

Université  
de Toulouse

# THESE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III - Paul Sabatier  
Discipline ou spécialité : *Immunologie*

---

Présentée et soutenue par *Marianne Chabod*  
Le 14 Novembre 2011

**Titre :**

*Rôle de Themis dans l'homéostasie du système immunitaire et intestinale*

---

**JURY**

*Pr Roland LIBLAU, Président  
Dr Eliane PIAGGIO, rapporteur  
Pr Jean-Pierre HUGOT, rapporteur  
Pr Gérard LEFRANC, rapporteur  
Dr Gilbert Fournié, invité*

---

**Ecole doctorale :** *Biologie – Santé – Biotechnologies*

**Unité de recherche :** *Inserm U1043*

**Directeur(s) de Thèse :** *Dr Abdelhadi SAOUDI et Dr Anne DEJEAN*

**Rapporteurs :** *E. PIAGGIO, JP. HUGOT, G. LEFRANC*

## **Remerciements**

En premier lieu, je tiens à remercier vivement mon directeur de thèse, le Dr Abdel Saoudi qui m'a accueilli au sein de son équipe pour effectuer mon M2R puis cette thèse. Grâce à ta confiance et tes conseils éclairés, j'ai pu mener à bien cette thèse et publier un article en premier auteur. Ce bout de chemin sous ta direction m'a permis d'acquérir des qualités scientifiques (rigueur, persévérance, autonomie) indispensables pour obtenir un post-doc aux Etats-Unis.

Je remercie très chaleureusement le Dr Gilbert Fournié, « inventeur » de mon sujet de thèse. Grâce à votre perspicacité et votre persévérance, la lignée de rats BN<sup>m</sup> est née. Votre « bébé » m'a été confié et ce fut un vrai plaisir de travailler en leur compagnie durant ces quatre années.

Je tiens particulièrement à remercier le Dr Anne Dejean. Merci pour... tes mille et un dons : la rigueur, la démarche scientifique, des conseils toujours avisés, tes petites mains pour effectuer des expériences. Scientifiquement, tu m'as beaucoup apporté mais ce n'est pas tout : ton soutien sans faille, ta sympathie, ta bonne humeur et tes nombreux conseils m'ont donné la force et la foi pour aller avec succès au bout de notre aventure.

Mes remerciements vont également au Pr Roland Liblau, au Dr Daniel Dunia et au Dr Nicolas Blanchard. Vos nombreux conseils lors des réunions de labo et entre deux manips ont toujours été très judicieux et constructifs.

Je remercie le Pr Roland Liblau, qui me fait l'honneur de présider ma thèse ainsi que le Dr Piaggio, le Pr Hugot et le Pr Lefranc, qui ont accepté d'être mes rapporteurs.

Je tiens également à remercier tous les membres actuels de l'équipe AS : Isa, pour tes nombreux conseils et coups de main, Céline pour tes connaissances en « paires de bases » toujours les bienvenus et ton aide. Enfin merci à Christophe, qui continue sur le sujet Themis (malgré ces quelques infidélités, fais attention au virus « Vav » !). Tu as été d'une grande aide technique et morale. Je remercie aussi les membres de l'équipe qui ont trouvé leur bonheur professionnel ailleurs : Laurence qui m'a pris sous son aile pour le M2R, ta rigueur scientifique, ta patience et ta gentillesse m'ont beaucoup aidé durant cette année difficile ; Christine qui m'a souvent donné des coups de main (notamment pour une manip de chimères... 16h, je mélange les moelles osseuses, hé hop, nous voilà parties à l'animalerie pour

sacrifier d'autres rats et purifier d'autres cellules !), tu es d'une incroyable gentillesse ; Lucile et Laure qui m'ont aussi beaucoup aidé pour les manip, votre bonne humeur a été très appréciable. Un grand merci à Audrey qui de voisine de pipettes est devenue une amie de « pipelettes », de covoiturage, de petites bouffes entre amis, de ciné... Tu as été un soutien considérable : toujours là quand on a besoin de réconfort, détente et rire, avec des conseils toujours justes et appropriés. Surtout ne change pas...

Je remercie les membres des équipes de Roland, Daniel et Nicolas. Leur disponibilité, leur gentillesse et leur gaité permettent de travailler dans de très bonnes conditions. J'espère retrouver cette ambiance de travail conviviale aux Etats-Unis.

Mes derniers remerciements professionnels s'adressent aux personnels des plateaux techniques, en particulier le personnel de l'animalerie, de cytométrie en flux et d'histologie. Votre compétence, disponibilité et gentillesse furent d'une aide indispensable.

