein et Niederkorn, 1981). Dans ce modèle, l'introduction d'un antigène dans la chambre antérieure de l'œil d'une souris mène à l'inhibition locale et systémique de la réponse inflammatoire des lymphocytes T envers cet antigène. La production d'IL-10 par les lymphocytes iNKT est essentielle dans cette induction de la tolérance systémique en contribuant au processus de génération de lymphocytes Treg capables de reconnaître et d'être activés par l'antigène introduit dans la chambre antérieure (Sonoda *et al.*, 2001). Ainsi, ceci expliquerait comment les lymphocytes iNKT peuvent promouvoir une suppression qui cible un antigène protéique en particulier, malgré le fait que leur propre TCR ne soit pas apte à lier cet antigène présenté par une cellule présentatrice d'antigène (Godfrey et Kronenberg, 2004).

### *Pathologies reliées aux lymphocytes iNKT humains*

Le rôle central des lymphocytes iNKT dans la lutte contre les pathogènes, les tumeurs, les allergènes et l'auto-immunité semblerait être la conséquence des différentes réponses immunes exercées par ces lymphocytes : le profil de sécrétion des cytokines de type Th1 et Th2, leur capacité cytotoxique, ainsi que la sécrétion de cytokines régulatrices (Kronenberg et Gapin, 2002). Il a été démontré que les lymphocytes iNKT sont importants dans le processus de thérapie tumorale (Smyth *et al.*, 2002). Chez l'humain, ils peuvent être des effecteurs primaires dans l'élimination de la tumeur grâce à leur fonction cytotoxique, ou être des effecteurs secondaires en promouvant une réponse antitumorale en recrutant d'autres cellules, par exemple les lymphocytes NK par la production d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$  (Metelitsa *et al.*, 2001). Au sein de plusieurs modèles tumoraux, les lymphocytes iNKT activent la réponse immune au lieu de la supprimer; un type de régulation qui n'est pas observé chez les lymphocytes Treg « naturels » qui agissent uniformément par des mécanismes suppressifs (Godfrey et Kronenberg, 2004). Par contre, puisque les lymphocytes iNKT sont capables d'activer les lymphocytes Treg, ceux-ci peuvent être un obstacle à l'élimination de la tumeur.

Un lien potentiel entre les lymphocytes iNKT et l'auto-immunité a été révélé par la découverte d'un nombre réduit et d'une altération fonctionnelle de cette population dans certains modèles de souris génétiquement susceptibles à l'auto-immunité, comme la souris NOD (*non-obese diabetic*) et la souris SJL (tableau 7). En outre, dans plusieurs modèles expérimentaux d'auto-immunité, une exacerbation de la maladie est observée chez des souris déficientes en iNKT (Wang *et al.*, 2001, Yang *et al.*, 2004), tandis que leur augmentation numérique par transfert adoptif diminue la progression de la maladie (Hammond *et al.*, 1998). En parallèle avec les études menées chez la souris, un défaut numérique et fonctionnel des lymphocytes iNKT est également observé chez plusieurs patients atteints de maladies auto-immunes (Kojo *et al.*, 2001). Quelques maladies auto-immunes ainsi que leur association avec les lymphocytes iNKT sont résumées dans le tableau 7. Globalement, il est important de développer une meilleure connaissance des

facteurs qui ont un impact sur le nombre ou la fonction de ces cellules dans la réponse immune.

**Tableau 7. Lymphocytes iNKT et maladies auto-immunes**

(Hammond et Godfrey, 2002)

Maladie	Association avec les lymphocytes iNKT	Référence
<b>Diabète de type 1</b>	Les patients ont une diminution numérique des lymphocytes iNKT	(Wilson <i>et al.</i> , 1998)
	Les souris NOD ont une diminution numérique et fonctionnelle des lymphocytes iNKT	(Hammond <i>et al.</i> , 1998)
	L'augmentation numérique des lymphocytes iNKT protège les souris NOD contre le diabète	
	Exacerbation du diabète dans les souris NOD CD1d <sup>-/-</sup> (souris déficientes en iNKT)	(Wang <i>et al.</i> , 2001)
	L' $\alpha$ -GalCer protège les souris NOD contre le diabète	
<b>EAE/sclérose en plaques</b>	Les patients ont une diminution numérique des lymphocytes iNKT	(van der Vliet <i>et al.</i> , 2001)
	Les patients ont un défaut fonctionnel des lymphocytes iNKT	(Gausling <i>et al.</i> , 2001)
	Les souris SJL (susceptibles au EAE) ont une déficience en lymphocytes iNKT	(Jahng <i>et al.</i> , 2001)
	L' $\alpha$ -GalCer protège les souris C57BL/6 contre l'EAE	
<b>LES</b>	Les patients ont une diminution numérique des lymphocytes iNKT	(van der Vliet <i>et al.</i> , 2001)
<b>Sclérodémie systémique</b>		
<b>Syndrome de Sjögren</b>		
<b>Arthrite rhumatoïde</b>		

**Légende :**  $\alpha$ -GalCer,  $\alpha$ -galactosylceramide; EAE, encéphalomyélite auto-immune expérimentale; LES, lupus érythémateux systémique.



## **L'hyperthyroïdie auto-immune : maladie de Graves**

La maladie de Graves (MG) est une maladie auto-immune de la glande thyroïde caractérisée par une perte de la tolérance au récepteur de la TSH (*thyroid-stimulating hormone*, RTSH), l'auto-antigène majeur de ce syndrome (Rees Smith *et al.*, 1988). Les patients atteints de la MG ont des lymphocytes T et B autoréactifs contribuant à la synthèse d'anticorps ciblant le RTSH (Ac-RTSH) (Rapoport *et al.*, 1998). Ceux-ci sont détectés dans le sérum de la majorité des patients atteints de la MG (Takasu *et al.*, 1997) et activent le RTSH sur les follicules épithéliaux thyroïdiens de façon très similaire à la TSH, son ligand naturel (Sanders *et al.*, 2007). Cette action mène à l'hyperplasie et à l'hypertrophie des follicules, d'où la formation d'un goitre, ainsi qu'à la production excessive d'hormones thyroïdiennes (Brent, 2008). L'hyperthyroïdie est responsable de la vaste majorité des symptômes chez ces patients : fatigue, anxiété, nervosité, perte de poids, palpitations cardiaques, sensibilité à la chaleur, etc. (Cooper, 2003). Dans des modèles murins de la MG, l'hyperthyroïdie est expérimentalement induite par l'immunisation avec un plasmide ou un adénovirus permettant l'expression transitoire *in vivo* du RTSH (Costagliola *et al.*, 2000, Nagayama *et al.*, 2002).

### ***Récepteur de la TSH***

Le RTSH est un régulateur clé de la fonction et de la croissance de la glande thyroïde. Ce récepteur à sept domaines transmembranaires couplé aux protéines G est ancré à la surface de la membrane plasmique des thyrocytes ainsi que plusieurs autres cellules (Davies *et al.*, 2002). La transmission des signaux extracellulaires suivant la liaison de la TSH ou d'un Ac-RTSH à ce récepteur est orchestrée par des protéines G couplées aux boucles transmembranaires du RTSH, provoquant l'activation de plusieurs voies de signalisation cellulaire comme celle de l'adénylate cyclase/AMP cyclique (Latif *et al.*, 2009). Subséquemment, ceci induit la prolifération et l'hyperfonction des thyrocytes, menant entre autres à leur survie et à la production d'hormones thyroïdiennes : la triiodothyronine et la thyroxine. L'implication du RTSH dans l'auto-immunité pourrait être due aux modifications post-traductionnelles uniques de ce récepteur. Il a la particularité de

subir un clivage protéolytique menant à la formation de deux sous-unités :  $\alpha$  et  $\beta$  (Rapoport *et al.*, 1998). La sous-unité  $\beta$  contient les sept domaines ancrés dans la membrane cellulaire. Par la suite, un segment extracellulaire d'environ 50 résidus est clivé par des métalloprotéases agissant à la surface cellulaire (de Bernard *et al.*, 1999), et des ponts disulfures se forment sur les résidus cystéines nouvellement exposés permettant de lier les deux sous-unités (Zai *et al.*, 1999). Subséquemment, ces ponts sont rompus par des protéines disulfures isomérases menant à la relâche de la sous-unité  $\alpha$  du récepteur (Couet *et al.*, 1996). Cette sous-unité  $\alpha$  relâchée pourrait être en partie responsable de l'induction ou de l'amplification de l'auto-immunité (Iyer et Bahn, 2012). Dans un modèle murin de la MG induite par un adénovirus, l'hyperthyroïdie et le goitre sont d'une plus grande ampleur lorsque l'adénovirus induit uniquement l'expression de la sous-unité  $\alpha$ , comparativement à celle d'un RTSH génétiquement modifié pour empêcher le clivage des deux sous-unités (Chen *et al.*, 2003). Les Ac-RTSH de patients atteints de la MG lient préférentiellement la sous-unité  $\alpha$  (Chazenbalk *et al.*, 2002).

### ***Orbitopathie***

Une manifestation extrathyroïdienne unique chez les patients atteints de la MG est l'orbitopathie (Ross, 2011). Cette seconde maladie auto-immune est cliniquement apparente chez environ 30 % des patients, mais discernée chez plus de 80 % des patients qui sont évalués au moyen de l'imagerie orbitale (Brent, 2008). Les manifestations cliniques de l'orbitopathie sont, entre autres, une exophtalmie, un érythème et un gonflement des paupières, une double vision ainsi qu'une douleur oculaire (Bahn, 2010). L'orbitopathie survient le plus souvent à moins de 18 mois suivant le diagnostic de la maladie thyroïdienne, mais il n'est pas rare qu'elle apparaisse simultanément (Wiersinga *et al.*, 1988). Cette relation immunologique étroite pourrait résulter d'une réponse de type auto-immun à un ou plusieurs antigènes exprimés tant au niveau de la glande thyroïde que de l'orbite (Bahn et Heufelder, 1993). Le RTSH est un candidat potentiel puisque les fibroblastes de l'orbite de patients atteints d'une orbitopathie expriment cette protéine (Agretti *et al.*, 2005), et ce, à des niveaux significativement plus élevés que chez les individus sains (Bahn *et al.*, 1998). Les niveaux d'Ac-RTSH corrèlent avec la sévérité et

l'activité clinique de l'orbitopathie (Lytton *et al.*, 2010) et également avec sa prévalence chez des patients atteints de la MG non traités (Vos *et al.*, 2008). Récemment, un modèle murin d'orbitopathie a été créé par immunisation génétique de souris BALB/c avec un plasmide codant pour la sous-unité  $\alpha$  du RTSH humain, menant au remodelage extensif des tissus conjonctifs et adipeux de l'orbite (Moshkelgosha *et al.*, 2013). La pathologie de l'orbite est très similaire à celle observée chez l'humain (Bahn, 2010) :

- une inflammation des muscles extraoculaires causée par une infiltration de lymphocytes et de macrophages;
- un œdème dû à l'action hydrophile des glycosaminoglycanes produites par les fibroblastes;
- une expansion des tissus adipeux due à la différenciation des fibroblastes préadipocytes en adipocytes;
- ainsi qu'une séparation des fibres musculaires causée par le dépôt des glycosaminoglycanes.

En outre, les souris immunisées ont développé des Ac-RTSH. Globalement, ces résultats soutiennent le rôle pathogénique de l'auto-antigène RTSH dans l'apparition de l'orbitopathie.

### ***Lymphocytes T et production d'anticorps***

Les Ac-RTSH sont la cause de l'hyperthyroïdie dans la MG, mais l'initiation ou l'amplification de ce procédé implique les lymphocytes T (Rapoport *et al.*, 1998). Ainsi, il est important de définir les principaux mécanismes par lesquels les lymphocytes T se différencient et contribuent à la production d'anticorps. Comme les lymphocytes B naïfs, les lymphocytes T naïfs doivent être activés par un antigène spécifique afin de se différencier en lymphocytes effecteurs. Les tissus lymphoïdes secondaires, tels que les ganglions lymphatiques, sont le lieu de rencontre des lymphocytes T naïfs circulants avec les cellules présentatrices d'antigène (Cyster, 1999). La liaison du TCR d'un lymphocyte T au complexe d'un peptide et d'une molécule du CMH à la surface d'une cellule présentatrice d'antigène peut induire l'expansion clonale du lymphocyte seulement si un

signal de costimulation est conjointement produit. Celui-ci est fourni par la liaison de la molécule CD28 exprimée à la surface du lymphocyte T avec les ligands CD80 ou CD86 exprimés sur la cellule présentatrice d'antigène (Harris et Ronchese, 1999). L'activation des lymphocytes T change le profil de transcription génique et déclenche un programme de différenciation cellulaire avec une phase de prolifération principalement contrôlée par la cytokine IL-2. L'augmentation de la synthèse de cette cytokine permet à de nombreuses molécules d'IL-2 de se lier à leur récepteur (IL2-R) exprimé sur les lymphocytes T, menant à leur expansion clonale (Harris et Ronchese, 1999). Désormais, les nombreux clones de lymphocytes T seront capables d'accomplir des fonctions effectrices à la suite d'une stimulation antigénique appropriée, et ce, en l'absence de signaux de costimulation.

Tandis que les lymphocytes T CD8 sont dédiés à exercer des fonctions cytotoxiques effectrices, les lymphocytes T CD4 peuvent se différencier en plusieurs sous-populations de lymphocytes (tableau 8). Plusieurs facteurs influencent l'issue de la différenciation des lymphocytes T CD4. Parmi ceux-ci figurent les cytokines sécrétées par les cellules présentatrices d'antigène, la densité des complexes de l'antigène lié au CMH à la surface des cellules présentatrices d'antigène, ainsi que l'affinité de la liaison des TCRs aux complexes (Zygmunt et Veldhoen, 2011). Somme toute, c'est la nature de la présentation antigénique et les cytokines du microenvironnement qui semblent en grande partie déterminer la différenciation des lymphocytes T CD4. Les sous-populations peuvent être distinguées par les différents facteurs de transcription qui régulent et maintiennent leur fonction effectrice, et également par leur capacité à sécréter des cytokines particulières en réponse à un stimulus (tableau 8). Les cytokines produites par une sous-population tendent parfois à renforcer l'orientation de la différenciation (Kaiko *et al.*, 2008).

**Tableau 8. Sous-populations de lymphocytes T CD4 effecteurs**(Brucklacher-Waldert *et al.*, 2014)

Types cellulaires	Cytokines contribuant à la différenciation	Principaux facteurs de transcription	Marqueurs de surface cellulaire et cytokines
Th1	IL-12, IFN- $\gamma$	Tbet, STAT1, STAT4, Runx3	CXCR3, IFN- $\gamma$
Th2	IL-4, IL-2	GATA-3, STAT6, STAT5	IL-33R, IL-4, IL-13, IL-5
Th9	TGF $\beta$ , IL-4	PU.1	IL-9
Th17	IL-6, TGF $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-23, IL-21	ROR $\gamma$ T, AhR, STAT3, Batf, Runx1, ROR $\alpha$	CD161, IL-17A, IL-17F, GM-CSF
Th22	IL-6, IL-13, TNF- $\alpha$	AhR	CCR4, CCR6, CCR10, IL-22
Tfh	IL-6, IL-21	Bcl-6, Ascl2	CXCR5, PD-1, IL-21
Treg « adaptatifs »	TGF $\beta$ , IL-2	FOXP3, STAT5	IL-10, TGF $\beta$

**Légende** : Tfh, *follicular helper T cell*; Th, *helper T cell*

Après leur différenciation, les lymphocytes T effecteurs CD8 et la plupart des lymphocytes CD4 quittent les organes lymphoïdes secondaires et rejoignent la circulation sanguine. Les lymphocytes CD4 de type Th2 resteront essentiellement dans les tissus lymphoïdes, où ils activeront les lymphocytes B naïfs qui partagent une reconnaissance antigénique similaire (Cyster, 1999). Grâce aux immunoglobulines de surface, les lymphocytes B peuvent capter des antigènes et les apprêter de façon à présenter des segments protéiques aux lymphocytes T. Lorsque le lymphocyte B présente un antigène reconnu par le lymphocyte Th2, il y a un renforcement des interactions d'adhérence qui mène à la formation d'un foyer primaire composé de lymphocytes B activés et de lymphocytes Th2 (Allen *et al.*, 2007). Cette interaction mène à l'expression du ligand de CD40 (CD40L) chez le lymphocyte Th2 (Grewal et Flavell, 1996), ce qui induit la prolifération cellulaire du lymphocyte B lors de son interaction avec CD40 à la surface de ce dernier. L'expansion clonale et la différenciation subséquente des lymphocytes B en plasmocytes sécrétant des anticorps sont également dues à la contribution des cytokines de type Th2 produites comme l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-6 (Cassese *et al.*, 2003). L'activation des lymphocytes B déclenche un mécanisme de mutations ponctuelles dans les régions variables de l'ADN réarrangé (Allen *et al.*, 2007). Ce processus nommé hypermutation

somatique mènera à une population de lymphocytes B exprimant des immunoglobulines avec diverses affinités pour l'antigène. Ce ne sont que les lymphocytes B avec des immunoglobulines de surface de hautes affinités pour l'antigène qui seront sélectionnés pour se différencier en plasmocytes produisant des anticorps ou en cellules mémoires. De concert, le mécanisme de commutation isotypique (Cerutti *et al.*, 1998) initie la production d'anticorps avec diverses fonctions effectrices, comme l'IgA, l'IgE et l'IgG, mais ayant conservés la même reconnaissance antigénique. Les diverses sous-populations de lymphocytes influencent ce mécanisme par le biais des cytokines qu'elles sécrètent. Par exemple, les lymphocytes Th folliculaires peuvent réguler la commutation isotypique via l'IFN- $\gamma$ , l'IL-4, l'IL-13 et l'IL-21 (Ding *et al.*, 2013).

Les mécanismes précédemment décrits ainsi que les facteurs les régulant se transposent à l'interaction de lymphocytes T et B autoréactifs et à la production subséquente d'auto-anticorps. Certaines perturbations de ces mécanismes ont été démontrées comme pouvant favoriser l'auto-immunité. Par exemple, des changements augmentant le nombre d'antigènes présentés par une cellule peuvent mener à des interactions avec des lymphocytes T qui n'étaient pas sensibles à ces antigènes lorsqu'ils étaient présents en un nombre inférieur. Ce type de changement est susceptible de survenir dans les tissus enflammés, comme ceux de la glande thyroïde des patients atteints de la MG (Mikos *et al.*, 2014). La cytokine IFN- $\gamma$  peut induire l'expression des molécules du CMH de classe II à la surface des cellules qui normalement ne l'expriment pas, comme les thyrocytes (Todd *et al.*, 1985). L'absence de l'expression de molécules de costimulation par les thyrocytes empêche l'activation des lymphocytes T naïfs, comme précédemment décrite. Par contre, les lymphocytes T effecteurs peuvent reconnaître des peptides thyroïdiens, comme ceux provenant de l'auto-antigène RTSH, présentés par les molécules du CMH de classe II exprimées sur les thyrocytes. La production subséquente de cytokines, comme l'IFN- $\gamma$ , par ces lymphocytes amplifierait par rétroaction positive l'expression des molécules du CMH et la présentation antigénique, favorisant l'auto-immunité.

Les lymphocytes T du tissu thyroïdien de patients atteints de la MG ont été démontrés comme capables de reconnaître des peptides de l'auto-antigène RTSH présentés

par des cellules présentatrices d'antigène (Mullins *et al.*, 1995). Plusieurs études ont évalué dans le sang périphérique de ces patients la réponse des lymphocytes T autoréactifs, c'est-à-dire leur prolifération suivant une stimulation par divers peptides du RTSH (De Groot *et al.*, 2009, Martin *et al.*, 1997, Nagy *et al.*, 1995). Plus récemment, notre laboratoire a démontré pour la première fois que les cellules autoréactives à des peptides du RTSH sont détectées dans le sang périphérique des patients atteints de la MG, et ce, par la sécrétion de la cytokine IFN- $\gamma$  (Cote-Bigras *et al.*, 2014). Malgré le fait qu'aucun peptide immunodominant n'ait été découvert, l'ensemble de ces études démontre le rôle central de la réactivité immunologique à l'auto-antigène RTSH dans la MG.