Mes remerciements vont maintenant à la famille et aux amis qui représentent des piliers inestimables dans la vie.

Tout d'abord, merci à mes parents et ma Galotte pour leur soutien et leur compréhension. Tous les bons moments passés ensemble (beaux voyages, week-ends...) sont inoubliables et indispensables pour décompresser un peu. Vivement les prochains... Istanbul en perspective puis les Etats-Unis !

Je remercie mes copains de l'escalade : Camille (dit p'tit gros) et Aitzi, Guillaume (dit Dsp), Pierre, Seb (dit Sichi) et Lorène, François, Yan et Sabrina, Guillaume (dit Gluck), Gaël et Elo, Sonia, Mathieu, Jeff et Chris, Alice,... Vous m'avez permis de m'évader et de passer de très bons moments remplis de fous rires. Merci d'avoir été aussi compréhensifs (surtout quand vous m'avez emmené en falaise, mes publis, mon ordi et moi !). « On s'cassse ! ». Un énorme merci à mes copains de Bordeaux, toujours dans mon cœur malgré la distance...

Enfin, un énorme (et le mot est faible) à mon Julien qui est un être exceptionnel. Ta gentillesse, ta compréhension et surtout ton amour sont des éléments clés de ma réussite. Cette thèse est un peu aussi la tienne... Merci pour tous les bons moments passés ensemble et tous ceux à venir !

# Sommaire

<b>Liste des abréviations</b>	<b>6</b>
<b>Liste des illustrations</b>	<b>8</b>
<b>Résumé</b>	<b>11</b>
<b>Abstract</b>	<b>12</b>
<b>Avant propos</b>	<b>13</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>15</b>
<b>I Développement thymique des lymphocytes T<math>\alpha\beta</math> conventionnels</b>	<b>16</b>
1 <i>Le choix du lignage T et expression du pré-TCR</i>	16
2 <i>La sélection <math>\beta</math></i>	20
3 <i>La sélection positive des lymphocytes T</i>	21
4 <i>Choix du lignage CD4/CD8</i>	22
4.1 <i>Le modèle stochastique</i>	25
4.2 <i>Le modèle instructif et le concept de la « force du signal »</i>	25
4.3 <i>Le modèle de la « durée du signal »</i>	26
4.4 <i>Modèle de la cinétique de signalisation : un modèle consensus non classique</i>	28
4.5 <i>Mécanismes moléculaires du choix du lignage CD4/CD8</i>	30
<b>II La tolérance centrale</b>	<b>35</b>
1 <i>Mécanisme de la délétion clonale</i>	35
2 <i>Les acteurs cellulaires et moléculaires de la délétion clonale</i>	37
<b>III La tolérance périphérique</b>	<b>40</b>
1 <i>La tolérance passive</i>	42
1.1 <i>L'ignorance</i>	42
1.2 <i>L'anergie conale</i>	42
1.3 <i>La déviation immune</i>	43
1.4 <i>La délétion clonale</i>	43
2 <i>La tolérance dominante</i>	44
2.1 <i>Existence de différentes populations régulatrices</i>	44
2.2 <i>Développement thymique des lymphocytes T<math>\alpha\beta</math> régulateurs Foxp3<sup>+</sup></i>	46
2.3 <i>Phénotype des nTreg</i>	52
2.4 <i>Découverte du facteur de transcription des Treg : Foxp3</i>	53
2.5 <i>Contrôle de l'homéostasie des Treg</i>	56
2.6 <i>Recirculation et localisation des Tregs</i>	59
2.7 <i>Mécanismes d'action des Treg</i>	62
2.8 <i>Treg et contrôle des différentes réponses immunes</i>	66
2.9 <i>Conséquences d'un défaut qualitatif et/ou quantitatif des Treg</i>	68
<b>IV La réponse immunitaire orchestrée par les lymphocytes T CD4 effecteurs</b>	<b>69</b>
1 <i>Fonctions des lymphocytes T CD4 effecteurs</i>	70
2 <i>Différenciation des lymphocytes T CD4 naïfs en cellules effectrices</i>	72
3 <i>Les voies de signalisation spécifiques à chaque lignage Th</i>	74
3.1 <i>Voie de signalisation Th1</i>	74
3.2 <i>Voie de signalisation Th2</i>	75
3.3 <i>Voie de signalisation Th17</i>	76
3.4 <i>Voie de signalisation T<sub>FH</sub></i>	77

3.5	Inter-régulation entre facteurs de transcription de chaque lignage	77
<b>V</b>	<b>L'intestin : un organe paradoxal d'un point de vu immunologique</b>	<b>77</b>
1	<i>Anatomie de l'intestin</i>	80
2	<i>Les tissus lymphoïdes associés aux intestins</i>	82
3	<i>Les cellules épithéliales intestinales : la première barrière</i>	82
4	<i>Le système immunitaire intestinal</i>	84
4.1	Le système immunitaire inné	84
4.2	Le système immunitaire adaptatif	88
4.3	Rôle de la flore intestinale	88
5	<i>Mécanismes de tolérance intestinale</i>	91
5.1	L'ignorance intestinale	91
5.2	Mécanismes actifs de tolérance	91
<b>VI</b>	<b>Les maladies chroniques inflammatoires des intestins</b>	<b>98</b>
1	<i>Physiopathologie des maladies chroniques inflammatoires des intestins</i>	101
1.1	Rôle de la flore commensale intestinale	101
1.2	Rupture de la fonction de barrière des cellules épithéliales intestinales	102
1.3	Rôle des cellules myéloïdes	102
1.4	Rôle des lymphocytes T CD4 effecteurs	104
1.5	Défauts de la population Treg	107
2	<i>Etiologie des maladies chroniques inflammatoires des intestins</i>	108
2.1	Facteurs génétiques	110
2.2	Facteurs environnementaux	115
3	<i>Traitements des maladies chroniques inflammatoires des intestins</i>	115
4	<i>Modèles animaux des maladies chroniques inflammatoires des intestins</i>	116
4.1	Modèles induits par des molécules chimiques	117
4.2	Modèles induits par manipulations génétiques	118
4.3	Le modèle de transfert cellulaire adoptif	120
4.4	Les modèles animaux spontanés	121
<b>OBJECTIFS</b>		<b>125</b>
<b>RESULTATS</b>		<b>126</b>
<b>Résumé de l'article</b>		<b>127</b>
<b>Article</b>		<b>129</b>
<b>Résultats supplémentaires</b>		<b>172</b>
<b>DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b>		<b>175</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>		<b>206</b>

## ***Liste des illustrations et tables***

Figure 1. Les stades de différenciation des thymocytes.

Figure 2. La localisation des thymocytes dans le thymus selon leurs stades de différenciation.

Figure 3. Les premiers modèles de choix du lignage T CD4/CD8.

Figure 4. Expression des corécepteurs CD4 et CD8 à la surface des thymocytes.

Figure 5. Modèle de la cinétique de signalisation : un modèle consensus de choix du lignage CD4/CD8.

Figure 6. Mécanismes moléculaires du choix du lignage T CD4/CD8.

Figure 7. Les différents mécanismes de tolérance centrale.

Figure 8. Sélection des thymocytes selon leur affinité pour les complexes CMH-peptide du soi.

Figure 9. Répertoire antigénique des mTEC et DC thymiques.

Figure 10. Les différents mécanismes de tolérance périphérique passive.

Figure 11. Existence de différentes populations régulatrices.

Figure 12. Modèle de différenciation des Treg à deux étapes.

Figure 13. Modèle hypothétique de sélection des Treg selon l'affinité de leur TCR.

Figure 14. Importance chez la souris (A) et l'homme (B) de l'existence des lymphocytes T CD4 régulateurs Foxp3<sup>+</sup>.

Figure 15. L'IL-2, une cytokine majeure pour l'homéostasie des Treg.

Figure 16. Rôle de l'acide rétinoïque dans la localisation des Treg.

Figure 17. Mécanismes de suppression des Treg directement sur les Tconv.

Figure 18. Mécanismes de suppression des Treg sur les Tconv via les CPA.

Figure 19. Les différentes sous-populations T CD4 effectrices.

Figure 20. Anatomie de l'appareil digestif.

Figure 21. Représentation schématique de la paroi de l'intestin grêle

Figure 22. Les GALT.

Figure 23. Capture de l'antigène au sein des GALT.

Figure 24. La réponse immune physiologique au niveau des intestins.

Figure 25. Balance entre les micro-organismes constituant la flore intestinale symbiotique et les micro-organismes pathogènes.

Figure 26. Les niches intestinales de Treg.

Figure 27. Répartition des différentes populations de Treg au niveau de l'intestin.

Figure 28. Réponse immune en cas de MICI.