### ***Pathogenèse***

La réactivité immunologique à l'auto-antigène RTSH occupe un rôle central dans le schéma général proposé de la pathogenèse de la MG. Même si les mécanismes effecteurs menant à l'apparition des atteintes auto-immunes de la MG ne sont pas connus, ils impliquent une perte de la tolérance au RTSH (Xia et Kellems, 2011). L'endocytose du RTSH par des cellules présentatrices d'antigène et la présentation subséquente de fragments peptidiques par les CMH activerait les lymphocytes T autoréactifs. Ceux-ci aideraient les lymphocytes B ayant une reconnaissance antigénique similaire à produire des anticorps de haute affinité, majoritairement de type IgG1 (Weetman *et al.*, 1990). Une infiltration lymphocytaire dans la glande thyroïde est souvent présente chez les patients, causant parfois la formation de centres germinatifs (Weetman *et al.*, 1984). Ces lymphocytes intrathyroïdiens sont une source majeure d'Ac-RTSH. Leur infiltration dépend, entre autres, d'agents capables d'induire la migration leucocytaire au site inflammatoire, comme les chimiokines. Certaines d'entre elles, dont CXCL9 et CXCL10, ont un rôle pathologique important dans les phases initiales de l'atteinte auto-immune de la glande thyroïde (Garcia-Lopez *et al.*, 2001, Romagnani *et al.*, 2002). Le niveau sérique de CXCL10 est augmenté chez les patients atteints de la MG récemment diagnostiqués, contrairement aux individus sains ou ceux atteints d'une hyperthyroïdie non auto-immune (Antonelli *et al.*, 2007). Également, le niveau de CXCL10 est significativement plus élevé chez les patients atteints d'une orbitopathie (Antonelli *et al.*, 2007) et il est proportionnel à

l'activité de l'atteinte ophtalmique (Antonelli *et al.*, 2006). Tout comme les thyrocytes, les fibroblastes de l'orbite sécrètent cette chimiokine, ce qui contribue à l'infiltration leucocytaire et à l'inflammation. Les lymphocytes T autoréactifs rejoindraient l'orbite où ils pourraient lier des peptides du RTSH présentés par des macrophages ou des cellules B et ainsi être activés. Une série de réactions suivant cette infiltration mènerait à la production de cytokines (IL-1, TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$ ) qui activeraient les fibroblastes à produire des glycosaminoglycanes (Weetman, 2000).

### ***Étiologie***

Plusieurs facteurs immunologiques pourraient être impliqués dans l'étiologie de la MG (tableau 9). Les facteurs génétiques contribueraient jusqu'à 80 % des risques de développer la maladie (Brix *et al.*, 2001). Étonnement, l'association entre la MG et des polymorphismes au sein du gène RTSH s'est révélée faible (Ban *et al.*, 2002). En revanche, le gène HLA (*human leucocyte antigen*)-DR3 a été le premier gène de susceptibilité à la maladie découvert (Stenszky *et al.*, 1985), puis d'autres ont été ultérieurement identifiés. Les gènes de type HLA codent pour les molécules du CMH, où certaines de celles-ci pourraient favoriser une présentation conformationnelle favorable d'antigènes à des lymphocytes T autoréactifs pathogéniques. Environ 20 % des risques de développer la MG seraient associés aux facteurs environnementaux comme le tabagisme, la grossesse, le stress, les infections et la radiation (Bartalena, 2013). Ils contribueraient à l'apparition de la maladie chez des individus génétiquement prédisposés en brisant les mécanismes de contrôle permettant le maintien de la tolérance au soi. Par exemple, une augmentation significative de l'incidence de la MG et de l'orbitopathie est associée à l'irradiation du cou pour le traitement la maladie de Hodgkin (Hancock *et al.*, 1991). Les dommages à la glande thyroïde, comme la radiation, mènent à la libération d'antigènes normalement séquestrés qui pourraient favoriser l'apparition de l'auto-immunité en stimulant des lymphocytes autoréactifs.



### Tableau 9. Facteurs immunologiques possibles dans l'étiologie de la maladie de Graves

(De Groot 2012).

- |  |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Persistance des lymphocytes T et B autoréactifs</li> <li>• HLA, CTLA4, et plusieurs autres gènes</li> <li>• Relâche d'antigènes lors de dommages aux thyrocytes</li> <li>• <u>Diminution du nombre ou de la fonction des lymphocytes T de type régulateur</u></li> <li>• Réaction immunologique croisée entre épitopes provenant d'antigènes environnementaux et thyroïdiens</li> <li>• Activation de lymphocytes T par un stimulus polyclonal</li> </ul> |
|--|

#### *Lymphocytes T de type régulateur*

Comme décrit dans les chapitres précédents, les lymphocytes T de type régulateur ont un rôle majeur dans le maintien de la tolérance au soi. Les lymphocytes Treg « naturels » ainsi que les lymphocytes iNKT ont été documentés comme contribuant à la pathogenèse de la MG dans des modèles de souris immunisées génétiquement avec un adénovirus codant pour la sous-unité  $\alpha$  du RTSH. L'incidence et la sévérité de l'hyperthyroïdie sont augmentées suivant le retrait des lymphocytes  $CD4^+CD25^+$  Treg chez des souris résistantes et susceptibles à la maladie, respectivement (Saitoh et Nagayama, 2006). Ces effets semblent être attribuables à l'augmentation de la synthèse d'Ac-RTSH après l'élimination des lymphocytes Treg. En outre, il a récemment été démontré que le nombre de lymphocytes  $CD4^+CD25^+FOXP3^+$  Treg est significativement réduit dans un modèle murin de la MG (Zhou *et al.*, 2012). L'activation des lymphocytes iNKT grâce à l'injection d' $\alpha$ -GalCer permet de prévenir l'apparition de l'hyperthyroïdie et d'inhiber la sécrétion d'IFN- $\gamma$  produit par les lymphocytes autoréactifs (Nagayama *et al.*, 2004).

Plusieurs recherches ont démontré un défaut quantitatif (Klatka *et al.*, 2014, Mao *et al.*, 2011, Marazuela *et al.*, 2006) et fonctionnel (Glick *et al.*, 2013, Mao *et al.*, 2011, Marazuela *et al.*, 2006, Wang *et al.*, 2006) des lymphocytes Treg « naturels » dans le sang périphérique de patients atteints de la MG non traités. En ce qui a trait aux lymphocytes iNKT, deux études ont publié une fréquence périphérique normale chez des patients traités (van der Vliet *et al.*, 2001) et non traités (Roman-Gonzalez *et al.*, 2009).

Ainsi, l'altération du nombre ou de la fonction des lymphocytes T de type régulateur dans l'étiologie de la MG pourrait affecter la balance avec les cellules T autoréactives pathogéniques qui serait critique pour l'apparition de l'auto-immunité. Ce concept existe au sein d'autres maladies auto-immunes, comme le diabète (Bour-Jordan *et al.*, 2004).

### **L'hyperthyroïdie non auto-immune : goitre multinodulaire toxique**

Une autre forme d'hyperthyroïdie est le goitre multinodulaire (GMN) toxique, une condition où la glande thyroïde a au moins deux nodules autonomes fonctionnels qui sécrètent des hormones thyroïdiennes en excès, menant aux symptômes typiques de l'hyperthyroïdie (Siegel et Lee, 1998). La plupart des patients atteints de ce goitre sont âgés de plus de 50 ans et sa prévalence augmente dans les régions où il y a une carence alimentaire en iode. La cause précise de la formation d'un GMN n'est pas connue. Par contre, dans certains cas, il a été démontré qu'elle serait due à des mutations somatiques dans le gène du RTSH, menant à l'activation constitutive du récepteur (Parma *et al.*, 1997). Ces mutations au sein de certains thyrocytes et leur expansion clonale subséquente mènent à la formation de nodules isolés avec une fonction thyroïdienne non régulée (Tonacchera *et al.*, 2000).

Le GMN toxique n'est pas une condition auto-immune; il n'est pas associé à la présence d'anticorps pathogéniques ciblant des protéines de la glande thyroïde ni à l'orbitopathie (Ross, 2011). De la sorte, les patients atteints de ce goitre peuvent être des contrôles dans des projets de recherche visant à dissocier les effets de l'auto-immunité de ceux de l'hyperthyroïdie.

## Le traitement de l'hyperthyroïdie

La MG représente la majorité des cas d'hyperthyroïdie survenant parmi tous les groupes d'âge (Ross, 2011). Il n'existe pas de traitement permettant de guérir la maladie, mais il en existe permettant de soulager les symptômes reliés à l'hyperthyroïdie. Lorsque non traitée, l'hyperthyroïdie peut mener, entre autres, à des problèmes cardiovasculaires (Klein et Ojamaa, 2001). Les trois principaux traitements de l'hyperthyroïdie sont les antithyroïdiens de synthèse (ATS), l'iode radioactif (IR) et la chirurgie. Leurs principaux avantages et désavantages sont énumérés dans le tableau 10.

**Tableau 10. Avantages et désavantages des traitements de la maladie de Graves**  
(Bartalena, 2013)

<b>Traitements</b>	<b>Avantages</b>	<b>Désavantages</b>
Médicaments antithyroïdiens	Aucune hospitalisation requise Faible risque d'hypothyroïdie subséquente Pas d'exposition à la radiation Aucun effet négatif sur l'orbitopathie Sécuritaire durant la grossesse et l'allaitement	Haut taux de rechute Nécessite des visites fréquentes à la clinique pour un suivi Posologie à respecter Effets secondaires indésirables (rarement majeur)
<b>Iode radioactif (<sup>131</sup>I)</b>	Traitement définitif Faible coût Pas d'hospitalisation requise Aucune chirurgie ou anesthésie	Hypothyroïdie permanente Exposition à la radiation Contrôle lent de l'hyperthyroïdie <b>Risque d'apparition ou d'aggravation de l'orbitopathie</b>
Thyroïdectomie	Traitement définitif Pas d'exposition à la radiation Contrôle rapide de l'hyperthyroïdie	Hypothyroïdie permanente Complications potentielles dues aux procédures chirurgicales et à l'anesthésie Coûteux Cicatrice permanente

### *Antithyroïdiens de synthèse*

Les ATS comme le méthimazole ou le propylthiouracile sont souvent utilisés comme traitement initial chez les patients atteints de la MG, mais rarement chez ceux atteints d'un GMN toxique, car la rémission est peu fréquente (Cooper, 2005). L'objectif est de traiter l'hyperthyroïdie du patient en inhibant la synthèse des hormones thyroïdiennes par les thyrocytes. Ces médicaments sont un substrat alternatif de la thyroperoxydase. Cette enzyme catalyse l'ajout de la molécule d'iode sur les résidus tyrosines de la matrice de thyroglobuline, un précurseur dans la formation des hormones thyroïdiennes.

### *Effets sur le système immunitaire*

En plus de leur rôle dans le contrôle de l'hyperthyroïdie, les médicaments antithyroïdiens induisent une modulation de certains procédés immuns chez les patients atteints de la MG. Entre autres, ils induisent une apoptose des lymphocytes intrathyroïdiens (Mitsiades *et al.*, 2000), une diminution sérique du récepteur soluble de l'IL-6 (Salvi *et al.*, 1996), ainsi qu'une diminution sérique de certaines chimiokines, dont CXCL9 et CXCL11 (Antonelli *et al.*, 2013). Récemment, il a été démontré que les ATS peuvent normaliser la fréquence périphérique des lymphocytes Treg (Klatka *et al.*, 2014, Klatka *et al.*, 2014, Mao *et al.*, 2011). En outre, la prise de méthimazole, chez les patients atteints de la MG, induit une diminution du niveau des Ac-RTSH (McGregor *et al.*, 1980). La normalisation des fonctions de la glande thyroïde améliorerait également les symptômes orbitaires en réduisant la réactivité immunologique à l'orbite. Ainsi, les ATS ne sembleraient pas être associés à l'apparition ou à l'aggravation de l'orbitopathie (Bartalena *et al.*, 1998, Bartalena *et al.*, 2000).

Aucun consensus sur la nature des mécanismes d'action des ATS sur le système immunitaire n'a encore vu le jour. Leur action immunomodulatrice pourrait être directe, c'est-à-dire non exercée par l'entremise de la glande thyroïde, et ce, en séquestrant les radicaux dérivés de l'oxygène produits par les macrophages en réponse à divers stimuli (Weetman *et al.*, 1984). Ceci interférerait avec les fonctions de préparation ou présentation

antigénique des macrophages, menant à une diminution de la réponse des cellules T et ultimement à une diminution de la synthèse des auto-anticorps thyroïdiens. Cette réduction a été corroborée par des études démontrant l'activité immunosuppressive des ATS sur la production d'anticorps *in vitro* (Wilson *et al.*, 1988). En opposition, les ATS pourraient agir sur les thyrocytes, donc de façon indirecte sur le système immunitaire. La réduction dans la synthèse des hormones thyroïdiennes et l'amélioration de l'état hyperthyroïdien auraient des effets cumulatifs bénéfiques sur l'immunorégulation et induiraient une chute dans la production d'auto-anticorps (Volpe, 2001).

### ***Iode radioactif***

Depuis les années 1940, l'IR est un traitement utilisé pour contrôler l'hyperthyroïdie chez les patients atteints de la MG ou d'un GMN toxique, où le taux de guérison est similaire (Erem *et al.*, 2004). L'objectif est de traiter l'hyperthyroïdie du patient en détruisant suffisamment le tissu thyroïdien afin d'induire l'hypothyroïdie. Le mécanisme d'action de l'IR est physiologique, car la molécule d'iode est un substrat de la synthèse des hormones thyroïdiennes. L'iode radioactif est transporté activement à l'intérieur des follicules épithéliaux thyroïdiens par un symporteur iode/sodium et est traité de la même manière que l'iode naturel. Il s'accumulera dans l'ensemble des tissus thyroïdiens fonctionnels chez un patient (Gurgul et Sowinski, 2011). L'émission de particules  $\beta$  se solde par une nécrose tissulaire localisée, graduellement menant à une perte de fonction et à une réduction du volume de la glande thyroïde (Mumtaz *et al.*, 2009). L'irradiation de la glande mène à des changements immuns. Par exemple, une hausse de l'activation des lymphocytes T (marqueur HLA-DR) a été démontrée chez les patients atteints de la MG (Teng *et al.*, 1990) et chez ceux atteints d'un GMN (Corrales *et al.*, 1994) traités. Toutefois, l'irradiation mène principalement à des effets immuns distincts; il y a un développement de l'auto-immunité dans la MG.

### *Amplification de l'auto-immunité*

Le traitement à l'IR de la MG a des répercussions importantes sur l'auto-immunité. Il est associé à une augmentation du risque de l'apparition ou de l'aggravation de l'orbitopathie en comparaison avec les ATS (Bartalena *et al.*, 1998, Traisk *et al.*, 2009). De plus, ce traitement induit une augmentation du niveau d'Ac-RTSH qui persistera au-dessus des valeurs initiales jusqu'à un an après le traitement des patients atteints de cette maladie (Laurberg *et al.*, 2008). Dans cette étude, il a été démontré que la rémission de l'auto-immunité au RTSH est moins fréquente après le traitement à l'IR qu'après les autres types de traitements. En effet, les ATS ou la chirurgie induisent une diminution du niveau des Ac-RTSH en vue d'une disparition de ceux-ci dans 70-80 % des patients après 18 mois. Ultimement, l'ensemble de ces études révèle que le traitement à l'IR de la MG favorise l'auto-immunité. En opposition, le traitement à l'IR n'induit pas l'auto-immunité chez des patients atteints d'une hyperthyroïdie non auto-immune comme le GMN.

Les causes de l'amplification de l'auto-immunité suivant le traitement à l'IR de la MG ne sont pas connues. Une explication partielle a été proposée où l'irradiation de la glande induirait une relâche d'antigènes thyroïdiens, dont l'auto-antigène RTSH, qui stimulerait la production d'Ac-RTSH par les cellules autoréactives (Gurgul et Sowinski, 2011). Comme mentionné précédemment dans l'étiologie de la MG, la perturbation du nombre ou de la fonction des lymphocytes T de type régulateur pourrait modifier la balance avec les cellules T autoréactives pathogéniques, ce qui serait critique pour l'apparition de l'auto-immunité. Cette notion n'a toutefois jamais été transposée à la fenêtre temporelle suivant le traitement à l'IR afin de mieux comprendre les effets immunologiques observés. Les lymphocytes T de type régulateur n'ont que très peu été étudiés dans le contexte du traitement à l'IR de la MG : une seule étude a évalué le nombre de lymphocytes Treg post-traitement (Pan *et al.*, 2009), et aucune sur les lymphocytes iNKT. Pourtant, ces lymphocytes ont un rôle central dans la régulation de l'auto-immunité et de la tolérance au soi.

### *Prétraitement avec un antithyroïdien de synthèse*

La prise d'ATS en vue d'un traitement à l'IR est parfois réalisée chez certains patients afin d'utiliser les hormones thyroïdiennes accumulées dans les colloïdes de la glande et diminuer le risque d'exacerbation de l'hyperthyroïdie (Cooper, 2005). Ce prétraitement est arrêté au moins 7 jours avant l'IR et n'interfère pas avec son efficacité (Andrade *et al.*, 2001, Bonnema *et al.*, 2002).

Une hausse atténuée du niveau d'Ac-RTSH dès les 30 premiers jours suivant le traitement à l'IR a été démontrée chez des patients ayant reçu une médication antithyroïdienne (méthimazole) avant le traitement radical (Andrade *et al.*, 2004). L'action modulatrice des ATS précédemment mentionnée pourrait ainsi avoir un impact sur les effets immunologiques observés après le traitement à l'IR.



## **Hypothèse**

Nous avons émis l'hypothèse que l'amplification de certains processus auto-immuns après le traitement à l'IR de la MG résulte d'une perte de régulation des cellules T autoréactives par les lymphocytes T de type régulateur, puisque ceux-ci ont un rôle déterminant dans le contrôle de l'auto-immunité.

## ***Objectifs***

L'objectif principal de nos recherches était d'étudier le déséquilibre immunitaire potentiel dans la fenêtre temporelle suivant le traitement à l'IR de patients atteints de la MG. Pour ce faire, nous avons analysé la fréquence périphérique des lymphocytes Treg et des lymphocytes iNKT. Nous nous sommes également intéressés à la fonction suppressive ainsi qu'aux mécanismes d'action des lymphocytes Treg. Finalement, nous avons étudié les effets d'un prétraitement avec un ATS sur l'ensemble des paramètres immuns analysés dans le cadre du traitement à l'IR. Afin de dissocier les effets de l'auto-immunité de ceux de l'hyperthyroïdie, nous avons inclus des patients atteints d'un GMN dans le projet de recherche.

## ARTICLE

### **Impaired Immune Regulation after Radioiodine Therapy for Graves' Disease and the Protective Effect of Methimazole**

Auteurs de l'article: Sarah Côté-Bigras<sup>1</sup>, Viet Tran<sup>1</sup>, Sylvie Turcotte<sup>1</sup>, Marek Rola-Pleszczynski<sup>1</sup>, Jean Verreault<sup>2</sup>, Diane Rottembourg<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Département de pédiatrie, <sup>2</sup>Département de médecine nucléaire et radiobiologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé du Centre hospitalier de l'Université de Sherbrooke, Sherbrooke (QC) J1H5N4, Canada

**Statut de l'article:** Soumis

**Avant-propos:** Je suis l'unique première auteure de cet article. J'ai rédigé le texte, et par la suite, apporté les modifications nécessaires suivant les corrections de mes directeurs de recherche. J'ai effectué toutes les expériences techniques et les analyses présentées dans cet article.

## Résumé

**Contexte :** Les traitements de la maladie de Graves (MG), soit l'iode radioactif (IR) et les antithyroïdiens de synthèse (ATS), ont été décrits comme ayant des effets immunitaires spécifiques.

**Objectifs :** Nous avons étudié les effets du traitement à l'IR sur des populations lymphocytaires impliquées dans la régulation immunitaire.

**Conception :** Nous avons mené une étude prospective avec un suivi de 30 jours sur une cohorte adulte de patients en 2013-2014.

**Patients :** Les patients éligibles à un traitement à l'IR ont été recrutés au département de médecine nucléaire et radiobiologie de la Faculté de médecine et des sciences de la santé et du Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke. Vingt-sept patients atteints de la MG ont été recrutés, parmi lesquels onze ont été traités avec un ATS (méthimazole). Cinq patients atteints d'un goitre multinodulaire (GMN) ont été recrutés comme témoins hyperthyroïdiens, ainsi que vingt-deux individus sains (*healthy subjects*; HS).

**Méthodes principales :** Dans le cadre du traitement à l'IR, la fréquence des lymphocytes T régulateurs (Treg) et invariants *Natural Killer T* (iNKT), ainsi que la fonction et les mécanismes sous-jacents des lymphocytes Treg ont été analysés dans le sang périphérique.

**Résultats :** La variation de la fréquence périphérique des lymphocytes Treg et des lymphocytes iNKT après le traitement à l'IR était plus élevée chez les patients atteints de la MG que chez les témoins (HS :  $p < 0.0001$  et  $p = 0.0023$ , GMN:  $p = 0.039$  et  $p = 0.0176$ , respectivement). La fonction suppressive des lymphocytes Treg était moins efficace après le traitement à l'IR chez les patients atteints de la MG en comparaison aux témoins ( $p < 0.01$ ). Le prétraitement avec un ATS a modéré ces résultats : une plus faible variation de la fréquence des lymphocytes Treg ( $p = 0.0394$ ), une tendance à un moins grand défaut de suppression ( $p > 0.05$ ) et une prévention de la réduction du niveau des cytokines suppressives ( $p < 0.05$ ).