Figure 29. Les MICI : des pathologies multifactorielles.

Figure 30. Découverte des gènes de susceptibilité aux MICI.

Figure 31. Structure de la protéine Themis.

Figure 32. Voie de signalisation proximale du TCR.

Figure 33 : Themis, un nouvel acteur de la signalisation proximale du TCR.

Figure 34 : Modèle biphasique de différenciation en LT Th2.

Figure 35 : Représentation schématique de partenaires de NFAT et de leur rôle.

Figure 36 : Arbre phylogénétique de 132 souches de rats de laboratoire.

Figure 37 : Importance des GWAS pour la découverte de région de susceptibilité à des pathologies auto-immunes.

Figure 38 : Un locus ou un gène prédispose à plusieurs désordres auto-immuns.

Figure 39 : Un polymorphisme dans une locus contenant Themis confère une susceptibilité à la SEP.

Table 1. Caractéristiques de la MC et de la RCH.

Table 2. Modèles de MICI dépendant des lymphocytes T CD4.

Table 3. Gènes de susceptibilité à la MC et/ou la RCH.

Table 4. Modèles animaux de MICI causés par un défaut de Treg.

Table 5. Modèles animaux de MICI causés par une activation excessive des LT CD4 effecteurs.

## ***Liste des abréviations***

- AIRE : autoimmune regulator
- AP-1 : activator protein-1
- APECED : autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy
- BN : Brown Norway
- CD : classe de différenciation
- Ced : maladie Coeliaque
- CMH : molécule majeure d'histocompatibilité
- CPA : cellule présentatrice d'antigènes
- cTEC : cellule épithéliale thymique
- CTLA-4 : cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4
- DAG : di-acyl-glycérol
- DC : cellule dendritique
- DN : double négatif
- DP : double positif
- DSS : dextran sodium sulfate
- ERK : extracellular signal-regulated kinase
- ETP : early thymic progenitor
- Foxp3 : Forkhead box P3 immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome
- GALT : intestinal-associated lymphoid tissue ou tissus lymphoïdes associés aux intestins
- GATA3 : GATA-binding protein
- GITR : glucocorticoid induced tumor necrosis factor family-related gene/protein
- GWAS : Genome-wide association studies ou étude d'association génomique
- ICOS : inducible costimulator
- IEC : cellule épithéliale intestinale
- IEL : lymphocyte intra-épithélial
- IFN : interféron
- Ig : immunoglobuline
- IL : interleukine

- IPEX : immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome
- LAP : latency-associated peptide
- LAT : linker for activation of T cells
- LB : lymphocyte B
- Lck : lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
- LT : lymphocyte T
- MALT : mucosa-associated lymphoid tissue ou tissus lymphoïdes associés aux muqueuses
- MC : maladie de Crohn
- MICI : maladie inflammatoire des intestins
- mLN : ganglion lymphatique mésentérique
- mTEC : cellule épithéliale thymique médullaire
- NFAT : nuclear factor of activated T cells
- NK : natural killer
- PLC $\gamma$ 1 : phospholipase C $\gamma$ 1
- RA : acide rétinoïque
- RAG : recombination activating gene
- RCH : rectocolite hémorragique
- ROR $\gamma$ t : Retinoinic acid-related orphan receptor  $\gamma$ t
- Runx : runt-related transcription factor
- SNP : single nucleotide polymorphism
- SP : simple positif
- STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription
- T-bet : T-cell-specific T-box transcription factor
- Tconv : lymphocyte T CD4 régulateur CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>
- TCR : T cell receptor ou récepteur des lymphocytes
- TGF- $\beta$  : transforming growth factor-  $\beta$
- Th : lymphocyte T CD4 helper ou auxiliaire
- Th-POK : T-helper-inducing POZ/Kruppel-like factor
- TLR : Toll like-receptor
- TNBS : acide trinitro benzene sulfonique
- TNF : tumor necrosis factor
- TOX : thymus HMG (high-mobility group) box protein

- TRA : antigène restreint aux tissus
- Treg : lymphocyte T CD4 régulateur CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>

## Résumé

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin sont des désordres chroniques inflammatoires dont l'étiologie est complexe et multifactorielle (facteurs environnementaux et génétiques). Le défi actuel est l'identification de variants alléliques responsables du développement de ces pathologies et l'analyse de leur contribution dans la physiopathologie. De façon intéressante, nous avons identifié une mutation spontanée dans la souche de rat Brown-Norway (BN) responsable d'une lymphopénie restreinte au compartiment T CD4, prenant origine dans le thymus et intrinsèque aux cellules T. Cette mutation a été fixée et une nouvelle lignée générée a été appelée BN<sup>m</sup> pour "BN muté". Les rats BN<sup>m</sup> développent spontanément des lésions inflammatoires affectant toutes les parties de l'intestin. Macroscopiquement, elles se caractérisent par la présence d'oedèmes et d'érythèmes associée à un épaississement de la paroi intestinale. Les analyses histologiques ont révélé des infiltrations multifocales de la paroi intestinale, composés de cellules polynucléaires, de macrophages et de quelques cellules T ; et la présence de granulomes. Cette infiltration cellulaire a été confirmée par une augmentation de l'activité de la myéloperoxydase et de l'expression de cytokines pro-inflammatoires au sein des tissus lésés. Ainsi, les caractéristiques de l'inflammation intestinale développée par les rats BN<sup>m</sup> sont similaires à celles décrites chez les patients atteints de la Maladie de Crohn. Cette pathologie est associée à une hyperactivation des lymphocytes T CD4 en périphérie. Les lymphocytes T CD4 issus de rats BN<sup>m</sup> présentent un profil de sécrétion de cytokines altéré caractérisé par une sécrétion augmentée d'IL-4, d'IL-5, d'IL-13 et d'IL-17A. De plus, les lymphocytes T régulateurs CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> des rats BN<sup>m</sup> présentent un défaut fonctionnel in vitro qui est associé avec le développement de l'inflammation intestinale. En effet, la prévalence et la sévérité du désordre intestinal peuvent être fortement réduites par le transfert de lymphocytes T régulateurs sauvages. Enfin, une analyse de liaison suivie d'une dissection génétique nous a permis d'identifier *Themis* comme le gène muté chez les rats BN<sup>m</sup>. Ainsi, *Themis* peut être considéré comme un gène candidat de susceptibilité aux pathologies inflammatoires chroniques compte tenu de son rôle dans l'homéostasie de l'intestin.

## **Abstract**

Inflammatory bowel diseases (IBD) are chronic inflammatory disorders caused by multifactorial factors in a genetically predisposed host. The current challenge lies on the identification of the causal gene variants and on the analysis of their contribution to disease pathophysiology. We identified a spontaneous mutation in Brown-Norway rats responsible for a lymphopenia restricted to the CD4 T cell compartment that originates from the thymus and is T cell autonomous. This mutation was fixed and named BN<sup>m</sup> for “BN mutated”. Interestingly, BN<sup>m</sup> rats spontaneously develop inflammatory lesions on all sections of the intestine. Oedema and erythema associated with a shortening of the intestine and thickening of the intestinal wall were evidenced. Histological analysis revealed intestine wall multifocal infiltration composed of polynucleated cells, macrophages with few T cells. Granuloma were often observed. This infiltration was confirmed by an increased myeloperoxidase activity and high levels of proinflammatory cytokines in injured tissue. Thus, the intestinal inflammation developed by BN<sup>m</sup> rat shares many features with Crohn’s disease. This disease is concomitant with CD4 T cell hyperactivation in secondary lymphoid organs. CD4 T cells from BN<sup>m</sup> rat present an altered cytokine profile with an increased secretion of IL-4, IL-5, IL-13 and IL-17A, compared to control rats. Furthermore, BN<sup>m</sup> deficiency leads to impaired regulatory T cell function in vitro and is associated with IBD development. Indeed, the occurrence of the pathology can be prevented by transfer of wild type regulatory T lymphocytes. Linkage analysis and a genetic dissection led us to identify *Themis* as the mutated gene. Thus, *Themis* should be considered henceforth as a candidate susceptibility gene for chronic inflammatory diseases through its effects on CD4 T cell polarization and regulatory T cell suppressive functions.

## ***Avant propos***

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), qui regroupent la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique sont des désordres inflammatoires chroniques affectant le tube digestif. Elles représentent actuellement un problème majeur de santé publique. En effet, ces 50 dernières années, ces pathologies ont connu une progression importante et touchent aujourd'hui plus d'une personne sur 1000 dans les pays industrialisés. "Multifactorielles", elles résultent d'interactions complexes entre plusieurs gènes et divers facteurs environnementaux. Par conséquent, il est important de comprendre le contrôle génétique et la physiopathologie de ces maladies au niveau cellulaire et moléculaire afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Cependant, chez l'Homme, leur étude génétique se heurte à l'hétérogénéité génétique des populations et à la variabilité des facteurs environnementaux. L'utilisation de modèles murins permet de contourner ces difficultés (lignées pures génétiquement homogènes, environnement "contrôlé"). La connaissance des régions de syntenie entre les génomes humain et des espèces animales permet l'application des résultats expérimentaux à la pathologie humaine.