**Conclusions :** Suivant le traitement à l'IR, un défaut des lymphocytes T de type régulateur a été observé chez les patients atteints de la MG, et partiellement rétabli par un prétraitement au méthimazole. Cette étude contribue à de nouvelles perspectives sur la régulation immunitaire déficiente après le traitement de l'hyperthyroïdie auto-immune.

## Abstract

**Context:** Both therapies for Graves' disease (GD), radioactive iodine (RAI) and antithyroid drugs (ATD) were reported to have specific immune effects.

**Objectives:** We aimed at investigating the effects of RAI therapy on cellular subsets involved in immune regulation.

**Design:** We conducted a thirty day follow-up prospective cohort study of adult patients in 2013-2014.

**Patients and Setting:** Patients eligible for RAI therapy at our center were approached. Twenty seven patients with GD were recruited, among whom 11 were treated with Methimazole. Five patients with multinodular goiter (MNG) were recruited as hyperthyroid controls. Twenty-two healthy subjects were also studied.

**Main Outcome Measures:** Over time, frequency of regulatory T cells (Treg) and of invariant natural killer T cells (iNKT), along with Treg cell-mediated suppression and underlying mechanisms were monitored in the peripheral blood.

**Results:** Variance in frequency of Treg and iNKT after RAI therapy was higher in GD patients than in controls (HS:  $p < 0.0001$  and  $p = 0.0023$ , MNG:  $p = 0.039$  and  $p = 0.0176$ , respectively). The Treg suppressive function was less efficient after RAI therapy in GD patients compared to controls ( $p < 0.01$ ). ATD medication prior to RAI dampened these outcomes: less variation of Treg frequency ( $p = 0.0394$ ), a trend toward less impaired Treg function ( $p > 0.05$ ), and prevention of reduced levels of suppressive cytokines ( $p < 0.05$ ).

**Conclusions:** Shortly after RAI therapy, alterations in immunoregulatory cells in patients with GD were observed and partially prevented by an ATD pretreatment. To explain the worsening of autoimmunity after RAI, previous studies focused on mechanisms of enhanced immune activity. This study adds new highlights on immune regulation deficiencies after therapeutic interventions in thyroid autoimmunity.

## Introduction

Graves' disease (GD) is a thyroid autoimmune disease that implicates a failure of tolerance to thyroid self-antigens, predominantly the thyroid-stimulating hormone receptor (TSHR) (1). TSHR expressed on orbital fibroblasts (2) is thought to be the target of TSHR-Ab, triggering an immune cascade causing Graves' Orbitopathy (GO) (3). The failure of tolerance in GD may be attributed to regulatory cell dysfunction, because of their role in suppressing auto-reactive cells (4-5).

Two regulatory immune cell subsets have been previously studied in GD patients (6-7) : Regulatory T cells (Treg) and invariant Natural Killer T cells (iNKT). Their potential role in GD pathogenesis was documented in mouse models (8-9). The Treg population in untreated GD patients was assessed in various studies and contradictory results were published, including increase (6) or reduction (10-11) in their peripheral frequency, and impaired (6, 10, 12) or normal (13) regulatory function. As for the iNKT, prior studies described a normal peripheral frequency of iNKT cells in treated (14) and untreated (15) GD patients.

Antithyroid drugs (ATD) may have effects on the immune regulatory cells (16). For example, in GD patients taking methimazole, a decrease in TSHR-Ab levels (17) and an increase in peripheral activated Treg (11, 18) were described.

Radioactive iodine (RAI) therapy is known, however, to induce or aggravate GO (19-20) and to increase TSHR-Ab (21) levels in GD patients. The question then arises as to why RAI therapy would trigger a flare up of autoimmunity? We hypothesized it could result from a loss of regulation of TSHR-reactive cells by regulatory cells. The two regulatory cell subsets described above have not yet been fully investigated in the context of RAI therapy (13). Additionally, ATD can be used as a preparative approach before RAI therapy in chosen patients (22). There is an attenuated rise in TSHR-Ab levels as soon as 30 days after RAI therapy when patients had received Methimazole before RAI therapy (23).

To investigate the potential alterations in regulatory cells following RAI therapy of GD patients, we intended to determine first the peripheral frequency of iNKT and Treg, and second the Treg function. In accordance with the immunomodulatory action of ATD

previously mentioned, we expected to observe a different course of immune effects in patients taking ATD medication before RAI.

## Materials and Methods

### Subjects

Patients with recently diagnosed GD and eligible for RAI therapy were recruited at the Department of Nuclear Medicine, Sherbrooke University Hospital. Clinical informations included: age, sex, previous ATD treatment, TSHR-Ab titers, free thyroxine level and orbital signs, though GO was not always validated by an ophthalmologist.

Cohorts' characteristics are summarized in Table 1. GD was diagnosed in 27 patients (23 with recent-onset) and was defined as biochemical hyperthyroidism associated with high diffuse uptake on the thyroid scan. Positive TSHR-Ab were found in 15/17 tested patients. Eleven patients out of this cohort were treated with ATD (Methimazole) (G-ATD subcohort) before undergoing RAI therapy. Within the G-ATD cohort, 2 patients had long standing GD and 9 patients had recent-onset disease. Median ATD treatment duration was 4 weeks (range: 1 to 8 weeks). The drug was discontinued at least 7 days before RAI therapy. Hypothyroidism post RAI therapy was defined as  $T4 < 11$  nmol/L or low T4 values with  $TSH > 10$  mUI/L. Non-autoimmune multinodular goiter (MNG) disorder was diagnosed by a state of hyperthyroidism and the presence of non diffuse uptake on the thyroid scan. None of the MNG patients had ATD before RAI therapy. Healthy subjects (HS) with no history of thyroid disease were also recruited as controls. Informed consent was obtained from all subjects. The study was approved by the Local Ethics Committee.

**Table 1. Cohorts' characteristics**

Characteristic	G ( <i>n</i> = 27)		MNG ( <i>n</i> = 5)	HS ( <i>n</i> = 22)
	G-no ATD ( <i>n</i> = 16)	G-ATD ( <i>n</i> = 11)		
<b>Age : mean (range)</b>	46 (22-66)	36 (19-60)	68 (59-74)	38 (22-67)
<b>Female/male</b>	15/1	10/1	4/1	14/8

G: Graves' disease; G-no ATD: Graves' disease patients who did not take ATD before RAI therapy; G-ATD: Graves' disease patients who did take ATD before RAI therapy; MNG: Multinodular goiter; HS: Healthy subjects.

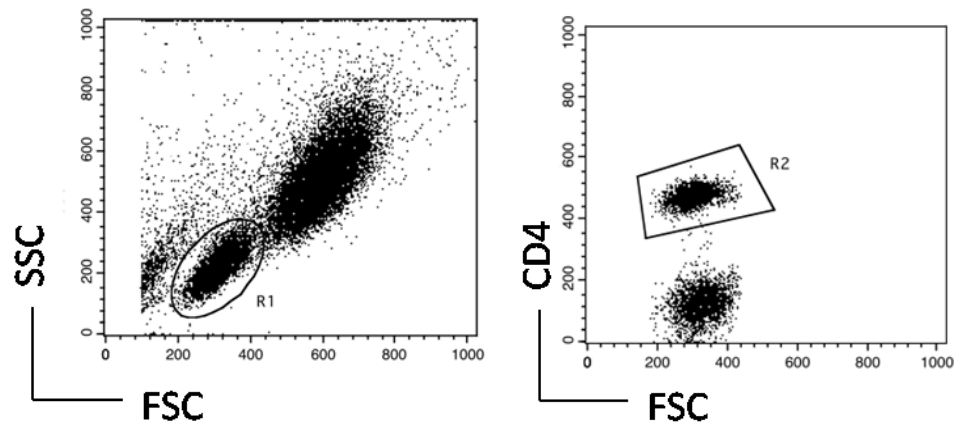
### Blood sampling

Peripheral blood from GD and MNG patients was collected prior RAI therapy and approximately 30 days after RAI. This schedule was chosen because previous studies assessing TSHR-Ab after RAI treatment have shown a significant rise at 30 days, in particular when comparing ATD-treated and untreated patients (23). HS were therefore asked for successive blood samples over the same time period.

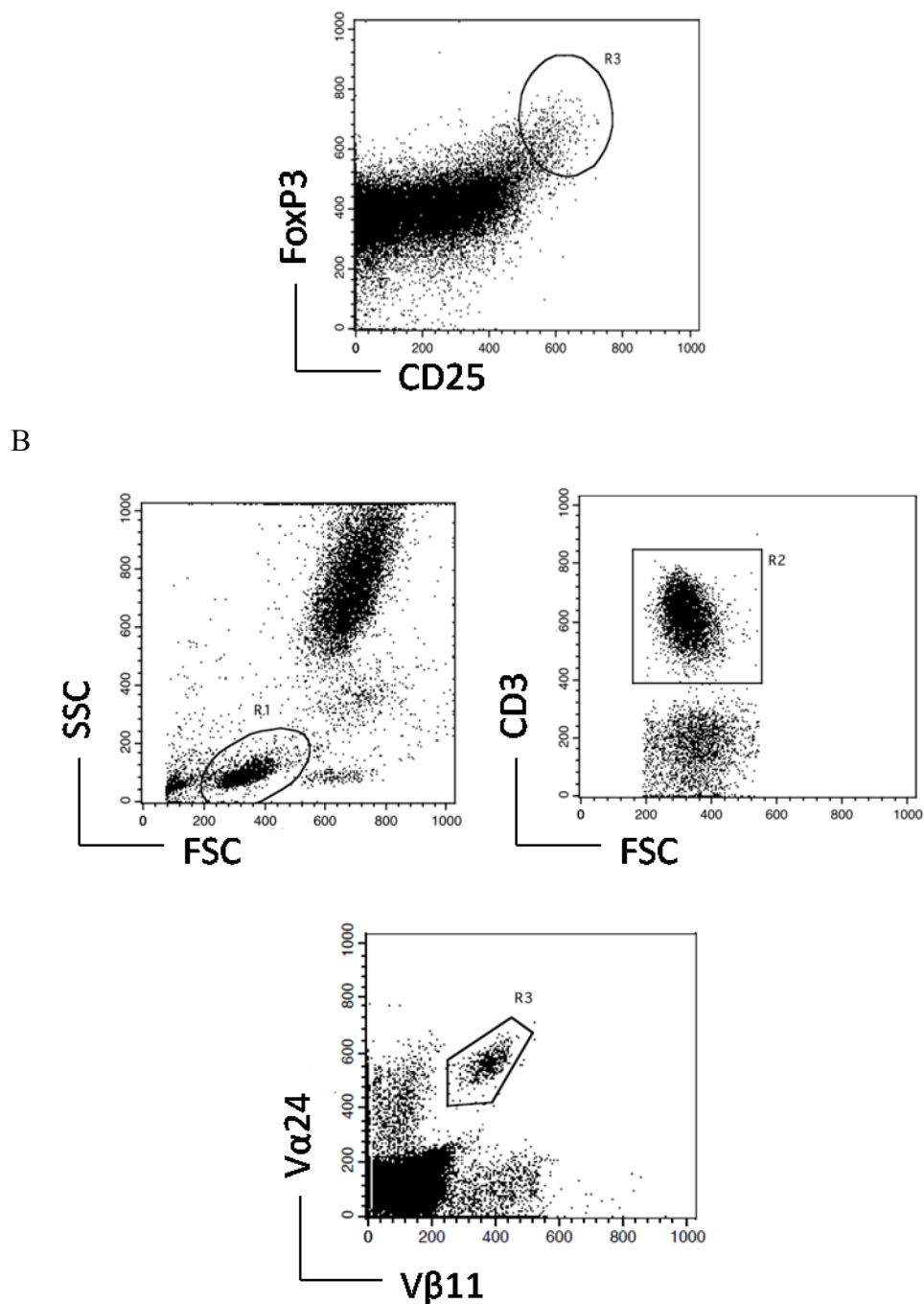
### Flow cytometry

Whole blood cells were stained respectively with anti-CD4-FITC (clone RPA-T4, BD Biosciences), anti-CD25-PE (clone 2A3, BD Biosciences) and anti-FoxP3-APC (clone PCH101, eBioscience) for identifying the Treg subset and with anti-TCR V $\alpha$ 24-PE (clone C15, Beckman-Coulter), anti-TCR V $\beta$ 11-FITC (clone C21, Beckman-Coulter), and anti-CD3-APC (clone UCHT1, BD Biosciences) for identifying the iNKT subset. Intracellular FoxP3 staining was thereafter performed for one hour on ice after cells had been permeabilized (FACS Permeabilizing Solution 2, BD Biosciences). The samples were acquired by flow cytometry using a FACSCalibur. Corresponding isotype controls were used to determine the gating parameters when necessary. Data analysis was done using a Cellquest software (BD Biosciences), and gating strategy is illustrated in Supplemental Fig. 1.

A







**Supplemental Figure 1. Gating strategy to define Treg and iNKT cell subsets.**

(A) Representative scatter plots showing: the lymphocyte gate (R1), CD4<sup>+</sup> cells (R2), CD4<sup>+</sup> cells with CD25 and FoxP3 co-expression (R3). (B) CD3<sup>+</sup> cells expressing Vα24 and Vβ11 TCR chains (R3) in cells acquired from one mL of blood.

### **PBMCs isolation**

Whole blood samples were diluted 1:1 with RPMI 1640 medium (Multicell, Wisent Inc.). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were subsequently isolated by density gradient centrifugation (Ficoll-Paque, GE Healthcare Life Sciences) and immediately frozen in 10% DMSO human serum (HS; Male Type AB, Sigma-Aldrich).

### **CFSE labelling of PBMCs**

Thawed PBMCs were collected in AIM-V medium (Invitrogen/Gibco) prewarmed to 37°C and washed twice. Preceding Treg isolation,  $5 \times 10^6$  PBMCs were put aside (kept at 4°C) prior to carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) staining for 10 min at 37°C (Sigma-Aldrich). Cells were washed twice with cold 5% HS RPMI 1640. At last, CFSE-labelled PBMCs were resuspended in 5% HS X-VIVO™15 media (Lonza).

### **Regulatory T cells isolation**

Surface marker CD127 (IL-7 receptor  $\alpha$ -chain) can be used to purify human Treg cells. Past studies showed that its expression inversely correlates with the suppressive function of Treg (Liu *et al.*, 2006). Consequently, the human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>dim/-</sup> Regulatory T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec) was used to magnetically separate Treg from PBMCs. A purity of FoxP3<sup>+</sup> cells of >90% was confirmed in isolated Treg by flow cytometry (data not shown). Within the same day, Treg from the same donor were independently isolated from samples obtained at day 0 and day 30. Ultimately, Treg from each sample were resuspended in 5% HS X-VIVO™15 prior to suppression assays.

### **Suppression assay and analysis of proliferation**

Cultures were carried out in 200 $\mu$ l total volume of 5% HS X-VIVO™15 media and CFSE-labelled PBMCs ( $1 \times 10^5$ /well) were stimulated with anti-CD28 mAb (2  $\mu$ g/mL; clone CD28.2, BD Biosciences) and anti-CD3 mAb (2  $\mu$ g/mL; clone OKT3, eBioscience) in duplicates, in 96-well round-bottom plates (Corning) for 3 and half days. After centrifugation, cell-free culture supernatants were collected and stored frozen at -80°C. The pellets were resuspended in PBS and stained with anti-CD8-APC (clone RPA-T8, BD Biosciences) to monitor CD8<sup>+</sup> T cell proliferation of CFSE-labelled PBMCs by flow

cytometry. The analysis of the CD4<sup>+</sup> T cell subset would not have been possible because there is no possibility to exclude CD4<sup>+</sup> Treg from the analysis. The proliferation was analysed using the ModFit LT for Win32 software. Gates were restricted on CD8<sup>+</sup> cells among the CFSE-labelled ones. The Proliferation Index (PI) obtained is the sum of the cells in all generations divided by the computed number of original parent cells theoretically present at the start of the experiment. It is a measure of the increase in cell number in the culture over the course of the experiment. The PI was transformed in percentage of suppression using the formula:  $100 - (\text{PI in presence of Treg} / \text{PI in absence of Treg}) \times 100$ .

### **Measurement of cytokine levels**

In the supernatants, IL-10 and TGF- $\beta$ 1 were measured, in duplicates, using ELISA kits (BioLegend).

### **Neutralization assay**

Neutralizing anti-IL-10 Ab, anti-LAP TGF- $\beta$ 1 Ab (both 10  $\mu$ g/mL final concentration; R&D Systems) or corresponding isotype control was added in the suppression assay experiment.

### **Soluble mediators of suppression**

One hundred  $\mu$ l of supernatant (kept frozen) collected from CFSE-labelled PBMCs cultured alone, and from co-cultures in presence and absence of Treg, were subsequently added to CFSE-labelled PBMCs ( $1 \times 10^5$ /well). Culture conditions were the same as described in the *Suppression assay* paragraph.

### **Statistical analysis**

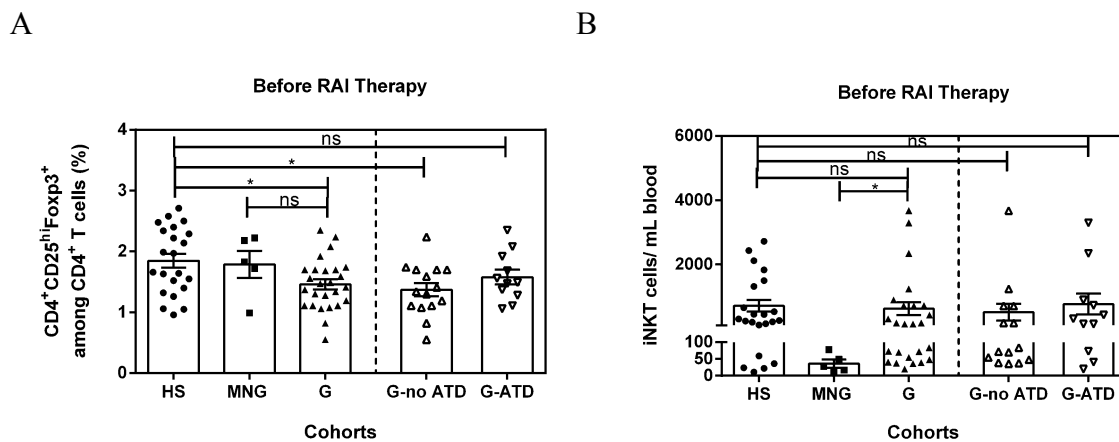
Analysis was achieved with GraphPad Prism version 6.04 for Windows (GraphPad Software). For all tests,  $p$  values  $<0.05$  were considered significant. An assessment of the normality of data was systematically performed using the D'Agostino-Pearson omnibus test. Comparisons between peripheral blood proportions of Treg were made with One-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test and of iNKT with Kruskal-Wallis ANOVA followed by Dunn's multiple comparisons test. Peripheral variation of regulatory

T cell subsets was analysed by a Brown-Forsythe test followed by an F test to compare variances. Differences between percentages of suppression following RAI therapy were analysed with Kruskal-Wallis ANOVA followed by Dunn's multiple comparisons test. Two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test was used to analyse cytokine concentrations. At last, suppressive assays with supernatants were analysed by a One-way ANOVA. Sex was not considered a factor in the statistical analysis of the data.

## Results

### Antithyroid medication modulates frequency of peripheral Treg but not iNKT cell in patients with Graves' disease

As for any autoimmune process, the question arises whether the regulatory compartment is altered. The first simplistic way to assess this is to get a picture of the relative frequency of these cells in the peripheral blood. Circulating Treg and iNKT were analysed in GD patients (G,  $n = 26$ ), in healthy volunteers (HS,  $n = 22$ ), and patients with MNG (MNG,  $n = 5$ ). This latter group was chosen to find out whether the hyperthyroid state could influence the immune parameters at stake in our study. We found a lower frequency of  $CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$  Treg cells in G patients compared to HS ( $p < 0.05$ ) (Fig. 1A). However, only G patients not taking antithyroid medication (G-no ATD,  $n = 16$ ) showed a reduced frequency of Treg. In contrast, we observed a comparable frequency of  $V\alpha 24^+V\beta 11^+CD3^+$  iNKT cells per one mL of blood in G patients and controls, regardless of the use of ATD ( $p > 0.05$ ) (Fig. 1B). Lower iNKT cell frequency was observed in MNG in comparison with G patients ( $p < 0.05$ ).



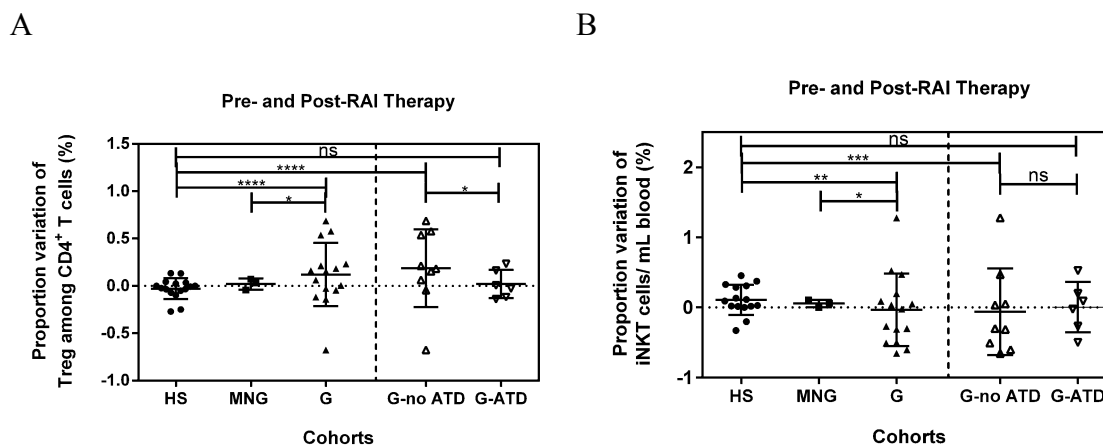
**Figure 1. Frequency of peripheral Treg and iNKT in healthy subjects (HS), hyperthyroid controls (MNG), and Graves' disease patients (G) sorting out those taking antithyroid medication (G-ATD) or not (G-no ATD).**

A) Whole blood cells were stained for intracellular FoxP3 after CD4 and CD25 surface staining to determine Treg cells. Cumulative data of the proportion of  $CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$  Treg cells over the total peripheral  $CD4^+$  T cells in HS ( $n = 22$ ), MNG patients ( $n = 5$ ), G patients ( $n = 26$ ), G-no ATD patients ( $n = 15$ ), and G-ATD patients ( $n = 11$ ) are depicted. (B) Whole blood cells were stained for CD3,  $V\alpha 24$  and  $V\beta 11$  to define the iNKT subset.

Cumulative data of the number of  $V\alpha 24^+V\beta 11^+CD3^+$  iNKT cells acquired in one mL of blood in HS ( $n = 22$ ), MNG patients ( $n = 5$ ), G patients ( $n = 25$ ), G-no ATD patients ( $n = 14$ ), and G-ATD patients ( $n = 11$ ) are shown. All data on graphs are displayed as the mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , ns: not significant.

### **Radioiodine therapy induces variation in the frequency of peripheral Treg and iNKT cells in patients with Graves' disease and prior antithyroid medication dampens this variation**

Immune perturbances occur after RAI therapy and are not observed after thyroid surgery, another radical therapy (21). These perturbances are 1- a rise in antibodies directed against the main auto-antigen TSHR, and 2-clinically, a worsening of orbitopathy. As we expected the regulatory cells to be important players in these perturbances, we were interested in variation of peripheral Treg and iNKT frequency. As illustrated in Fig. 2A, a greater variance in Treg cell frequency was seen in RAI-treated G patients ( $n = 15$ ) compared to untreated HS over the same time period ( $n = 16$ ) ( $p < 0.0001$ ). ATD pretreatment had a significant impact by decreasing this variance (G-ATD subcohort,  $n = 6$ ) ( $p = 0.0394$ ). We also verified whether variance of Treg was present in patients treated with RAI for a non autoimmune hyperthyroid condition (MNG patients,  $n = 3$ ): a variation in Treg frequency was observed in MNG in comparison to G patients ( $p = 0.039$ ). Finally, the frequency of iNKT cells prior and after RAI therapy was assessed in the same groups of patients and controls (Fig. 2B). We found a significant variation in  $V\alpha 24^+V\beta 11^+CD3^+$  iNKT cell proportion in RAI-treated G patients compared to the controls (HS:  $p = 0.0023$ , MNG:  $p = 0.0176$ ). However differing from Treg, there was no difference in the variance between both G subcohorts ( $p = 0.2467$ ).



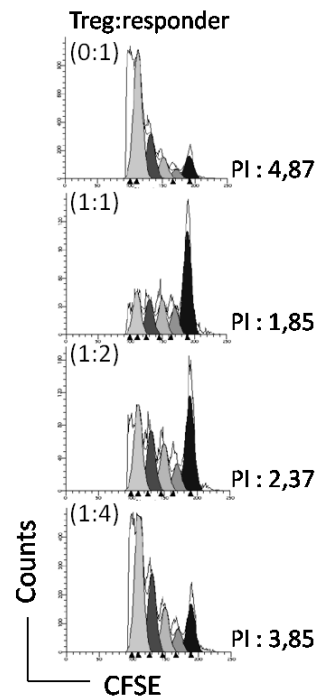
**Figure 2. Proportion variation in frequency of peripheral Treg and iNKT before and after radioiodine therapy in hyperthyroid patients (G and MNG) and over the same time period in healthy subjects.**

(A) Each data of the proportion variation of  $CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$  Treg cells over the total peripheral  $CD4^+$  T cells in HS ( $n = 16$ ), MNG patients ( $n = 3$ ), G patients ( $n = 15$ ), G-no ATD patients ( $n = 9$ ), and G-ATD patients ( $n = 6$ ) are shown. (B) Proportion variations of the number of  $V\alpha 24^+V\beta 11^+CD3^+$  iNKT cells acquired in one mL of blood in HS ( $n = 15$ ), MNG patients ( $n = 3$ ), G patients ( $n = 15$ ), G-no ATD patients ( $n = 9$ ), and G-ATD patients ( $n = 6$ ) are displayed individually. All data are presented as the variation of the proportion using the formula:  $[\text{Number of cells from (Sample post RAI/Sample pre RAI)}] - 1$ , and presented on graphs as the mean  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ , ns: not significant.

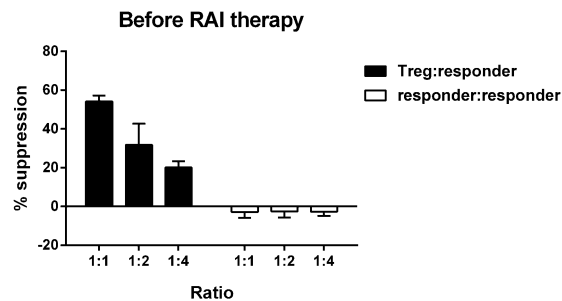
### Radioiodine therapy impairs Treg suppressive function in patients with Graves' disease

With the observation of high variation of Treg frequency following RAI therapy, we were interested in evaluating the suppressive capacity of Treg in G patients in the same time window. To minimize bias in our experimental setting, we decided to test in parallel the suppressive function of the 2 Treg populations of interest (pre and post RAI) in culture with 1 population of responder cells (arbitrarily the pre RAI sample). For healthy controls who did not receive RAI, Treg from two successive samples over the same period of 30 days were used. CFSE-labelled PBMCs were cultured alone (0:1) or with various Treg ratios (1:1, 1:2 and 1:4) (Supplemental Fig. 2A). To confirm that suppression was not mediated by high cell number or by nutrient uptake, control experiments were done where the CFSE-labelled PBMCs were co-cultured with the same ratios of non-labelled PBMCs (Supplemental Fig. 2B).

A



B



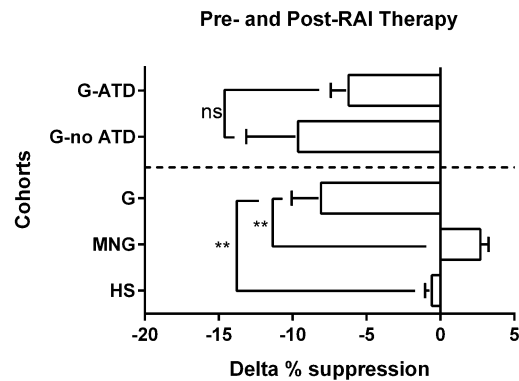
### Supplemental Figure 2. Representative suppression assay.

(A) Stimulated PBMCs were cultured alone (ratio Treg:responder of 0:1) or with Treg at various ratios (1:1, 1:2 and 1:4). CFSE dilution graphs from a representative assay showed Treg suppressive capacity up to 1:4 ratio. The corresponding Proliferation Index (PI) was calculated using the ModFit LT for Win32 software. (B) Suppression assay with co-culture with Treg or non-labelled PBMC. Representative data on graphs are presented as the mean  $\pm$  SEM

The suppressive capacity of Treg cells from G patients ( $n = 11$ ), MNG patients ( $n = 3$ ) and HS ( $n = 11$ ) was evaluated. Data for each donor are represented as a “delta” which is their percentage of suppression at day 30 minus their initial one. As presented in Fig. 3, a



reduced suppressive effect (mean of  $-8.08\% \pm 1.98$ ) was seen in RAI-treated G patients ( $p < 0.01$ ). The defective suppressive function of Treg was similar between the G-no ATD subcohort ( $n = 6$ ) and the G-ATD one ( $n = 5$ ;  $p > 0.05$ ), although there might be a tendency to a less impaired function in G patients who had ATD before RAI. The suppressive function of Treg from MNG patients and HS was similar over time (HS), or after RAI therapy (MNG). We did not expect the function of Treg to change over time in HS subjects, so these results contributed to validate our experimental setting. Finally, we had assumed that the responder cells isolated from G patients would have a normal function. This was indirectly confirmed with a cross-match experiment: responder cells from one G patient were cultured with their own Treg and with Treg from one HS. The proliferation index of CFSE-labelled PBMCs from G patients was similar to HS when cultured alone. Suppressive capacity was identical in both conditions, supporting a normal function of responder T cells used in our experiments ( $n = 2$ , data not shown).

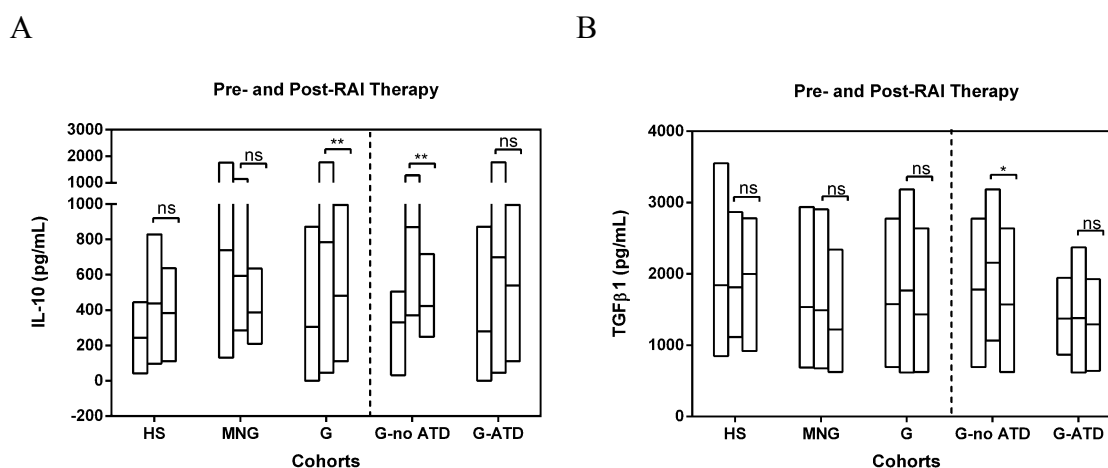


**Figure 3. Treg suppressive capacity assessed before and after radioiodine therapy.**

CFSE-labelled PBMCs were stimulated with anti-CD3+anti-CD28 and cultured alone or with Treg obtained at 2 time points (before and after RAI therapy). A ratio of Treg:responder of 1:1 was used. The proliferation of CFSE+CD8<sup>+</sup> T cells was analysed by flow cytometry. Data for each participant were assessed by the delta percent suppression, which is their percentage of suppression after RAI treatment minus their initial one. Cumulative data on graphs are displayed as the mean  $\pm$  SEM in HS ( $n = 11$ ), MNG patients ( $n = 3$ ), G patients ( $n = 11$ ), G-no ATD patients ( $n = 6$ ), and G-ATD patients ( $n = 5$ ). \*\* $p < 0.01$ , ns: not significant.

### Radioiodine therapy affects the production of IL-10 and TGF- $\beta$ 1 in our *in vitro* suppression assay, in patients with Graves' disease not taking ATD

In our system, we investigated the Treg-mediated suppression involving secretion of IL-10 and TGF- $\beta$ 1, both inhibitors of effector T cell responses (25). Concentration of these cytokines was measured by ELISA in the supernatants of suppression assays using cells from G patients ( $n = 10$ ), MNG patients ( $n = 3$ ) and HS ( $n = 9$ ) (Fig. 4A and 4B). All cohorts exhibited similar levels of IL-10 and TGF- $\beta$ 1 when PMBC responders were cultured alone (ratio 0:1;  $p > 0.05$ ). When Treg were added to the cultures, HS and MNG patients exhibited comparable levels of these suppressive cytokines (ratios 1:1;  $p > 0.05$ ) over time (HS) or after RAI (MNG). However, G patients had significant lower levels of IL-10 in the co-culture supernatant after RAI treatment (Fig. 4A;  $p < 0.01$ ). Lower levels of IL-10 were only observed in the G-no ATD subcohort ( $n = 5$ ;  $p < 0.01$ ). The latter group of patients also had a significant reduction in TGF- $\beta$ 1 levels in post vs pre RAI samples (Fig. 4B;  $p < 0.05$ ).



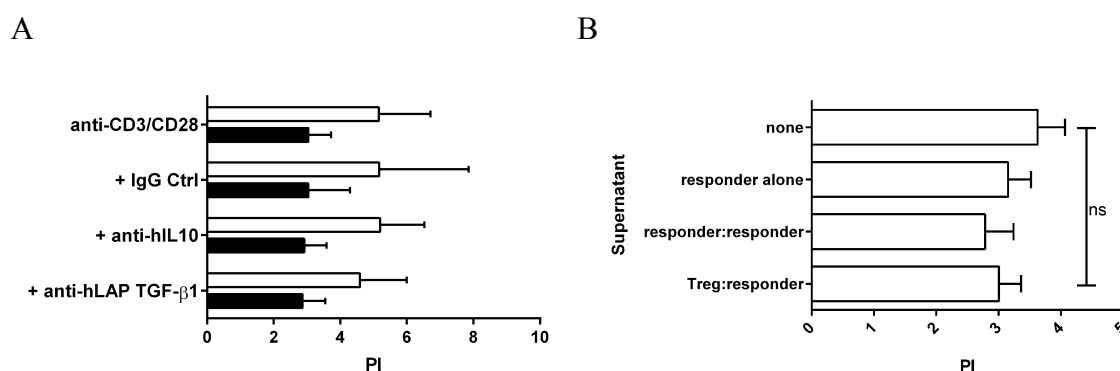
**Figure 4. IL-10 and TGF- $\beta$ 1 levels were assessed in the supernatants of suppression assays before and after radioiodine therapy.**

Concentration of (A) IL-10 and (B) TGF- $\beta$ 1 was measured by ELISA in the supernatants of HS ( $n = 9$ ), MNG patients ( $n = 3$ ) and G patients ( $n = 10$ ) suppression assays. In these assays, responder cells were cultured alone (left bars) or with Treg from pre RAI therapy samples (middle bars) and post RAI therapy samples (right bars). Floating bars on graphs are represented as the minimal and maximal data with a line at mean. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , ns: not significant.

### In our suppression assay, Treg-mediated suppression does not appear to rely on IL-10, TGF- $\beta$ 1, or other soluble factors

As we found in parallel decreased Treg function and decreased IL10/TGF- $\beta$ 1 levels, we were wondering whether there was a causality link. Neutralizing anti-IL-10, anti-LAP TGF- $\beta$ 1 or corresponding isotype control antibodies were added in the cultures and co-cultures (ratio Treg:responder of 1:1) of suppression assays. These experiments were performed only with samples of HS ( $n = 3$ ). Neutralizing experiments revealed that Treg-mediated suppression of CD8<sup>+</sup> T cell responders was independent of IL-10 and TGF- $\beta$ 1 cytokines. The PI at baseline (ratio of 0:1) was not affected by the subsequent addition of any of the antibodies (Fig.5A).

We next investigated whether any other soluble products would take part in the suppressive ability of Treg. Supernatants were collected from polyclonally stimulated PBMC cultures in the absence (0:1), or presence (1:1) of Treg. The samples were obtained from HS ( $n = 4$ ). One hundred  $\mu$ l of supernatant were added to CFSE-labelled PBMCs ( $1 \times 10^5$ /well), and cultured in the same condition as the initial assay. As shown in Fig. 5B, there was no significant difference in the PI of CD8<sup>+</sup> T cell responders cultured alone (no supernatant) or with distinct supernatants recovered from previous assays ( $p > 0.05$ ).



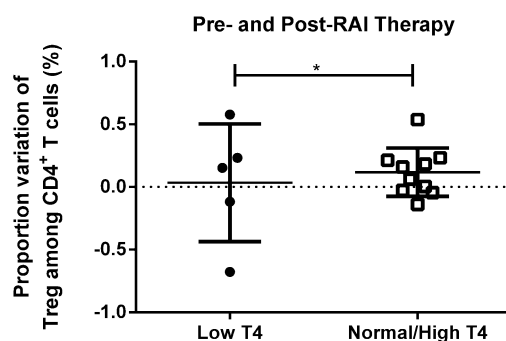
**Figure 5. Neutralizing experiments using antibodies or recovered supernatants in Treg suppression assays.**

(A) CFSE-labelled PBMCs alone (white bars) or with Treg (black bars) were cultured with an anti-CD3/CD28 stimulation and acquired by FACS. At the beginning of the neutralizing experiments in HS ( $n = 3$ ), 10  $\mu$ g/mL final concentration of anti-LAP TGF- $\beta$ 1, or anti-IL-10, or an IgG control, were added in the appropriate wells. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM (B) The role of soluble mediators of suppression was investigated by adding 100  $\mu$ l of supernatant to PBMC. Results from experiments with HS ( $n = 4$ ) representing the PI of

PBMC cultured alone (none) or with a distinct supernatant from past cultures (responder alone) and co-cultures (responder:responder, and Treg:responder) are displayed on graph as the mean  $\pm$  SEM. *ns*: not significant.

### Clinical variables analysis

Information was taken from the patient's medical records to investigate a potential correlation between the clinical data and regulatory cell frequency and function. Several studies have linked post RAI hypothyroidism to development or worsening of TAO (26). Five patients presented with hypothyroidism at 1 month post RAI: the variation of Treg frequency was greater in this subcohort (Supplemental Fig. 3) ( $p=0.025$ ). Treg suppressive function was not affected; however numbers of patients to be compared were low. A positive correlation was reported between the TSHR-Ab titers and the thyroxine levels in G patients before RAI treatment (data not shown). Orbital signs were described in 6 G patients and 5 of them were in the G-no ATD subcohort. In the latter, only one patient had a severe aggravation of GO after RAI treatment and left the study.



### Supplemental Figure 3. Proportion variation in frequency of peripheral Treg before and after radioiodine therapy in patients with Graves' disease.

Each data of the proportion variation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>FoxP3<sup>+</sup> Treg cells over the total peripheral CD4<sup>+</sup> T cells in 5 patients with hypothyroidism after RAI therapy (Low T4) and in 10 patients without hypothyroidism (Normal/High T4) are shown. All data are presented as the variation of the proportion using the formula: [Number of cells from (Sample post RAI/Sample pre RAI)]-1, and presented on graphs as the mean  $\pm$  SD. \* $p<0.05$ .

## Discussion

RAI therapy triggers autoimmune perturbances in patients with GD, and this suggests an associated defect in immune regulation (19-21). In this study, we demonstrated that RAI altered peripheral frequency (Treg and iNKT) and function (Treg) of immunoregulatory T cells in G patients. Additionally, we showed that a short course of Methimazole medication prior to RAI modified these immune changes towards normalization.

One limitation of our study was the low numbers of patients. However by recruiting at the same center, during a short period of time had advantages, such as uniformization of sample handling and probably less “batch effects”.

We observed both decline and augmentation in frequency of Treg after RAI treatment. One previous report by Pan *et al.* reported lower frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>int-</sup>hiCD127<sup>lo</sup> Treg cells 6-8 weeks post-RAI treatment in 9 G patients (13). However significance was only present when considering %Treg/ml of blood and not %Treg/CD4+ cells- the latter is more commonly used for Treg. The different conclusions from our study could be explained by our shorter sampling period, distinct selected markers to define Treg, as well as a smaller cohort in the Pan study. Regulatory cells accumulated in Graves' thyroid (6-7) could be redistributed after RAI, and a concomitant infiltration of others Treg could be induced by the inflammatory damages. This would all happen in an attempt to control autoimmunity, and reflected by the highs and lows in peripheral levels of these cells that we observed. The similarities in RAI-induced variation of iNKT cells support the already described cross-talk of these two cell subsets (27). A lower iNKT cell frequency was observed in MNG in comparison to G patients. We presumed that this was attributed to the age of our MNG cohort, because aging is a known factor contributing to lower iNKT cells (28).

We report an impaired Treg suppressive function after RAI therapy in G patients. One explanation could be that Treg are affected by radiation when circulating through the thyroid gland, as Treg were shown to be more radiosensitive (29). However the effect on all circulating Treg must be weak and indeed not observed in a non autoimmune context (MNG patients). Another hypothesis sustained by previous reports is that thyroid

irradiation leads to a strong antigen release, production of proinflammatory cytokines (30) and chemokines (31). The modulation of chemokines was only observed in the autoimmune context. RAI-induced changes in circulating levels of cytokines/chemokines could direct the increased activity of effector cells (32), higher antibody production (21) and also defective Treg function.