Actuellement, la majorité des gènes associés au développement des MICI sont des gènes codant pour des protéines nécessaires à la fonction du système immunitaire suggérant ainsi que ces maladies résultent d'une dérégulation du système immunitaire. Cependant, le nombre de gènes responsables clairement identifiés reste faible. De plus, les mécanismes cellulaires et moléculaires par lesquels ces gènes influencent les MICI restent inconnus. L'enjeu actuel est de découvrir de nouveaux gènes responsables du développement des MICI chez l'Homme et de disséquer les mécanismes physiopathologiques mis en jeu. Pour cela, il faudrait disposer de modèles animaux de MICI reproduisant au mieux la physiopathologie des MICI humaines.

Dans ce contexte, le but de ma thèse a consisté à identifier le gène muté chez la souche de rat Brown-Norway, gène responsable du développement spontané d'une MICI dont les lésions macroscopiques et microscopiques sont similaires à celles décrites chez les patients atteints de la maladie de Crohn. Les mécanismes cellulaires impliqués dans la physiopathologie de cette MICI ont été disséqués. Avant de présenter les résultats de cette étude, une introduction va synthétiser nos

connaissances actuelles sur le développement des lymphocytes  $T_{\alpha\beta}$ , les mécanismes de tolérance.

# ***INTRODUCTION***

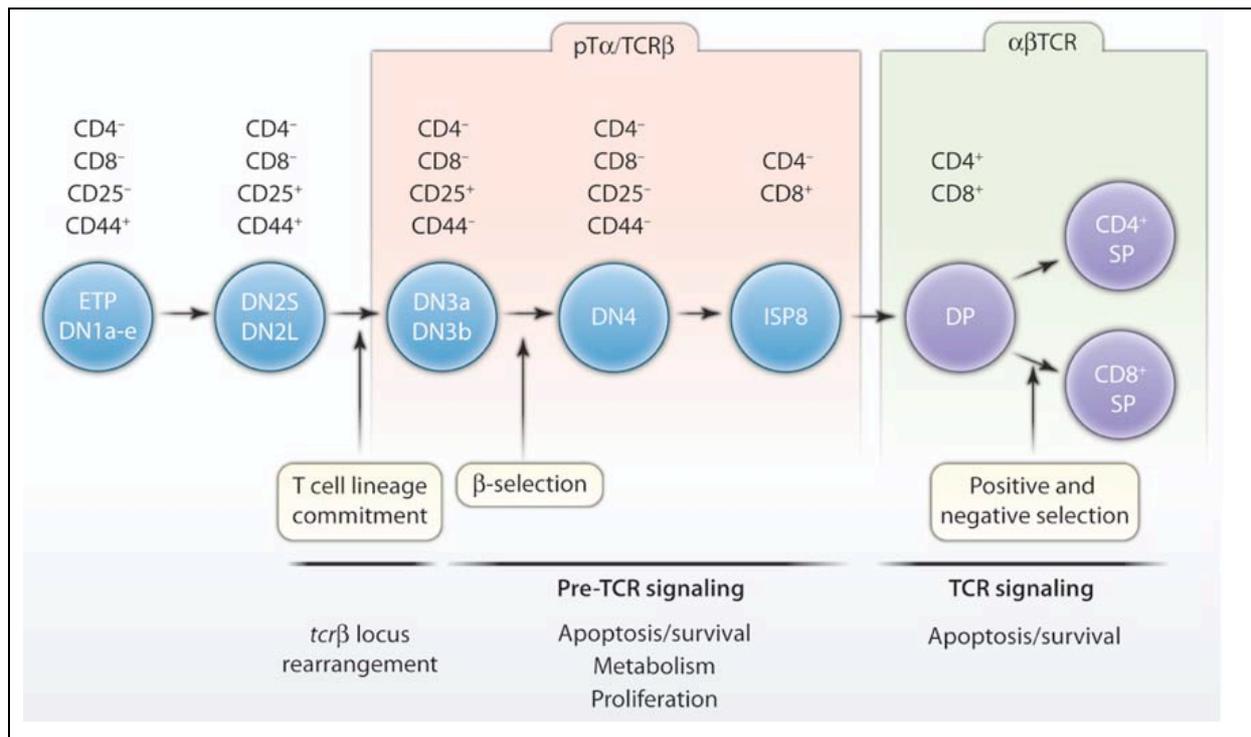
## ***I Développement thymique des lymphocytes T $\alpha\beta$ conventionnels***

La moelle osseuse et le thymus sont les deux organes lymphoïdes primaires assurant la génération des cellules composant le sang : les érythrocytes et les cellules du système immunitaire quelque soit leur origine, myéloïde ou lymphoïde. Les cellules composant la lignée myéloïde sont les monocytes, macrophages, cellules dendritiques (DC) et granulocytes. La lignée lymphoïde comprend les lymphocytes B (LB) et T (LT).

Le processus de maturation des érythrocytes, des cellules d'origine myéloïde et des LB a entièrement lieu dans la moelle osseuse. Les LT, quant à eux, commencent leur différenciation dans la moelle osseuse et l'achèvent dans le thymus, à l'exception d'une sous-population de LT intraépithéliaux qui termine leur maturation au niveau de l'intestin (Rocha 2007; Cheroutre and Lambomez 2008). Deux populations de LT se développent dans le thymus : les LT exprimant un récepteur T (TCR)  $\gamma\delta$  et les LT portant un TCR $\alpha\beta$ . Ces derniers comprennent des LT effecteurs et régulateurs.

### **1 Le choix du lignage T et expression du pré-TCR**

Les cellules migrant de la moelle osseuse vers le thymus sont en nombre restreint et appelées ETP (early thymic progenitors). Ces cellules atteignent la jonction cortico-médullaire du thymus grâce à l'expression de différentes molécules telles que les récepteurs aux chimiokines CCR (Chemokine (C-C motif) receptor) 7 et CCR9 (Uehara, Grinberg et al. 2002; Uehara, Song et al. 2002; Krueger, Willenzon et al. 2010) ainsi que la molécule d'adhésion PGL1 (P-selectine glycoprot ligand 1) (Rossi, Corbel et al. 2005) et l'intégrine  $\alpha4\beta7$  (Scimone, Aifantis et al. 2006).



Extrait de Fayard et al., *Science Signaling*, 2010 (Fayard, Moncayo et al. 2010).

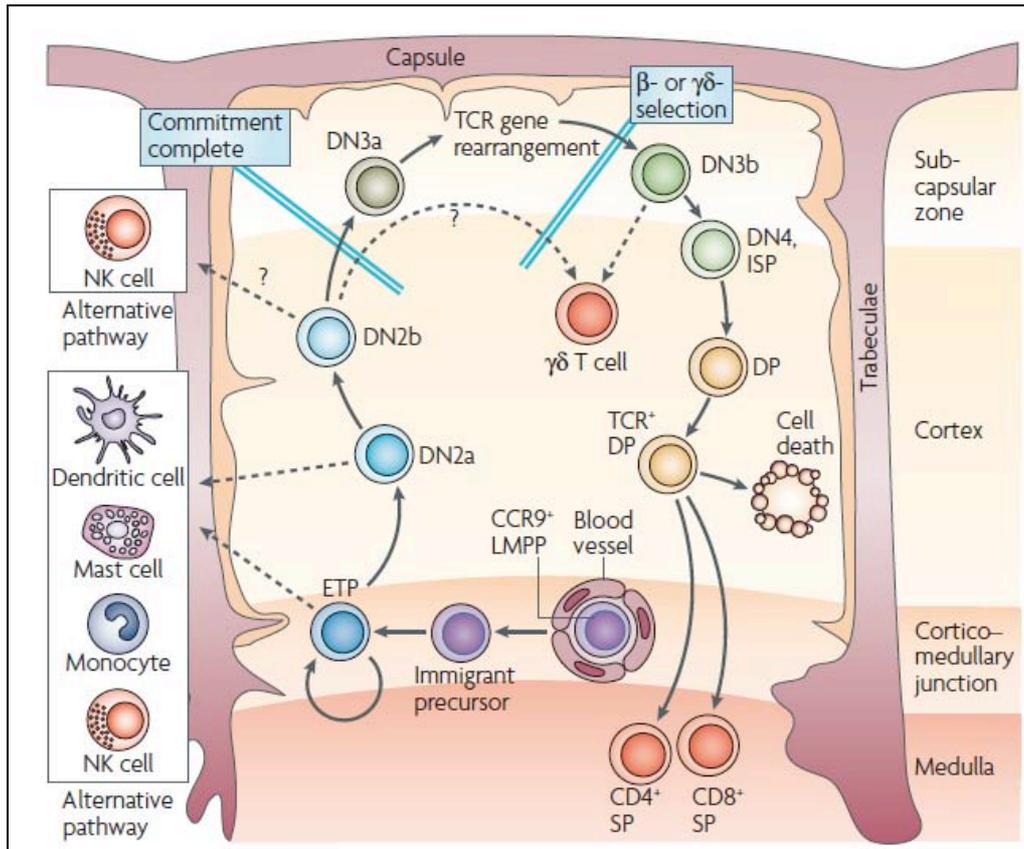
**Figure 1. Les stades de différenciation des thymocytes.**