Treg cells from G patients produced less IL-10 after RAI therapy, suggesting a defect in function that may have an impact *in vivo*. For example IL-10 deficient Treg are no longer able to suppress inflammatory bowel disease in a mouse model (33). The IL-10 decline would corroborate the increased pro-inflammatory environment reported after RAI (34). Although we did not evaluate the levels of pro-inflammatory cytokines such as IL-17, it is presumed that their elevated secretion by Treg is associated with a diminished suppressive activity (35). As seen in past *in vitro* studies (36-38), Treg cell inhibitory capacity did not seem to rely on the release of soluble factors, as evidenced in our study by the neutralizing and cell-free co-culture supernatant experiments. It is more likely that a defective cell to cell contact might be the major determinant of Treg dysfunction in our *in vitro* setting. Additional studies defining the exact nature of Treg dysfunction following RAI are warranted at this point.

It has recently been demonstrated that ATD could normalize circulating Treg frequency in G patients (10-11, 18). Our results extend these data and demonstrated that an ATD pretreatment moderate the immune changes induced by RAI therapy: less variation of Treg frequency, a trend to less defective Treg function, and restoration of normal levels of suppressive cytokines. This may be related to the reduction of intra-thyroidal inflammation due to immunosuppressive effects of the drug (16). It remains to be investigated if these changes contribute to a weakened autoimmune flare after RAI therapy, and are implicated in the known attenuated rise of TSHR-Ab levels (23).

In conclusion, the present study provides the first picture of RAI-induced alteration in Treg and iNKT cells in GD patients, which corroborates the evidence of worsening of autoimmunity after RAI. A history of ATD therapy prior to RAI partially prevents these alterations. We are thus in favour of a short ATD pretreatment (methimazole) before RAI therapy. ATD discontinuation 7 days before RAI therapy should avoid the potential reduction of RAI effectiveness (39-40). It is difficult to say if the substantial and rapid

immune changes observed in our study were the results of a transient phenomenon or those of a persistent alteration; longitudinal studies on a larger cohort of G patients are warranted for clarification, providing us with more information on the reciprocal immune effects of these two widely used treatments.

**Acknowledgements**

We thank all subjects and physicians at the Sherbrooke University Hospital for their contribution to the study. This work was supported by research funds of the Faculty of Medicine, the Clinical Research Center, the Department of Pediatrics at Sherbrooke University and grants from the Québec's Health Research Funds (FRQS). Special thanks to Jana Stankova and Françoise Le Deist for excellent technical advice and to Patrick McDonald for providing healthy control samples.

**Abbreviations**

antithyroid drug: ATD

carboxyfluorescein succinimidyl ester: CFSE

Graves disease: GD

Graves disease patients who did not take ATD before RAI: G-no ATD

Graves disease patients who did take ATD before RAI: G-ATD

Graves orbitopathy: GO

healthy subjects: HS

invariant Natural Killer T cell: iNKT

multinodular goiter: MNG

peripheral blood mononuclear cells: PBMCs

proliferation index: PI

radioactive iodine: RAI

regulatory T cell: Treg

TSH receptor: TSHR

TSH receptor antibody: TSHR-Ab



## References

1. **Rapoport B, Chazenbalk GD, Jaume JC, McLachlan SM.** The thyrotropin (TSH) receptor: interaction with TSH and autoantibodies. *Endocr Rev.* Dec 1998;19(6):673-716.
2. **Bahn RS, Dutton CM, Joba W, Heufelder AE.** Thyrotropin receptor expression in cultured Graves' orbital preadipocyte fibroblasts is stimulated by thyrotropin. *Thyroid.* Feb 1998;8(2):193-196.
3. **Bahn RS.** Graves' ophthalmopathy. *N Engl J Med.* Feb 25 2010;362(8):726-738.
4. **Sakaguchi S.** Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:531-562.
5. **Godfrey DI, Kronenberg M.** Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J Clin Invest.* Nov 2004;114(10):1379-1388.
6. **Marazuela M, Garcia-Lopez MA, Figueroa-Vega N, de la Fuente H, Alvarado-Sanchez B, Monsivais-Urenda A, Sanchez-Madrid F, Gonzalez-Amaro R.** Regulatory T cells in human autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab.* Sep 2006;91(9):3639-3646.
7. **Watanabe M, Nakamura Y, Matsuzuka F, Takamura Y, Miyauchi A, Iwatani Y.** Decrease of intrathyroidal CD161+Valpha24+Vbeta11+ NKT cells in Graves' disease. *Endocr J.* Mar 2008;55(1):199-203.
8. **Saitoh O, Nagayama Y.** Regulation of Graves' hyperthyroidism with naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells in a mouse model. *Endocrinology.* May 2006;147(5):2417-2422.
9. **Nagayama Y, Watanabe K, Niwa M, McLachlan SM, Rapoport B.** Schistosoma mansoni and alpha-galactosylceramide: prophylactic effect of Th1 Immune suppression in a mouse model of Graves' hyperthyroidism. *J Immunol.* Aug 1 2004;173(3):2167-2173.
10. **Mao C, Wang S, Xiao Y, Xu J, Jiang Q, Jin M, Jiang X, Guo H, Ning G, Zhang Y.** Impairment of regulatory capacity of CD4+CD25+ regulatory T cells mediated by dendritic cell polarization and hyperthyroidism in Graves' disease. *J Immunol.* Apr 15 2011;186(8):4734-4743.
11. **Klatka M, Grywalska E, Partyka M, Charytanowicz M, Kiszczak-Bochynska E, Rolinski J.** Th17 and Treg cells in adolescents with Graves' disease. Impact of treatment with methimazole on these cell subsets. *Autoimmunity.* May 2014;47(3):201-211.
12. **Glick AB, Wodzinski A, Fu P, Levine AD, Wald DN.** Impairment of regulatory T-cell function in autoimmune thyroid disease. *Thyroid.* Jul 2013;23(7):871-878.
13. **Pan D, Shin YH, Gopalakrishnan G, Hennessey J, De Groot LJ.** Regulatory T cells in Graves' disease. *Clin Endocrinol (Oxf).* Oct 2009;71(4):587-593.
14. **van der Vliet HJ, von Blomberg BM, Nishi N, Reijm M, Voskuyl AE, van Bodegraven AA, Polman CH, Rustemeyer T, Lips P, van den Eertwegh AJ, Giaccone G, Scheper RJ, Pinedo HM.** Circulating V(alpha24+) Vbeta11+ NKT cell numbers are decreased in a wide variety of diseases that are characterized by autoreactive tissue damage. *Clin Immunol.* Aug 2001;100(2):144-148.
15. **Roman-Gonzalez A, Moreno ME, Alfaro JM, Uribe F, Latorre-Sierra G, Rugeles MT, Montoya CJ.** Frequency and function of circulating invariant NKT

- cells in autoimmune diabetes mellitus and thyroid diseases in Colombian patients. *Hum Immunol*. Apr 2009;70(4):262-268.
16. **Volpe R.** The immunomodulatory effects of anti-thyroid drugs are mediated via actions on thyroid cells, affecting thyrocyte-immunocyte signalling: a review. *Curr Pharm Des*. Apr 2001;7(6):451-460.
  17. **McGregor AM, Petersen MM, McLachlan SM, Rooke P, Smith BR, Hall R.** Carbimazole and the autoimmune response in Graves' disease. *N Engl J Med*. Aug 7 1980;303(6):302-307.
  18. **Klatka M, Kaszubowska L, Grywalska E, Wasiak M, Szewczyk L, Foerster J, Cyman M, Rolinski J.** Treatment of Graves' disease with methimazole in children alters the proliferation of Treg cells and CD3+ T lymphocytes. *Folia Histochem Cytobiol*. 2014;52(1):69-77.
  19. **Bartalena L, Marcocci C, Bogazzi F, Manetti L, Tanda ML, Dell'Unto E, Bruno-Bossio G, Nardi M, Bartolomei MP, Lepri A, Rossi G, Martino E, Pinchera A.** Relation between therapy for hyperthyroidism and the course of Graves' ophthalmopathy. *N Engl J Med*. Jan 8 1998;338(2):73-78.
  20. **Tallstedt L, Lundell G, Torring O, Wallin G, Ljunggren JG, Blomgren H, Taube A.** Occurrence of ophthalmopathy after treatment for Graves' hyperthyroidism. The Thyroid Study Group. *N Engl J Med*. Jun 25 1992;326(26):1733-1738.
  21. **Laurberg P, Wallin G, Tallstedt L, Abraham-Nordling M, Lundell G, Torring O.** TSH-receptor autoimmunity in Graves' disease after therapy with anti-thyroid drugs, surgery, or radioiodine: a 5-year prospective randomized study. *Eur J Endocrinol*. Jan 2008;158(1):69-75.
  22. **Cooper DS.** Antithyroid drugs. *N Engl J Med*. Mar 3 2005;352(9):905-917.
  23. **Andrade VA, Gross JL, Maia AL.** Serum thyrotropin-receptor autoantibodies levels after I therapy in Graves' patients: effect of pretreatment with methimazole evaluated by a prospective, randomized study. *Eur J Endocrinol*. Oct 2004;151(4):467-474.
  24. **Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA.** CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med*. Jul 10 2006;203(7):1701-1711.
  25. **Li MO, Flavell RA.** Contextual regulation of inflammation: a duet by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *Immunity*. Apr 2008;28(4):468-476.
  26. **Kung AW, Yau CC, Cheng A.** The incidence of ophthalmopathy after radioiodine therapy for Graves' disease: prognostic factors and the role of methimazole. *J Clin Endocrinol Metab*. Aug 1994;79(2):542-546.
  27. **Hua J, Liang S, Ma X, Webb TJ, Potter JP, Li Z.** The interaction between regulatory T cells and NKT cells in the liver: a CD1d bridge links innate and adaptive immunity. *PLoS One*. 2011;6(11):e27038.
  28. **DelaRosa O, Tarazona R, Casado JG, Alonso C, Ostos B, Pena J, Solana R.** Valpha24+ NKT cells are decreased in elderly humans. *Exp Gerontol*. Jan-Mar 2002;37(2-3):213-217.

29. **Awwad M, North RJ.** Sublethal, whole-body ionizing irradiation can be tumor promotive or tumor destructive depending on the stage of development of underlying antitumor immunity. *Cancer Immunol Immunother.* 1988;26(1):55-60.
30. **Jones BM, Kwok CC, Kung AW.** Effect of radioactive iodine therapy on cytokine production in Graves' disease: transient increases in interleukin-4 (IL-4), IL-6, IL-10, and tumor necrosis factor-alpha, with longer term increases in interferon-gamma production. *J Clin Endocrinol Metab.* Nov 1999;84(11):4106-4110.
31. **Antonelli A, Rotondi M, Fallahi P, Grosso M, Boni G, Ferrari SM, Romagnani P, Serio M, Mariani G, Ferrannini E.** Iodine-131 given for therapeutic purposes modulates differently interferon-gamma-inducible alpha-chemokine CXCL10 serum levels in patients with active Graves' disease or toxic nodular goiter. *J Clin Endocrinol Metab.* Apr 2007;92(4):1485-1490.
32. **Turowska MD, Turowski D, Wysocka J, Rogowski F.** The effects of radioiodine therapy on peripheral blood lymphocyte subpopulations in patients with Graves' disease. Preliminary report. *Nucl Med Rev Cent East Eur.* 2002;5(1):35-38.
33. **Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F.** An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med.* Oct 4 1999;190(7):995-1004.
34. **Ponto KA, Zang S, Kahaly GJ.** The tale of radioiodine and Graves' orbitopathy. *Thyroid.* Jul 2010;20(7):785-793.
35. **Beriou G, Costantino CM, Ashley CW, Yang L, Kuchroo VK, Baecher-Allan C, Hafler DA.** IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function. *Blood.* Apr 30 2009;113(18):4240-4249.
36. **Thornton AM, Shevach EM.** CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med.* Jul 20 1998;188(2):287-296.
37. **Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, Shimizu J, Sakaguchi S.** Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol.* Dec 1998;10(12):1969-1980.
38. **Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J, Enk AH.** Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med.* Jun 4 2001;193(11):1285-1294.
39. **Bogazzi F, Martino E, Bartalena L.** Antithyroid drug treatment prior to radioiodine therapy for Graves' disease: yes or no? *J Endocrinol Invest.* Feb 2003;26(2):174-176.
40. **Shi GM, Xu Q, Zhu CY, Yang YL.** Influence of propylthiouracil and methimazole pre-treatment on the outcome of iodine-131 therapy in hyperthyroid patients with Graves' disease. *J Int Med Res.* Mar-Apr 2009;37(2):576-582.

## DISCUSSION

Les patients atteints de la MG ont des auto-anticorps mimant l'action du ligand naturel du RTSH qui est exprimé sur les cellules de la glande thyroïde. En conséquence, la manifestation clinique principale de cette maladie est une hyperthyroïdie. Une autre manifestation est l'orbitopathie, dont les mécanismes auto-immuns déclencheurs sont peu connus. Toutefois, les auto-anticorps ciblant le RTSH pourraient participer à la physiopathologie de l'atteinte orbitaire. Le traitement à l'IR de l'hyperthyroïdie dans la MG favorise l'apparition de perturbations auto-immunes contrairement aux autres types de traitements, soit les ATS ou la chirurgie. La disparition des auto-anticorps ciblant le RTSH est ainsi moins fréquente après le traitement à l'IR (Laurberg *et al.*, 2008), tout comme l'apparition ou l'aggravation de l'orbitopathie. Étant donné le rôle crucial des lymphocytes T de type régulateur dans la prévention de l'auto-immunité, leur étude s'avère essentielle afin de mieux comprendre les conséquences immunologiques du traitement à l'IR. Une altération des lymphocytes Treg et des lymphocytes iNKT a été préalablement décrite comme étant impliquée dans le développement de processus auto-immuns (Buckner, 2010). Pourtant, ces lymphocytes n'ont que très peu été étudiés dans le contexte du traitement à l'IR. Nous avons émis l'hypothèse que l'amplification de certains processus auto-immuns après le traitement à l'IR de la MG découle d'une perte de régulation des cellules T autoréactives par les lymphocytes T de type régulateur. Notre objectif de recherche était donc d'étudier un possible déséquilibre immunitaire dans la fenêtre temporelle suivant le traitement à l'IR de patients atteints de la MG.

Tout d'abord, nous avons voulu établir la fréquence relative des lymphocytes Treg et des lymphocytes iNKT, dans le sang périphérique des patients atteints de la MG, et ce, préalablement au traitement à l'IR. Plusieurs études ont publié des résultats opposés sur l'évaluation numérique des lymphocytes Treg chez des patients atteints de la MG non traités : une augmentation (Marazuela *et al.*, 2006) ou une réduction (Klatka *et al.*, 2014, Mao *et al.*, 2011) de leur fréquence périphérique. Il s'est avéré que nos résultats, avant le traitement à l'IR, corroboraient la réduction de leur fréquence (figure 1A de l'article). Par

contre, ces études contradictoires reflètent deux difficultés sous-jacentes au dénombrement des lymphocytes Treg chez l'humain.

Premièrement, il n'y a pas de marqueur cellulaire unique à l'isolation de cette population. Le phénotype  $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$  a été choisi pour énumérer les lymphocytes Treg dans ce projet de recherche. À ce jour, cette combinaison de marqueurs est utilisée pour identifier les lymphocytes Treg dits « naturels » chez l'humain (Miyara *et al.*, 2014, Nishikawa et Sakaguchi, 2014), et représente les lymphocytes T périphériques  $CD4^+$  qui ont une capacité suppressive (Allan *et al.*, 2007). De la sorte, le choix d'autres marqueurs mènerait à l'isolation d'une population régulatrice différente, ne pouvant donc pas être comparée. Par exemple, les phénotypes  $CD4^+GITR^+$  et  $CD4^+FOXP3^+$  ont servi à l'identification des lymphocytes Treg dans l'étude de Marazuela *et al.*, ce qui pourrait expliquer la différence obtenue avec nos résultats. Deuxièmement, le nombre de lymphocytes Treg circulants n'est potentiellement pas le reflet des lymphocytes Treg totaux, et en particulier ceux des tissus atteints (tableau 4 du mémoire). Il est donc préférable d'évaluer leur nombre dans le sang et également dans le tissu d'intérêt. Nous avons évalué les lymphocytes Treg circulants plutôt qu'intrathyroïdiens, car ces derniers ne pouvaient être évalués que sur des prélèvements de tissus thyroïdiens obtenus en chirurgie. Puisque nous voulions étudier les effets du traitement à l'IR, nous avons opté pour l'étude de ces lymphocytes au moyen de prélèvements sanguins uniquement. Toutefois, les perturbations immunes présentes dans le sang périphérique doivent être d'importance dans la MG puisque le sang circulant est un des seuls liens physiques entre les deux types cellulaires visés par l'attaque auto-immune, soit les thyrocytes de la glande thyroïde et les fibroblastes de l'orbite.

En ce qui a trait aux lymphocytes iNKT, une seule étude a publié une fréquence périphérique normale chez des patients non traités (Roman-Gonzalez *et al.*, 2009), et ceci renforce les résultats que nous avons obtenus préalablement à l'IR (figure 1B de l'article). Chez l'humain, les limitations de l'étude de cette population sont leur faible fréquence périphérique et leur grande variabilité en nombre, où l'évaluation numérique plutôt que fonctionnelle est souvent réalisée. Il s'est avéré que la quantité de 50 mL de sang recueilli

de chaque donneur était insuffisante pour évaluer la fonction des lymphocytes iNKT. En effet, la moyenne du nombre de lymphocytes iNKT par mL de sang des patients recrutés atteints de la MG était d'environ 600, dont presque la moitié présentait un nombre inférieur à 100.

Les perturbations auto-immunes survenant après le traitement à l'IR sont une hausse du niveau des Ac-RTSH ainsi qu'une apparition ou une aggravation de l'orbitopathie. Ces effets ne sont toutefois pas observés à la suite d'un autre traitement radical comme la chirurgie de la glande thyroïde (Laurberg *et al.*, 2008). Puisque nous avons émis l'hypothèse que les lymphocytes Treg et les lymphocytes iNKT étaient impliqués dans ces effets immuns, nous avons évalué leur fréquence après le traitement à l'IR et l'avons comparée à celle obtenue initialement. Les résultats ont été présentés sous forme de variation au sein d'un même individu afin de refléter rigoureusement l'évolution de l'effet du traitement au cours d'une période de temps définie. Chez les patients atteints de la MG, des variations significatives dans la fréquence périphérique des lymphocytes Treg et des lymphocytes iNKT ont été induites par le traitement à l'IR, ce qui n'était pas le cas chez les patients atteints d'un GMN ou chez les sujets sains (figure 2 de l'article). Ces deux populations lymphocytaires infiltrent typiquement la glande thyroïde des patients atteints de la MG (Marazuela *et al.*, 2006, Watanabe *et al.*, 2008), où l'irradiation pourrait contribuer à leur distribution ou renouvellement, reflétant la variation périphérique observée après le traitement. Toutefois, les lymphocytes iNKT ont été démontrés comme étant plus résistants à la radiation (Yao *et al.*, 2011) que les lymphocytes Treg (Awwad et North, 1988). Les résultats de variation similaire observés entre ces deux populations pourraient être le reflet de l'action d'une de ces populations sur l'autre. Par exemple, il a récemment été démontré que les lymphocytes iNKT peuvent contrôler le nombre et la fonction suppressive des lymphocytes Treg par la sécrétion d'IL-2 (Lynch *et al.*, 2015). Néanmoins, nous n'avons pas approfondi l'étude de cette possible régulation immunitaire mutuelle dans le sang périphérique après le traitement à l'IR. Il aurait été intéressant de réaliser une coculture afin d'évaluer leur fonction réciproque, par exemple leur capacité à proliférer. Celle-ci aurait pu être analysée *ex vivo* de la même façon que nous avons évalué la prolifération des lymphocytes Treg dans l'essai de suppression.

Suite à l'observation d'une grande variation numérique des lymphocytes Treg après le traitement à l'IR des patients atteints de la MG, nous avons souhaité évaluer leur fonction suppressive dans la même fenêtre temporelle. L'étude fonctionnelle des lymphocytes Treg humains se limite à l'essai de suppression *in vitro*. La fonction des lymphocytes Treg polyclonaux est souvent évaluée au profit de celle des lymphocytes Treg dont leurs TCRs sont restreints à un peptide commun, entre autres car ils sont en plus grande proportion parmi les lymphocytes sanguins. Le volume de sang recueilli dans notre projet de recherche ne permettait que d'évaluer la fonction des lymphocytes Treg polyclonaux. Il a été démontré que l'analyse de cette population polyclonale est utile dans le traitement de certaines maladies auto-immunes (Bluestone, 2005). De plus, les lymphocytes Treg ont la particularité de pouvoir exercer une fonction suppressive envers d'autres cellules en prolifération, même si leurs TCRs respectifs ne partagent pas la même reconnaissance antigénique (Takahashi *et al.*, 1998). En ce sens, l'étude des lymphocytes Treg polyclonaux reflète la diversité de la réponse immunologique *in vivo*. Étant donné le rôle central de l'auto-antigène RTSH dans la pathogenèse de la MG et de l'orbitopathie, l'analyse des lymphocytes stimulés par des peptides provenant du RTSH aurait été intéressante dans l'essai de suppression. Ceci aurait permis d'évaluer la capacité des lymphocytes Treg dans l'inhibition de la réponse auto-immune à cet antigène. Toutefois, nos propres résultats antérieurs et les connaissances actuelles ne permettent pas d'identifier des peptides antigéniques dominants pour réaliser ce type d'expérience.

Pour faire suite, la fonction des lymphocytes Treg polyclonaux chez les patients atteints de la MG s'est révélée être altérée par le traitement à l'IR (figure 3 de l'article). Ce dysfonctionnement n'a toutefois pas été démontré chez les patients atteints d'un GMN. En fait, l'ensemble des résultats analysés dans la cohorte de patients atteints d'un GMN tend à démontrer que les lymphocytes Treg et les lymphocytes iNKT ne sont pas modulés par le traitement à l'IR, comparativement à la cohorte de patients atteints de la MG. Tandis que la MG a une origine auto-immune, la pathogenèse et l'évolution du GMN toxique sont attribuées à des causes non auto-immunes. De ce fait, le type de maladie thyroïdienne semble influencer les effets du traitement. Il est très rare que des patients atteints d'un

GMN développent une condition auto-immune, comme l'orbitopathie, suivant le traitement à l'IR (Nygaard *et al.*, 1999). Ainsi, le contexte auto-immun pourrait expliquer, en partie, les résultats obtenus. Par exemple, le haut niveau sérique de la chimiokine CXCL10 a été associé à l'état hyperthyroïdien des patients atteints de la MG, mais pas à celui des patients atteints d'un GMN (Antonelli *et al.*, 2007). Ceci démontre une forte association de cette chimiokine avec l'auto-immunité. L'irradiation de la glande thyroïde induit une diminution du niveau sérique de CXCL10 chez les patients atteints de la MG, mais aucune modulation n'est observée chez ceux atteints d'un GMN traités (Antonelli *et al.*, 2007). De plus, il a été démontré que le traitement à l'IR dans la MG induit la production de plusieurs cytokines comme l'IL-6 (Jones *et al.*, 1999) qui pourraient moduler la réponse immune. Ces différences entre cytokines ou chimiokines selon le type de maladie thyroïdienne pourraient diriger de façon distinctive la réponse immune post-traitement. Dans le cas du traitement à l'IR de la MG, le rôle pathogénique de ces molécules pourrait favoriser le recrutement des cellules T activées au site tissulaire enflammé (Dong *et al.*, 2011), et également diminuer la capacité suppressive des lymphocytes Treg. En ce sens, l'étude du profil différentiel de cytokines ou chimiokines suivant le traitement à l'IR en fonction du contexte immun/auto-immun serait profitable.

À la suite des résultats fonctionnels, nous étions intéressés d'évaluer les mécanismes de suppression des lymphocytes Treg au sein du modèle expérimental afin d'établir une possible cause de leur dysfonctionnement. Un avantage de l'essai de suppression est que plusieurs variables peuvent être manipulées dans une expérience, ce qui permet l'analyse des mécanismes dominants exercés par les lymphocytes Treg à l'étude. Puisque le TGF- $\beta$  et l'IL-10 sont deux cytokines immunosuppressives produites par les lymphocytes Treg (Li et Flavell, 2008), nous avons choisi d'étudier leur rôle dans l'essai *in vitro*. La neutralisation des fonctions biologiques de ces cytokines n'a pas atténué la suppression exercée par les lymphocytes Treg (figure 5A de l'article). Pour évaluer plus en profondeur le rôle d'autres facteurs solubles, notamment des molécules cytolytiques, nous avons poursuivi en effectuant des expériences de coculture avec des surnageants d'autres essais de suppression. Une fois de plus, il n'y a pas eu de modulation dans la capacité inhibitrice des lymphocytes Treg (figure 5B de l'article). Ces résultats suggèrent que le



TGF- $\beta$ , l'IL-10 ainsi que d'autres facteurs solubles ne sont pas des molécules clés dans la suppression exercée par les lymphocytes Treg *in vitro*. Cependant, il aurait été pertinent de valider ces résultats par une expérience dans laquelle une membrane perméable appelée *Transwell* est insérée dans une plaque à 96 puits (Collison et Vignali, 2011). Les cellules de la coculture seraient séparées par cette membrane qui permettrait un échange de molécules solubles, mais pas un contact cellulaire. L'ajout des lymphocytes Treg seuls ou en combinaison avec d'autres cellules de chaque côté de la membrane permettrait d'évaluer l'implication du contact cellulaire dans les mécanismes de suppression.

L'importance du rôle des cytokines IL-10 et TGF- $\beta$  dans la fonction suppressive des lymphocytes Treg *in vitro* est controversée dans la littérature. Cependant, ces molécules sont critiques dans leur fonction exercée *in vivo* (Asseman *et al.*, 1999, Green *et al.*, 2003). En guise d'exemples, l'IL-10 joue un rôle crucial dans l'inhibition de la production de cytokines par les lymphocytes T, les macrophages et les cellules dendritiques, ainsi que dans l'inhibition de la prolifération cellulaire Th1/Th2 et de l'expression des CMH de classe II sur les monocytes (Ouyang *et al.*, 2011). Nous avons démontré que les lymphocytes Treg de patients atteints de la MG produisaient moins d'IL-10 après le traitement à l'IR (figure 4A de l'article), et que ceci corroborait leur dysfonctionnement *in vitro*. Cette altération pourrait favoriser la prolifération des lymphocytes autoréactifs *in vivo* et contribuer à l'auto-immunité. En outre, la diminution d'IL-10 recoupe avec l'environnement pro-inflammatoire décrit après le traitement à l'IR de la MG (Ponto *et al.*, 2010). Il a été démontré que les cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-1 diminuent l'expression de FOXP3 et différencient les lymphocytes Treg en lymphocytes Th17 (Yang *et al.*, 2008). Nous n'avons néanmoins pas approfondi l'éventualité de cette différenciation lymphocytaire propice à l'établissement de l'auto-immunité.

Certains facteurs peuvent influencer l'évaluation numérique et fonctionnelle des populations lymphocytaires chez des patients, notamment le stade de la maladie. Dans le lupus érythémateux systémique par exemple, le nombre de lymphocytes Treg est plus faible chez les patients dont la maladie est active en comparaison avec ceux dont la maladie est inactive (Miyara *et al.*, 2005). Dans notre projet de recherche, l'ensemble des patients

atteints de la MG et d'un GMN avait une maladie active, un critère sous-jacent au traitement à l'IR afin que la glande thyroïde concentre activement la radioactivité. Ce critère a pu contribuer à l'uniformité des cohortes.

Un second facteur pouvant agir sur les populations lymphocytaires des patients est le type de traitement reçu, tel que nous l'avons démontré avec l'IR. En plus de traiter l'hyperthyroïdie, les médicaments antithyroïdiens induisent une modulation de certains procédés immuns chez les patients atteints de la MG. En effet, une diminution du niveau d'Ac-RTSH est observée chez ces patients prenant un ATS nommé méthimazole (McGregor *et al.*, 1980). Parmi les 27 patients atteints de la MG recrutés dans notre projet de recherche, 11 prenaient du méthimazole pour normaliser les fonctions de la glande thyroïde en vue du traitement à l'IR. Par conséquent, nous avons souhaité étudier les effets d'un tel prétraitement sur l'ensemble des paramètres immuns analysés dans le cadre du traitement à l'IR. La médication antithyroïdienne a été interrompue quelques jours avant le traitement à l'IR sans nuire à la captation de l'iode par les thyrocytes (Bonnema *et al.*, 2002).

Tout d'abord, il a récemment été démontré que les ATS peuvent normaliser la fréquence périphérique des lymphocytes Treg chez les patients atteints de la MG (Klatka *et al.*, 2014, Klatka *et al.*, 2014, Mao *et al.*, 2011). Nos résultats préalables à l'IR ont confirmé ces données (figure 1A de l'article). La nature des mécanismes d'action des ATS sur les lymphocytes Treg n'est toujours pas connue. Une restauration du nombre de lymphocytes Treg au profit d'une diminution des lymphocytes Th17 lors du traitement au méthimazole pourrait expliquer partiellement les résultats obtenus (Klatka *et al.*, 2014). En ce qui a trait aux lymphocytes iNKT, une seule étude a publié une fréquence périphérique normale chez des patients traités (van der Vliet *et al.*, 2001), sans toutefois préciser la nature du traitement. Nos résultats ont révélé que les lymphocytes iNKT ne semblaient pas être modulés quantitativement par un prétraitement avec un ATS (figures 1B et 2B de l'article).

Par la suite, nous avons démontré qu'un prétraitement avec un ATS induisait des changements significatifs au sein des lymphocytes Treg suivant le traitement à l'IR des

patients atteints de la MG. Un de ces changements était le rétablissement du niveau des cytokines suppressives IL-10 et TGF- $\beta$  sécrétées (figure 4 de l'article), reflétant l'amélioration partielle de la fonction des lymphocytes Treg après le traitement à l'IR. Il a récemment été publié que le méthimazole restitue la capacité suppressive dysfonctionnelle des lymphocytes Treg dans la MG (Klatka *et al.*, 2014). Comme mentionné précédemment, les cytokines ou chimiokines produites après le traitement à l'IR pourraient contribuer à moduler la réponse immune. Puisque les ATS diminuent la production de certaines chimiokines impliquées dans les phases initiales de l'atteinte auto-immune de la glande thyroïde (Antonelli *et al.*, 2013), ceci pourrait favoriser une réponse immune différente après le traitement à l'IR entre les patients prétraités ou non avec un ATS. De plus, un second changement observé était l'inhibition de la variation numérique des lymphocytes Treg périphériques induite par l'IR (figure 2A de l'article). Il a été démontré que les médicaments antithyroïdiens induisent une apoptose des lymphocytes intrathyroïdiens chez les patients atteints de la MG (Mitsiades *et al.*, 2000). Ainsi, une plus faible distribution ou renouvellement des lymphocytes intrathyroïdiens irradiés, comme précédemment proposé, pourrait expliquer la diminution de la variation des lymphocytes Treg périphériques observée chez les patients atteints de la MG traités à l'IR.

L'ensemble de ces changements suscite un intérêt à évaluer les perspectives d'un prétraitement avec un ATS en vue du traitement à l'IR (Bogazzi *et al.*, 2003). La normalisation des fonctions de la glande thyroïde lors de la prise de ces médicaments améliorerait les symptômes orbitaires en réduisant la réactivité immunologique à l'orbite (Bartalena *et al.*, 2000). Ceci pourrait être favorable au ralentissement de la progression ophtalmique suivant le traitement à l'IR, malgré le fait qu'aucune étude n'ait été réalisée sur ce sujet. En outre, un prétraitement avec un ATS diminuerait les manifestations de l'hyperthyroïdie avant le traitement à l'IR. Puisque les effets de la radiation sur la glande thyroïde ne sont pas immédiats, un tel prétraitement diminuerait également la période non contrôlée de l'hyperthyroïdie suivant le traitement à l'IR (Bogazzi *et al.*, 2003). Finalement, le recouvrement partiel du nombre et de la fonction des lymphocytes Treg pourrait contribuer à diminuer la réponse auto-immune observée après le traitement à l'IR chez les patients atteints de la MG prétraités avec un ATS. Il a déjà été établi qu'un tel

prétraitement atténue la hausse du niveau d'Ac-RTSH dès les 30 premiers jours suivant le traitement à l'IR (Andrade *et al.*, 2004), possiblement due à la rémission partielle des patients à l'auto-antigène RTSH. En ce sens, l'équilibre au sein de la population des lymphocytes Treg pourrait être bénéfique à la mise en œuvre d'une réponse immune adéquate. De plus amples études sur cette population dans le contexte d'un prétraitement avec un ATS et du traitement à l'IR seraient profitables. L'évaluation des paramètres cliniques devrait être intégrée à la recherche afin de transposer les résultats obtenus à la pratique médicale.

Tels que présentés dans l'analyse des variables cliniques de l'article, divers paramètres ont en effet été analysés afin d'établir une possible corrélation avec les résultats obtenus. Toutefois, la cohorte de patients recrutés atteints de la MG était petite pour tirer des conclusions révélatrices. Pour ce qui est de l'orbitopathie, il est tout de même intéressant de savoir que le seul patient à avoir développé une exacerbation de l'atteinte ophthalmique après l'IR n'a pas eu de prétraitement avec un ATS.

À la vue de l'ensemble de ces résultats, certaines perspectives de recherche seraient intéressantes. Puisque nous n'avons pas observé d'altération numérique dans la population de lymphocytes iNKT, il serait intéressant d'utiliser d'autres marqueurs afin de différencier les sous-groupes doubles négatifs  $CD4^-CD8^-$  des simples positifs  $CD4^+$  ou  $CD8^+$ . Ceux-ci sont associés à un profil distinct de sécrétion des cytokines Th1/Th2 qui pourrait révéler une contribution fonctionnelle différente dans le contexte de la MG et de l'IR. Également, il serait pertinent d'approfondir les mécanismes impliqués dans le dysfonctionnement des lymphocytes Treg observé après le traitement à l'IR. Puisque nos résultats tendent à démontrer l'importance d'un mécanisme requérant un contact cellulaire dans l'exercice de la fonction des lymphocytes Treg, il serait intéressant d'analyser l'expression de la molécule CTLA-4 par exemple. Son expression élevée sur les lymphocytes Treg leur permet d'exercer un rôle crucial dans l'inhibition de la réponse immune par un contact cellulaire (Vasu *et al.*, 2003). De plus, la notion que les lymphocytes Treg peuvent se différencier en lymphocytes Th17 dans un contexte pro-inflammatoire serait pertinente à approfondir après le traitement à l'IR de la MG. En effet, il a été démontré que le ratio des

lymphocytes Th17/Treg était augmenté dans un modèle murin de la MG et serait impliqué dans la pathogenèse (Zhou *et al.*, 2012). De plus, un prétraitement avec un ATS semblerait modifier cette balance en faveur des lymphocytes Treg, comme mentionné précédemment.

Le recrutement des patients atteints d'un GMN s'est fait sur une longue période de temps, où l'échantillon final est représentatif du faible nombre de ces patients admissibles pour le traitement à l'IR, mais reste toutefois modeste. Cette limitation peut malgré cela être un avantage en favorisant la standardisation de la manipulation des prélèvements. D'autres études, au sein d'une plus grande cohorte, seraient utiles afin de comprendre pourquoi l'ensemble des perturbations immunologiques observées chez les lymphocytes Treg et les lymphocytes iNKT survient seulement chez les patients atteints de la MG.

## CONCLUSION

L'objectif du projet de recherche était d'étudier les effets du traitement à l'IR sur les lymphocytes Treg et les lymphocytes iNKT des patients atteints de la MG. Nous avons démontré que le traitement à l'IR induit un changement de la fréquence périphérique des lymphocytes Treg et des lymphocytes iNKT, ainsi que de la fonction des lymphocytes Treg. Nous avons démontré une réduction de la capacité suppressive des lymphocytes Treg, et ce, accompagnée d'une diminution de la production d'IL-10. Ces changements corroborent l'amplification de l'auto-immunité décrite après ce traitement. De plus, un prétraitement avec une médication antithyroïdienne modère les changements observés après le traitement à l'IR, mais uniquement chez les lymphocytes Treg. Effectivement, nous avons observé : une stabilité de leur fréquence périphérique, une tendance à un défaut de suppression plus faible, ainsi qu'une prévention de la chute du niveau des cytokines IL-10 et TGF- $\beta$  sécrétées.

Afin de caractériser davantage les phénomènes observés, il serait pertinent d'établir si les effets du traitement à l'IR sur les lymphocytes Treg et les lymphocytes iNKT sont transitoires ou persistants, et ce, grâce à un suivi prolongé des patients atteints de la MG. Ceci permettrait d'étudier l'évolution des effets du traitement sur ces populations lymphocytaires et amènerait une meilleure compréhension de la régulation de la réponse immune sur le développement d'atteintes auto-immunes. Dans le cas d'un prétraitement avec un ATS, il serait utile de mesurer l'incidence de l'orbitopathie suivant l'IR. En ce sens, l'analyse de variables cliniques devrait être incorporée à la recherche longitudinale dans l'éventualité de trouver un lien avec les paramètres immuns observés. Ces informations seraient complémentaires à l'analyse des perspectives d'une telle médication en vue du traitement à l'IR, comme discuté précédemment. Il serait également pertinent d'évaluer les lymphocytes iNKT et les lymphocytes Treg dans un modèle murin de la MG soumis à la radiation. Ceci pourrait apporter des informations clés sur la capacité de résistance et le fonctionnement de ces lymphocytes *in vivo* dans un contexte d'irradiation et d'auto-immunité. Ces connaissances se transposeraient à des avenues de recherche chez

l'humain, particulièrement en ce qui a trait aux conséquences d'un traitement requérant de la radioactivité, comme l'IR.

Les lymphocytes T de type régulateur sont activement engagés dans la régulation d'une panoplie de réponses immunes physiologiques et pathologiques, dont les maladies auto-immunes. Certains d'entre eux, dont les lymphocytes Treg et les lymphocytes iNKT, contribuent à la pathogenèse de la MG. La recherche de facteurs pouvant altérer ces populations lymphocytaires est cruciale dans le but d'approfondir nos connaissances de la maladie. La fenêtre temporelle suivant le traitement à l'IR de la MG s'est avérée une période de choix pour étudier une altération des lymphocytes Treg et des lymphocytes iNKT qui corroborait l'amplification de l'auto-immunité décrite après ce traitement. Cette étude contribue à de nouvelles perspectives sur la régulation immunitaire déficiente après le traitement de l'hyperthyroïdie auto-immune. En définitive, améliorer notre connaissance des lymphocytes T de type régulateur dans les maladies auto-immunes contribuera non seulement à évaluer la réponse aux traitements, mais également à prédire l'évolution des maladies et à ouvrir la voie à des stratégies thérapeutiques.

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier particulièrement la Dre Diane Rottembourg de m'avoir permis de réaliser ce projet de recherche, et ce, en déployant une confiance en mes capacités. Votre rigueur scientifique ainsi que votre côté humain ont été le juste équilibre tout au long de ma maîtrise. Votre passion pour la recherche restera une source d'inspiration.

J'aimerais remercier le Dr Marek Rola-Pleszczynski pour sa grande contribution au projet, tant par ses critiques constructives que par ses connaissances professionnelles. Merci également d'avoir accepté la révision de ce mémoire.

En ce sens, je tiens aussi à remercier le Dr Denis Gris ainsi que le Dr Jean Verreault d'avoir accepté la révision du mémoire. Votre disponibilité et votre aide généreuse tout au long de ma maîtrise ont été très appréciées.

Un très grand merci à la Dre Jana Stankova pour m'avoir intégrée au sein de votre laboratoire avec le Dr Marek Rola-Pleszczynski. Vos commentaires et suggestions ont toujours été pertinents dans l'évolution du projet de recherche.

Merci à Sylvie Turcotte, pour la précieuse aide technique, ainsi qu'à toute l'équipe du laboratoire pour les moments de bonheur à n'en plus finir : Louiza, Marie, Fanny, Gregory, Geneviève et Daniel.

Je tiens également à remercier mes parents et mon conjoint pour leur grande écoute et leur encouragement.

Je suis reconnaissante envers le Fonds de recherche du Québec en santé (FRQS) pour leur soutien financier.



Finalement, un merci du fond du cœur à tous les patients et individus recrutés dans ce projet pour leur généreuse contribution.

## LISTE DES RÉFÉRENCES

1. Agretti P, De Marco G, De Servi M, Marcocci C, Vitti P, Pinchera A, Tonacchera M (2005) Evidence for protein and mRNA TSHr expression in fibroblasts from patients with thyroid-associated ophthalmopathy (TAO) after adipocytic differentiation. *Eur J Endocrinol* 152(5): 777-84.
2. Allan SE, Crome SQ, Crellin NK, Passerini L, Steiner TS, Bacchetta R, Roncarolo MG, Levings MK (2007) Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int Immunol* 19(4): 345-54.
3. Allen CD, Okada T, Cyster JG (2007) Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity* 27(2): 190-202.
4. Andersen MH (2014) Potential roles of self-reactive T cells in autoimmunity: lessons from cancer immunology. *Immunol Res*.
5. Andersson J, Tran DQ, Pesu M, Davidson TS, Ramsey H, O'Shea JJ, Shevach EM (2008) CD4+ FoxP3+ regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF-beta-dependent manner. *J Exp Med* 205(9): 1975-81.
6. Andrade VA, Gross JL, Maia AL (2001) The effect of methimazole pretreatment on the efficacy of radioactive iodine therapy in Graves' hyperthyroidism: one-year follow-up of a prospective, randomized study. *J Clin Endocrinol Metab* 86(8): 3488-93.
7. Andrade VA, Gross JL, Maia AL (2004) Serum thyrotropin-receptor autoantibodies levels after I therapy in Graves' patients: effect of pretreatment with methimazole evaluated by a prospective, randomized study. *Eur J Endocrinol* 151(4): 467-74.
8. Antonelli A, Ferrari SM, Corrado A, Ferrannini E, Fallahi P (2013) Increase of interferon-gamma inducible CXCL9 and CXCL11 serum levels in patients with active Graves' disease and modulation by methimazole therapy. *Thyroid* 23(11): 1461-9.
9. Antonelli A, Rotondi M, Fallahi P, Grosso M, Boni G, Ferrari SM, Romagnani P, Serio M, Mariani G, Ferrannini E (2007) Iodine-131 given for therapeutic purposes modulates differently interferon-gamma-inducible alpha-chemokine CXCL10 serum levels in patients with active Graves' disease or toxic nodular goiter. *J Clin Endocrinol Metab* 92(4): 1485-90.
10. Antonelli A, Rotondi M, Ferrari SM, Fallahi P, Romagnani P, Franceschini SS, Serio M, Ferrannini E (2006) Interferon-gamma-inducible alpha-chemokine CXCL10 involvement in Graves' ophthalmopathy: modulation by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists. *J Clin Endocrinol Metab* 91(2): 614-20.
11. Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F (1999) An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* 190(7): 995-1004.
12. Awwad M, North RJ (1988) Sublethal, whole-body ionizing irradiation can be tumor promotive or tumor destructive depending on the stage of development of underlying antitumor immunity. *Cancer Immunol Immunother* 26(1): 55-60.
13. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA (2001) CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 167(3): 1245-53.
14. Baecher-Allan C, Hafler DA (2006) Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease. *Immunol Rev* 212: 203-16.
15. Bahn RS (2010) Graves' ophthalmopathy. *N Engl J Med* 362(8): 726-38.

16. Bahn RS, Dutton CM, Natt N, Joba W, Spitzweg C, Heufelder AE (1998) Thyrotropin receptor expression in Graves' orbital adipose/connective tissues: potential autoantigen in Graves' ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab* 83(3): 998-1002.
17. Bahn RS, Heufelder AE (1993) Pathogenesis of Graves' ophthalmopathy. *N Engl J Med* 329(20): 1468-75.
18. Ban Y, Greenberg DA, Concepcion ES, Tomer Y (2002) A germline single nucleotide polymorphism at the intracellular domain of the human thyrotropin receptor does not have a major effect on the development of Graves' disease. *Thyroid* 12(12): 1079-83.
19. Bardel E, Larousserie F, Charlot-Rabiega P, Coulomb-L'Hermine A, Devergne O (2008) Human CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells do not constitutively express IL-35. *J Immunol* 181(10): 6898-905.
20. Bartalena L (2013) Diagnosis and management of Graves disease: a global overview. *Nat Rev Endocrinol* 9(12): 724-34.
21. Bartalena L, Marcocci C, Bogazzi F, Manetti L, Tanda ML, Dell'Unto E, Bruno-Bossio G, Nardi M, Bartolomei MP, Lepri A, Rossi G, Martino E, Pinchera A (1998) Relation between therapy for hyperthyroidism and the course of Graves' ophthalmopathy. *N Engl J Med* 338(2): 73-8.
22. Bartalena L, Pinchera A, Marcocci C (2000) Management of Graves' ophthalmopathy: reality and perspectives. *Endocr Rev* 21(2): 168-99.
23. Belkaid Y (2007) Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol* 7(11): 875-88.
24. Ben-Menachem G, Kubler-Kielb J, Coxon B, Yergey A, Schneerson R (2003) A newly discovered cholesteryl galactoside from *Borrelia burgdorferi*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(13): 7913-8.
25. Bendelac A, Savage PB, Teyton L (2007) The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol* 25: 297-336.
26. Bergmann C, Strauss L, Zeidler R, Lang S, Whiteside TL (2007) Expansion and characteristics of human T regulatory type 1 cells in co-cultures simulating tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother* 56(9): 1429-42.
27. Bluestone JA (2005) Regulatory T-cell therapy: is it ready for the clinic? *Nat Rev Immunol* 5(4): 343-9.
28. Bluestone JA, Abbas AK (2003) Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 3(3): 253-7.
29. Bogazzi F, Martino E, Bartalena L (2003) Antithyroid drug treatment prior to radioiodine therapy for Graves' disease: yes or no? *J Endocrinol Invest* 26(2): 174-6.
30. Bonnema SJ, Bartalena L, Toft AD, Hegedus L (2002) Controversies in radioiodine therapy: relation to ophthalmopathy, the possible radioprotective effect of antithyroid drugs, and use in large goitres. *Eur J Endocrinol* 147(1): 1-11.
31. Bour-Jordan H, Salomon BL, Thompson HL, Szot GL, Bernhard MR, Bluestone JA (2004) Costimulation controls diabetes by altering the balance of pathogenic and regulatory T cells. *J Clin Invest* 114(7): 979-87.
32. Brent GA (2008) Clinical practice. Graves' disease. *N Engl J Med* 358(24): 2594-605.
33. Brigl M, Brenner MB (2004) CD1: antigen presentation and T cell function. *Annu Rev Immunol* 22: 817-90.

34. Brix TH, Kyvik KO, Christensen K, Hegedus L (2001) Evidence for a major role of heredity in Graves' disease: a population-based study of two Danish twin cohorts. *J Clin Endocrinol Metab* 86(2): 930-4.
35. Brucklacher-Waldert V, Carr EJ, Linterman MA, Veldhoen M (2014) Cellular Plasticity of CD4+ T Cells in the Intestine. *Front Immunol* 5: 488.
36. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepers B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F (2001) Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 27(1): 68-73.
37. Buckner JH (2010) Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 10(12): 849-59.
38. Cao X, Cai SF, Fehniger TA, Song J, Collins LI, Piwnicka-Worms DR, Ley TJ (2007) Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* 27(4): 635-46.
39. Cassese G, Arce S, Hauser AE, Lehnert K, Moewes B, Mostarac M, Muehlinghaus G, Szyska M, Radbruch A, Manz RA (2003) Plasma cell survival is mediated by synergistic effects of cytokines and adhesion-dependent signals. *J Immunol* 171(4): 1684-90.
40. Cerutti A, Zan H, Schaffer A, Bergsagel L, Harindranath N, Max EE, Casali P (1998) CD40 ligand and appropriate cytokines induce switching to IgG, IgA, and IgE and coordinated germinal center and plasmacytoid phenotypic differentiation in a human monoclonal IgM+IgD+ B cell line. *J Immunol* 160(5): 2145-57.
41. Chang YJ, Huang JR, Tsai YC, Hung JT, Wu D, Fujio M, Wong CH, Yu AL (2007) Potent immune-modulating and anticancer effects of NKT cell stimulatory glycolipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(25): 10299-304.
42. Chazenbalk GD, Pichurin P, Chen CR, Latrofa F, Johnstone AP, McLachlan SM, Rapoport B (2002) Thyroid-stimulating autoantibodies in Graves disease preferentially recognize the free A subunit, not the thyrotropin holoreceptor. *J Clin Invest* 110(2): 209-17.
43. Chen CR, Pichurin P, Nagayama Y, Latrofa F, Rapoport B, McLachlan SM (2003) The thyrotropin receptor autoantigen in Graves disease is the culprit as well as the victim. *J Clin Invest* 111(12): 1897-904.
44. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM (2003) 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* 198(12): 1875-86.
45. Collison LW, Vignali DA (2011) In vitro Treg suppression assays. *Methods Mol Biol* 707: 21-37.
46. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, Cross R, Sehy D, Blumberg RS, Vignali DA (2007) The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450(7169): 566-9.
47. Cooper DS (2005) Antithyroid drugs. *N Engl J Med* 352(9): 905-17.
48. Cooper DS (2003) Hyperthyroidism. *Lancet* 362(9382): 459-68.
49. Corrales JJ, Orfao A, Miralles JM, San Miguel J (1994) The relationship between hyperthyroidism and the distribution of peripheral blood T, NK and B-lymphocytes in multinodular goiter. *Horm Metab Res* 26(2): 104-8.

50. Costagliola S, Many MC, Deneff JF, Pohlenz J, Refetoff S, Vassart G (2000) Genetic immunization of outbred mice with thyrotropin receptor cDNA provides a model of Graves' disease. *J Clin Invest* 105(6): 803-11.
51. Cote-Bigras S, Dionne A, Asselin-Mullen P, Leblieq C, Rottembourg D (2014) Interferon-gamma ELISPOT detecting reactivity of T cells to TSH receptor peptides in Graves' disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 80(2): 296-300.
52. Couet J, de Bernard S, Loosfelt H, Saunier B, Milgrom E, Misrahi M (1996) Cell surface protein disulfide-isomerase is involved in the shedding of human thyrotropin receptor ectodomain. *Biochemistry* 35(47): 14800-5.
53. Cyster JG (1999) Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science* 286(5447): 2098-102.
54. Davies T, Marians R, Latif R (2002) The TSH receptor reveals itself. *J Clin Invest* 110(2): 161-4.
55. de Bernard S, Misrahi M, Huet JC, Beau I, Desroches A, Loosfelt H, Pichon C, Pernollet JC, Milgrom E (1999) Sequential cleavage and excision of a segment of the thyrotropin receptor ectodomain. *J Biol Chem* 274(1): 101-7.
- 55.1 De Groot LJ (2012) Graves' Disease and the Manifestations of Thyrotoxicosis. Dans [www.thyroidmanager.org](http://www.thyroidmanager.org), consulté le 9 janvier 2015. Publié par ENDOCRINE EDUCATION Inc, South Dartmouth, MA 02748.
56. De Groot LJ, Shin YH, Pan D, Gopalakrishnan G, Hennessey JV (2009) Evaluation of T cell stimulation by thyrotropin-receptor epitopes in Graves' disease. *J Endocrinol Invest* 32(1): 52-6.
57. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen JF, Enjoji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB, Robson SC (2007) Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 204(6): 1257-65.
58. Dejaco C, Duftner C, Grubeck-Loebenstien B, Schirmer M (2006) Imbalance of regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Immunology* 117(3): 289-300.
59. Dellabona P, Padovan E, Casorati G, Brockhaus M, Lanzavecchia A (1994) An invariant V alpha 24-J alpha Q/V beta 11 T cell receptor is expressed in all individuals by clonally expanded CD4-8- T cells. *J Exp Med* 180(3): 1171-6.
60. Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G (2001) Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* 193(11): 1303-10.
61. Ding BB, Bi E, Chen H, Yu JJ, Ye BH (2013) IL-21 and CD40L synergistically promote plasma cell differentiation through upregulation of Blimp-1 in human B cells. *J Immunol* 190(4): 1827-36.
62. Dong QY, Li SJ, Gao GQ, Liu XM, Li WX, Liang CG, Du WH, Wsng YL (2011) Short-term effect of radioactive iodine therapy on CXCL-10 production in Graves' disease. *Clin Invest Med* 34(5): E262.
63. Erem C, Kandemir N, Hacıhasanoglu A, Ersoz HO, Ukinc K, Kocak M (2004) Radioiodine treatment of hyperthyroidism: prognostic factors affecting outcome. *Endocrine* 25(1): 55-60.
64. Fischer K, Scotet E, Niemeyer M, Koebernick H, Zerrahn J, Maillet S, Hurwitz R, Kursar M, Bonneville M, Kaufmann SH, Schaible UE (2004) Mycobacterial phosphatidylinositol mannoside is a natural antigen for CD1d-restricted T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(29): 10685-90.

65. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4(4): 330-6.
66. Fontenot JD, Rudensky AY (2005) A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol* 6(4): 331-7.
67. Garcia-Lopez MA, Sancho D, Sanchez-Madrid F, Marazuela M (2001) Thyrocytes from autoimmune thyroid disorders produce the chemokines IP-10 and Mig and attract CXCR3+ lymphocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 86(10): 5008-16.
68. Garin MI, Chu CC, Golshayan D, Cernuda-Morollon E, Wait R, Lechler RI (2007) Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood* 109(5): 2058-65.
69. Gausling R, Trollmo C, Hafler DA (2001) Decreases in interleukin-4 secretion by invariant CD4(-)CD8(-)V alpha 24J alpha Q T cells in peripheral blood of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Clin Immunol* 98(1): 11-7.
70. Gershon RK (1975) A disquisition on suppressor T cells. *Transplant Rev* 26: 170-85.
71. Glick AB, Wodzinski A, Fu P, Levine AD, Wald DN (2013) Impairment of regulatory T-cell function in autoimmune thyroid disease. *Thyroid* 23(7): 871-8.
72. Godfrey DI, Kronenberg M (2004) Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J Clin Invest* 114(10): 1379-88.
73. Gondek DC, Lu LF, Quezada SA, Sakaguchi S, Noelle RJ (2005) Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol* 174(4): 1783-6.
74. Grant CR, Liberal R, Mieli-Vergani G, Vergani D, Longhi MS (2014) Regulatory T-cells in autoimmune diseases: Challenges, controversies and yet-unanswered questions. *Autoimmun Rev*.
75. Green EA, Gorelik L, McGregor CM, Tran EH, Flavell RA (2003) CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(19): 10878-83.
76. Grewal IS, Flavell RA (1996) The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation. *Immunol Rev* 153: 85-106.
77. Grossman WJ, Verbsky JW, Tollefsen BL, Kemper C, Atkinson JP, Ley TJ (2004) Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood* 104(9): 2840-8.
78. Gumperz JE, Miyake S, Yamamura T, Brenner MB (2002) Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *J Exp Med* 195(5): 625-36.
79. Gurgul E, Sowinski J (2011) Primary hyperthyroidism--diagnosis and treatment. Indications and contraindications for radioiodine therapy. *Nucl Med Rev Cent East Eur* 14(1): 29-32.
80. Hammond KJ, Godfrey DI (2002) NKT cells: potential targets for autoimmune disease therapy? *Tissue Antigens* 59(5): 353-63.
81. Hammond KJ, Poulton LD, Palmisano LJ, Silveira PA, Godfrey DI, Baxter AG (1998) alpha/beta-T cell receptor (TCR)+CD4-CD8- (NKT) thymocytes prevent insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic (NOD)/Lt mice by the influence of interleukin (IL)-4 and/or IL-10. *J Exp Med* 187(7): 1047-56.

82. Hancock SL, Cox RS, McDougall IR (1991) Thyroid diseases after treatment of Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 325(9): 599-605.
83. Harris NL, Ronchese F (1999) The role of B7 costimulation in T-cell immunity. *Immunol Cell Biol* 77(4): 304-11.
84. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299(5609): 1057-61.
85. Hsieh CS, Liang Y, Tzgnik AJ, Self SG, Liggitt D, Rudensky AY (2004) Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+ CD4+ T cell receptors. *Immunity* 21(2): 267-77.
86. Huang CT, Workman CJ, Flies D, Pan X, Marson AL, Zhou G, Hipkiss EL, Ravi S, Kowalski J, Levitsky HI, Powell JD, Pardoll DM, Drake CG, Vignali DA (2004) Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* 21(4): 503-13.
87. Ito T, Hanabuchi S, Wang YH, Park WR, Arima K, Bover L, Qin FX, Gilliet M, Liu YJ (2008) Two functional subsets of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus and periphery. *Immunity* 28(6): 870-80.
88. Iyer S, Bahn R (2012) Immunopathogenesis of Graves' ophthalmopathy: the role of the TSH receptor. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 26(3): 281-9.
89. Jahng AW, Maricic I, Pedersen B, Burdin N, Naidenko O, Kronenberg M, Koezuka Y, Kumar V (2001) Activation of natural killer T cells potentiates or prevents experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 194(12): 1789-99.
90. Jiang H, Chess L (2006) Regulation of immune responses by T cells. *N Engl J Med* 354(11): 1166-76.
91. Jones BM, Kwok CC, Kung AW (1999) Effect of radioactive iodine therapy on cytokine production in Graves' disease: transient increases in interleukin-4 (IL-4), IL-6, IL-10, and tumor necrosis factor-alpha, with longer term increases in interferon-gamma production. *J Clin Endocrinol Metab* 84(11): 4106-10.
92. Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettgenberg A, Knop J, Enk AH (2001) Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med* 193(11): 1285-94.
93. Kaiko GE, Horvat JC, Beagley KW, Hansbro PM (2008) Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology* 123(3): 326-38.
94. Kaneko Y, Harada M, Kawano T, Yamashita M, Shibata Y, Gejyo F, Nakayama T, Taniguchi M (2000) Augmentation of Valpha14 NKT cell-mediated cytotoxicity by interleukin 4 in an autocrine mechanism resulting in the development of concanavalin A-induced hepatitis. *J Exp Med* 191(1): 105-14.
95. Kawakami Y, Rosenberg SA (1997) Human tumor antigens recognized by T-cells. *Immunol Res* 16(4): 313-39.
96. Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Toura I, Kaneko Y, Motoki K, Ueno H, Nakagawa R, Sato H, Kondo E, Koseki H, Taniguchi M (1997) CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 278(5343): 1626-9.
97. Klatka M, Grywalska E, Partyka M, Charytanowicz M, Kiszczak-Bochynska E, Rolinski J (2014) Th17 and Treg cells in adolescents with Graves' disease. Impact of treatment with methimazole on these cell subsets. *Autoimmunity* 47(3): 201-11.
98. Klatka M, Kaszubowska L, Grywalska E, Wasiak M, Szezewczyk L, Foerster J, Cyman M, Rolinski J (2014) Treatment of Graves' disease with methimazole in children

alters the proliferation of Treg cells and CD3<sup>+</sup> T lymphocytes. *Folia Histochem Cytobiol* 52(1): 69-77.

99. Klein I, Ojamaa K (2001) Thyroid hormone and the cardiovascular system. *N Engl J Med* 344(7): 501-9.

100. Kobayashi E, Motoki K, Uchida T, Fukushima H, Koezuka Y (1995) KRN7000, a novel immunomodulator, and its antitumor activities. *Oncol Res* 7(10-11): 529-34.

101. Kojo S, Adachi Y, Keino H, Taniguchi M, Sumida T (2001) Dysfunction of T cell receptor AV24AJ18<sup>+</sup>, BV11<sup>+</sup> double-negative regulatory natural killer T cells in autoimmune diseases. *Arthritis Rheum* 44(5): 1127-38.

102. Kronenberg M, Gapin L (2002) The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat Rev Immunol* 2(8): 557-68.

103. Kumar V, Delovitch TL (2014) Different subsets of natural killer T cells may vary in their roles in health and disease. *Immunology* 142(3): 321-36.

104. Lanier LL, Chang C, Phillips JH (1994) Human NKR-P1A. A disulfide-linked homodimer of the C-type lectin superfamily expressed by a subset of NK and T lymphocytes. *J Immunol* 153(6): 2417-28.

105. Latif R, Morshed SA, Zaidi M, Davies TF (2009) The thyroid-stimulating hormone receptor: impact of thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor antibodies on multimerization, cleavage, and signaling. *Endocrinol Metab Clin North Am* 38(2): 319-41, viii.

106. Laurberg P, Wallin G, Tallstedt L, Abraham-Nordling M, Lundell G, Topping O (2008) TSH-receptor autoimmunity in Graves' disease after therapy with anti-thyroid drugs, surgery, or radioiodine: a 5-year prospective randomized study. *Eur J Endocrinol* 158(1): 69-75.

107. Lee PT, Benlagha K, Teyton L, Bendelac A (2002) Distinct functional lineages of human V(alpha)24 natural killer T cells. *J Exp Med* 195(5): 637-41.

108. Li MO, Flavell RA (2008) Contextual regulation of inflammation: a duet by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *Immunity* 28(4): 468-76.

109. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA (2006) CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4<sup>+</sup> T reg cells. *J Exp Med* 203(7): 1701-11.

110. Lynch L, Michelet X, Zhang S, Brennan PJ, Moseman A, Lester C, Besra G, Vomhof-Dekrey EE, Tighe M, Koay HF, Godfrey DI, Leadbetter EA, Sant'Angelo DB, von Andrian U, Brenner MB (2015) Regulatory iNKT cells lack expression of the transcription factor PLZF and control the homeostasis of Treg cells and macrophages in adipose tissue. *Nat Immunol* 16(1): 85-95.

111. Lytton SD, Ponto KA, Kanitz M, Matheis N, Kohn LD, Kahaly GJ (2010) A novel thyroid stimulating immunoglobulin bioassay is a functional indicator of activity and severity of Graves' orbitopathy. *J Clin Endocrinol Metab* 95(5): 2123-31.

112. Makita S, Kanai T, Oshima S, Uraushihara K, Totsuka T, Sawada T, Nakamura T, Koganei K, Fukushima T, Watanabe M (2004) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup> T cells in human intestinal lamina propria as regulatory cells. *J Immunol* 173(5): 3119-30.

113. Malek TR, Yu A, Vincek V, Scibelli P, Kong L (2002) CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity* 17(2): 167-78.



114. Mao C, Wang S, Xiao Y, Xu J, Jiang Q, Jin M, Jiang X, Guo H, Ning G, Zhang Y (2011) Impairment of regulatory capacity of CD4+CD25+ regulatory T cells mediated by dendritic cell polarization and hyperthyroidism in Graves' disease. *J Immunol* 186(8): 4734-43.
115. Marazuela M, Garcia-Lopez MA, Figueroa-Vega N, de la Fuente H, Alvarado-Sanchez B, Monsivais-Urenda A, Sanchez-Madrid F, Gonzalez-Amaro R (2006) Regulatory T cells in human autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab* 91(9): 3639-46.
116. Martin A, Nakashima M, Zhou A, Aronson D, Werner AJ, Davies TF (1997) Detection of major T cell epitopes on human thyroid stimulating hormone receptor by overriding immune heterogeneity in patients with Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 82(10): 3361-6.
117. McGregor AM, Petersen MM, McLachlan SM, Rooke P, Smith BR, Hall R (1980) Carbimazole and the autoimmune response in Graves' disease. *N Engl J Med* 303(6): 302-7.
118. McMurchy AN, Levings MK (2012) Suppression assays with human T regulatory cells: a technical guide. *Eur J Immunol* 42(1): 27-34.
119. Metelitsa LS, Naidenko OV, Kant A, Wu HW, Loza MJ, Perussia B, Kronenberg M, Seeger RC (2001) Human NKT cells mediate antitumor cytotoxicity directly by recognizing target cell CD1d with bound ligand or indirectly by producing IL-2 to activate NK cells. *J Immunol* 167(6): 3114-22.
120. Mikos H, Mikos M, Obara-Moszynska M, Niedziela M (2014) The role of the immune system and cytokines involved in the pathogenesis of autoimmune thyroid disease (AITD). *Endokrynol Pol* 65(2): 150-5.
121. Mitsiades N, Poulaki V, Tseleni-Balafouta S, Chrousos GP, Koutras DA (2000) Fas ligand expression in thyroid follicular cells from patients with thionamide-treated Graves' disease. *Thyroid* 10(7): 527-32.
122. Miyara M, Amoura Z, Parizot C, Badoual C, Dorgham K, Trad S, Nochy D, Debre P, Piette JC, Gorochoff G (2005) Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 175(12): 8392-400.
123. Miyara M, Ito Y, Sakaguchi S (2014) TREG-cell therapies for autoimmune rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 10(9): 543-51.
124. Miyara M, Sakaguchi S (2011) Human FoxP3(+)CD4(+) regulatory T cells: their knowns and unknowns. *Immunol Cell Biol* 89(3): 346-51.
125. Moody DB, Zajonc DM, Wilson IA (2005) Anatomy of CD1-lipid antigen complexes. *Nat Rev Immunol* 5(5): 387-99.
126. Moshkelgosha S, So PW, Deasy N, Diaz-Cano S, Banga JP (2013) Cutting edge: retrobulbar inflammation, adipogenesis, and acute orbital congestion in a preclinical female mouse model of Graves' orbitopathy induced by thyrotropin receptor plasmid-in vivo electroporation. *Endocrinology* 154(9): 3008-15.
127. Mullins RJ, Cohen SB, Webb LM, Chernajovsky Y, Dayan CM, Londei M, Feldmann M (1995) Identification of thyroid stimulating hormone receptor-specific T cells in Graves' disease thyroid using autoantigen-transfected Epstein-Barr virus-transformed B cell lines. *J Clin Invest* 96(1): 30-7.
128. Mumtaz M, Lin LS, Hui KC, Mohd Khir AS (2009) Radioiodine I-131 for the therapy of graves' disease. *Malays J Med Sci* 16(1): 25-33.
129. Nagayama Y, Kita-Furuyama M, Ando T, Nakao K, Mizuguchi H, Hayakawa T, Eguchi K, Niwa M (2002) A novel murine model of Graves' hyperthyroidism with

intramuscular injection of adenovirus expressing the thyrotropin receptor. *J Immunol* 168(6): 2789-94.

130. Nagayama Y, Watanabe K, Niwa M, McLachlan SM, Rapoport B (2004) Schistosoma mansoni and alpha-galactosylceramide: prophylactic effect of Th1 Immune suppression in a mouse model of Graves' hyperthyroidism. *J Immunol* 173(3): 2167-73.

131. Nagy EV, Morris JC, Burch HB, Bhatia S, Salata K, Burman KD (1995) Thyrotropin receptor T cell epitopes in autoimmune thyroid disease. *Clin Immunol Immunopathol* 75(2): 117-24.

132. Ng WF, Duggan PJ, Ponchel F, Matarese G, Lombardi G, Edwards AD, Isaacs JD, Lechler RI (2001) Human CD4(+)CD25(+) cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood* 98(9): 2736-44.

133. Nishikawa H, Kato T, Tanida K, Hiasa A, Tawara I, Ikeda H, Ikarashi Y, Wakasugi H, Kronenberg M, Nakayama T, Taniguchi M, Kuribayashi K, Old LJ, Shiku H (2003) CD4+ CD25+ T cells responding to serologically defined autoantigens suppress antitumor immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(19): 10902-6.

134. Nishikawa H, Sakaguchi S (2014) Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 27: 1-7.

135. Nishikawa H, Sakaguchi S (2010) Regulatory T cells in tumor immunity. *Int J Cancer* 127(4): 759-67.

136. Nishimura E, Sakihama T, Setoguchi R, Tanaka K, Sakaguchi S (2004) Induction of antigen-specific immunologic tolerance by in vivo and in vitro antigen-specific expansion of naturally arising Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol* 16(8): 1189-201.

137. Nowak M, Stein-Streilein J (2007) Invariant NKT cells and tolerance. *Int Rev Immunol* 26(1-2): 95-119.

138. Nygaard B, Metcalfe RA, Phipps J, Weetman AP, Hegedus L (1999) Graves' disease and thyroid associated ophthalmopathy triggered by 131I treatment of non-toxic goiter. *J Endocrinol Invest* 22(6): 481-5.

139. O'Reilly V, Zeng SG, Bricard G, Atzberger A, Hogan AE, Jackson J, Feighery C, Porcelli SA, Doherty DG (2011) Distinct and overlapping effector functions of expanded human CD4+, CD8alpha+ and CD4-CD8alpha- invariant natural killer T cells. *PLoS One* 6(12): e28648.

140. Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG (2011) Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol* 29: 71-109.

141. Pan D, Shin YH, Gopalakrishnan G, Hennessey J, De Groot LJ (2009) Regulatory T cells in Graves' disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 71(4): 587-93.

142. Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ (2007) CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol* 8(12): 1353-62.

143. Papiernik M, de Moraes ML, Pontoux C, Vasseur F, Penit C (1998) Regulatory CD4 T cells: expression of IL-2R alpha chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency. *Int Immunol* 10(4): 371-8.

144. Park SH, Roark JH, Bendelac A (1998) Tissue-specific recognition of mouse CD1 molecules. *J Immunol* 160(7): 3128-34.

145. Parma J, Duprez L, Van Sande J, Hermans J, Rocmans P, Van Vliet G, Costagliola S, Rodien P, Dumont JE, Vassart G (1997) Diversity and prevalence of somatic mutations

in the thyrotropin receptor and Gs alpha genes as a cause of toxic thyroid adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 82(8): 2695-701.

146. Paust S, Lu L, McCarty N, Cantor H (2004) Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(28): 10398-403.

147. Ponto KA, Zang S, Kahaly GJ (2010) The tale of radioiodine and Graves' orbitopathy. *Thyroid* 20(7): 785-93.

148. Rapoport B, Chazenbalk GD, Jaume JC, McLachlan SM (1998) The thyrotropin (TSH) receptor: interaction with TSH and autoantibodies. *Endocr Rev* 19(6): 673-716.

149. Reddy J, Illes Z, Zhang X, Encinas J, Pyrdol J, Nicholson L, Sobel RA, Wucherpfennig KW, Kuchroo VK (2004) Myelin proteolipid protein-specific CD4+CD25+ regulatory cells mediate genetic resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(43): 15434-9.

150. Rees Smith B, McLachlan SM, Furmaniak J (1988) Autoantibodies to the thyrotropin receptor. *Endocr Rev* 9(1): 106-21.

151. Romagnani P, Rotondi M, Lazzeri E, Lasagni L, Francalanci M, Buonamano A, Milani S, Vitti P, Chiovato L, Tonacchera M, Bellastella A, Serio M (2002) Expression of IP-10/CXCL10 and MIG/CXCL9 in the thyroid and increased levels of IP-10/CXCL10 in the serum of patients with recent-onset Graves' disease. *Am J Pathol* 161(1): 195-206.

152. Roman-Gonzalez A, Moreno ME, Alfaro JM, Uribe F, Latorre-Sierra G, Rugeles MT, Montoya CJ (2009) Frequency and function of circulating invariant NKT cells in autoimmune diabetes mellitus and thyroid diseases in Colombian patients. *Hum Immunol* 70(4): 262-8.

153. Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK (2006) Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 212: 28-50.

154. Ross DS (2011) Radioiodine therapy for hyperthyroidism. *N Engl J Med* 364(6): 542-50.

155. Sadlack B, Lohler J, Schorle H, Klebb G, Haber H, Sickel E, Noelle RJ, Horak I (1995) Generalized autoimmune disease in interleukin-2-deficient mice is triggered by an uncontrolled activation and proliferation of CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 25(11): 3053-9.

156. Saitoh O, Nagayama Y (2006) Regulation of Graves' hyperthyroidism with naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells in a mouse model. *Endocrinology* 147(5): 2417-22.

157. Sakaguchi S (2004) Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 22: 531-62.

158. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA (2010) FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 10(7): 490-500.

159. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M (1995) Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155(3): 1151-64.

160. Salvi M, Girasole G, Pedrazzoni M, Passeri M, Giuliani N, Minelli R, Braverman LE, Roti E (1996) Increased serum concentrations of interleukin-6 (IL-6) and soluble IL-6 receptor in patients with Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 81(8): 2976-9.

161. Sanders J, Chirgadze DY, Sanders P, Baker S, Sullivan A, Bhardwaja A, Bolton J, Reeve M, Nakatake N, Evans M, Richards T, Powell M, Miguel RN, Blundell TL,

- Furmaniak J, Smith BR (2007) Crystal structure of the TSH receptor in complex with a thyroid-stimulating autoantibody. *Thyroid* 17(5): 395-410.
162. Schubert LA, Jeffery E, Zhang Y, Ramsdell F, Ziegler SF (2001) Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *J Biol Chem* 276(40): 37672-9.
163. Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, Solomon M, Selby W, Alexander SI, Nanan R, Kelleher A, Fazekas de St Groth B (2006) Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 203(7): 1693-700.
164. Shevach EM (2009) Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 30(5): 636-45.
165. Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S (1999) Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol* 163(10): 5211-8.
166. Siegel RD, Lee SL (1998) Toxic nodular goiter. Toxic adenoma and toxic multinodular goiter. *Endocrinol Metab Clin North Am* 27(1): 151-68.
167. Singh NJ, Schwartz RH (2006) Primer: mechanisms of immunologic tolerance. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2(1): 44-52.
168. Smyth MJ, Crowe NY, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H, Godfrey DI (2002) NKT cells - conductors of tumor immunity? *Curr Opin Immunol* 14(2): 165-71.
169. Sonoda KH, Faunce DE, Taniguchi M, Exley M, Balk S, Stein-Streilein J (2001) NK T cell-derived IL-10 is essential for the differentiation of antigen-specific T regulatory cells in systemic tolerance. *J Immunol* 166(1): 42-50.
170. Stenszky V, Kozma L, Balazs C, Rochlitz S, Bear JC, Farid NR (1985) The genetics of Graves' disease: HLA and disease susceptibility. *J Clin Endocrinol Metab* 61(4): 735-40.
171. Strauss L, Bergmann C, Whiteside TL (2009) Human circulating CD4+CD25highFoxp3+ regulatory T cells kill autologous CD8+ but not CD4+ responder cells by Fas-mediated apoptosis. *J Immunol* 182(3): 1469-80.
172. Streilein JW, Niederkorn JY (1981) Induction of anterior chamber-associated immune deviation requires an intact, functional spleen. *J Exp Med* 153(5): 1058-67.
173. Suzuki H, Kundig TM, Furlonger C, Wakeham A, Timms E, Matsuyama T, Schmits R, Simard JJ, Ohashi PS, Griesser H, et al. (1995) Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. *Science* 268(5216): 1472-6.
174. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, Shimizu J, Sakaguchi S (1998) Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 10(12): 1969-80.
175. Takahashi T, Kurokawa M (2009) Human invariant natural killer T cells: implications for immunotherapy. *Int J Hematol* 90(2): 137-42.
176. Takasu N, Oshiro C, Akamine H, Komiya I, Nagata A, Sato Y, Yoshimura H, Ito K (1997) Thyroid-stimulating antibody and TSH-binding inhibitor immunoglobulin in 277 Graves' patients and in 686 normal subjects. *J Endocrinol Invest* 20(8): 452-61.
177. Teng WP, Stark R, Munro AJ, Young SM, Borysiewicz LK, Weetman AP (1990) Peripheral blood T cell activation after radioiodine treatment for Graves' disease. *Acta Endocrinol (Copenh)* 122(2): 233-40.

178. Thiruppathi M, Rowin J, Ganesh B, Sheng JR, Prabhakar BS, Meriggioli MN (2012) Impaired regulatory function in circulating CD4(+)CD25(high)CD127(low/-) T cells in patients with myasthenia gravis. *Clin Immunol* 145(3): 209-23.
179. Thornton AM, Shevach EM (1998) CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 188(2): 287-96.
180. Todd I, Pujol-Borrell R, Hammond LJ, Bottazzo GF, Feldmann M (1985) Interferon-gamma induces HLA-DR expression by thyroid epithelium. *Clin Exp Immunol* 61(2): 265-73.
181. Tonacchera M, Agretti P, Chiovato L, Rosellini V, Ceccarini G, Perri A, Viacava P, Naccarato AG, Miccoli P, Pinchera A, Vitti P (2000) Activating thyrotropin receptor mutations are present in nonadenomatous hyperfunctioning nodules of toxic or autonomous multinodular goiter. *J Clin Endocrinol Metab* 85(6): 2270-4.
182. Traisk F, Tallstedt L, Abraham-Nordling M, Andersson T, Berg G, Calissendorff J, Hallengren B, Hedner P, Lantz M, Nystrom E, Ponjavic V, Taube A, Topping O, Wallin G, Asman P, Lundell G (2009) Thyroid-associated ophthalmopathy after treatment for Graves' hyperthyroidism with antithyroid drugs or iodine-131. *J Clin Endocrinol Metab* 94(10): 3700-7.
183. van der Vliet HJ, von Blomberg BM, Nishi N, Reijm M, Voskuyl AE, van Bodegraven AA, Polman CH, Rustemeyer T, Lips P, van den Eertwegh AJ, Giaccone G, Scheper RJ, Pinedo HM (2001) Circulating V(alpha24+) Vbeta11+ NKT cell numbers are decreased in a wide variety of diseases that are characterized by autoreactive tissue damage. *Clin Immunol* 100(2): 144-8.
184. Van Kaer L (2005) alpha-Galactosylceramide therapy for autoimmune diseases: prospects and obstacles. *Nat Rev Immunol* 5(1): 31-42.
185. Van Parijs L, Abbas AK (1998) Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science* 280(5361): 243-8.
186. Vasu C, Gorla SR, Prabhakar BS, Holterman MJ (2003) Targeted engagement of CTLA-4 prevents autoimmune thyroiditis. *Int Immunol* 15(5): 641-54.
187. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ (2008) How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 8(7): 523-32.
188. Volpe R (2001) The immunomodulatory effects of anti-thyroid drugs are mediated via actions on thyroid cells, affecting thyrocyte-immunocyte signalling: a review. *Curr Pharm Des* 7(6): 451-60.
189. Vos XG, Smit N, Endert E, Tijssen JG, Wiersinga WM (2008) Frequency and characteristics of TBII-seronegative patients in a population with untreated Graves' hyperthyroidism: a prospective study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 69(2): 311-7.
190. Wang B, Geng YB, Wang CR (2001) CD1-restricted NK T cells protect nonobese diabetic mice from developing diabetes. *J Exp Med* 194(3): 313-20.
191. Wang H, Zhao S, Tang X, Li J, Zou P (2006) Changes of regulatory T cells in Graves' disease. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 26(5): 545-7.
192. Watanabe M, Nakamura Y, Matsuzuka F, Takamura Y, Miyauchi A, Iwatani Y (2008) Decrease of intrathyroidal CD161+Valpha24+Vbeta11+ NKT cells in Graves' disease. *Endocr J* 55(1): 199-203.
193. Weetman AP (2000) Graves' disease. *N Engl J Med* 343(17): 1236-48.

194. Weetman AP, Holt ME, Campbell AK, Hall R, McGregor AM (1984) Methimazole and generation of oxygen radicals by monocytes: potential role in immunosuppression. *Br Med J (Clin Res Ed)* 288(6416): 518-20.
195. Weetman AP, McGregor AM, Wheeler MH, Hall R (1984) Extrathyroidal sites of autoantibody synthesis in Graves' disease. *Clin Exp Immunol* 56(2): 330-6.
196. Weetman AP, Yateman ME, Ealey PA, Black CM, Reimer CB, Williams RC, Jr., Shine B, Marshall NJ (1990) Thyroid-stimulating antibody activity between different immunoglobulin G subclasses. *J Clin Invest* 86(3): 723-7.
197. Wiersinga WM, Smit T, van der Gaag R, Koornneef L (1988) Temporal relationship between onset of Graves' ophthalmopathy and onset of thyroidal Graves' disease. *J Endocrinol Invest* 11(8): 615-9.
198. Wildin RS, Smyk-Pearson S, Filipovich AH (2002) Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *J Med Genet* 39(8): 537-45.
199. Wilson R, McKillop JH, Pearson C, Burnett AK, Thomson JA (1988) Differential immunosuppressive action of carbimazole and propylthiouracil. *Clin Exp Immunol* 73(2): 312-5.
200. Wilson SB, Kent SC, Patton KT, Orban T, Jackson RA, Exley M, Porcelli S, Schatz DA, Atkinson MA, Balk SP, Strominger JL, Hafler DA (1998) Extreme Th1 bias of invariant Valpha24JalphaQ T cells in type 1 diabetes. *Nature* 391(6663): 177-81.
201. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, Nomura T, Sakaguchi S (2008) CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 322(5899): 271-5.
202. Wing K, Sakaguchi S (2010) Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol* 11(1): 7-13.
203. Xia Y, Kellems RE (2011) Receptor-activating autoantibodies and disease: preeclampsia and beyond. *Expert Rev Clin Immunol* 7(5): 659-74.
204. Yagi H, Nomura T, Nakamura K, Yamazaki S, Kitawaki T, Hori S, Maeda M, Onodera M, Uchiyama T, Fujii S, Sakaguchi S (2004) Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol* 16(11): 1643-56.
205. Yang JQ, Chun T, Liu H, Hong S, Bui H, Van Kaer L, Wang CR, Singh RR (2004) CD1d deficiency exacerbates inflammatory dermatitis in MRL-lpr/lpr mice. *Eur J Immunol* 34(6): 1723-32.
206. Yang XO, Nurieva R, Martinez GJ, Kang HS, Chung Y, Pappu BP, Shah B, Chang SH, Schluns KS, Watowich SS, Feng XH, Jetten AM, Dong C (2008) Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity* 29(1): 44-56.
207. Yao Z, Jones J, Kohrt H, Strober S (2011) Selective resistance of CD44hi T cells to p53-dependent cell death results in persistence of immunologic memory after total body irradiation. *J Immunol* 187(8): 4100-8.
208. Zai A, Rudd MA, Scribner AW, Loscalzo J (1999) Cell-surface protein disulfide isomerase catalyzes transnitrosation and regulates intracellular transfer of nitric oxide. *J Clin Invest* 103(3): 393-9.
209. Zeissig S, Olszak T, Melum E, Blumberg RS (2013) Analyzing antigen recognition by Natural Killer T cells. *Methods Mol Biol* 960: 557-72.

210. Zhou D, Mattner J, Cantu C, 3rd, Schrantz N, Yin N, Gao Y, Sagiv Y, Hudspeth K, Wu YP, Yamashita T, Teneberg S, Wang D, Proia RL, Levery SB, Savage PB, Teyton L, Bendelac A (2004) Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells. *Science* 306(5702): 1786-9.
211. Zhou J, Bi M, Fan C, Song X, Yang R, Zhao S, Li L, Li Y, Teng W, Shan Z (2012) Regulatory T cells but not T helper 17 cells are modulated in an animal model of Graves' hyperthyroidism. *Clin Exp Med* 12(1): 39-46.
212. Zygmunt B, Veldhoen M (2011) T helper cell differentiation more than just cytokines. *Adv Immunol* 109: 159-96.