Dans le thymus, la maturation des LT est divisée en différents stades de différenciation. Plusieurs points de contrôle rythment la différenciation des thymocytes. Au stade DN3, la sélection β permet de contrôler la fonctionnalité de la chaîne β réarrangée du TCR. Puis, seuls les thymocytes DP reconnaissant les complexes CMH-peptides du soi avec une affinité intermédiaire survivent à la sélection positive et négative et deviennent des cellules CD4 ou CD8 SP.

iSP : cellule immature SP.

Les ETP sont des cellules multipotentes, caractérisées par l'expression des molécules membranaires c-Kit, Sca et par l'absence d'expression de Lin, CD25, CD4 et CD8 (Bhandoola, von Boehmer et al. 2007; Schwarz, Sambandam et al. 2007). L'absence de ces deux derniers marqueurs permet de les nommer cellules double négatives (DN). Ces cellules représentent 2 à 5% des thymocytes. Le stade DN se divise en quatre stades de différenciation définis sur la base de l'expression des molécules CD44 et CD25 (Godfrey and Zlotnik 1993) (Figure 1). Les DN1 (CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) sont les cellules les plus immatures. Les stades suivants sont DN2 ou cellules pro-T (CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>), DN3 ou cellules pre-T précoces (CD44<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>) et enfin DN4 ou cellules pre-T tardives (CD44<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>). Ces étapes de différenciation ont lieu dans le cortex thymique.

La perte de la multipotence des DN est progressive et les engage dans le lignage T. Les DN1 se divisent peu et peuvent encore se différencier en LB, monocytes, mastocytes, natural killer (NK) et DC (Figure 2). Les progéniteurs DN2 ont perdu leur capacité à se différencier en LB mais peuvent encore s'engager dans le lignage des DC. Le passage du stade DN2 à DN3 engage définitivement les thymocytes dans le lignage T. Différents facteurs régulent l'engagement dans ce lignage : Notch1 est nécessaire mais pas suffisant (Maillard, Fang et al. 2005; Chi, Bell et al. 2009; Radtke, Fasnacht et al. 2010). D'autres facteurs de transcription, tels que les protéines Runx1 (runt-related transcription factor), GATA-3 (GATA-binding protein-3) et E-box, coopèrent avec Notch1 pour initier la différenciation T (Rothenberg, Moore et al. 2008). L'engagement dans le lignage T se caractérise notamment par l'expression des enzymes RAG (recombination activating genes) 1 et 2 permettant le réarrangement des gènes somatiques codant pour les chaînes  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$  du récepteur T à l'antigène (Mombaerts, Iacomini et al. 1992; Shinkai, Rathbun et al. 1992). Ce processus associe trois segments de gènes séparés les uns des autres dans la lignée germinale : les segments V (variable), D (diversity) et J (joining) (Brandt and Roth 2002). Ils codent pour le domaine variable du TCR $\alpha\beta$  impliqué dans la reconnaissance de l'antigène. Ce mécanisme est appelé « recombinaison VDJ ». Il est complexe, aléatoire et permet la génération d'un grand nombre de TCR $\alpha\beta$  de spécificités différentes. Au stade DN3, il permet l'expression du TCR $\gamma\delta$  et du pré-TCR. Le pré-TCR est constitué de la chaîne  $\beta$  réarrangée associée aux chaînes CD3 et pré-T $\alpha$  (Saint-Ruf, Ungewiss et al. 1994). En l'absence de chaîne  $\alpha$



Extrait de Rothenberg et al., *Nature Reviews Immunology*, 2008 (Rothenberg, Moore et al. 2008).

**Figure 2. La localisation des thymocytes dans le thymus selon leurs stades de différenciation.**

Les ETP migrent de la moelle osseuse vers le thymus via la circulation sanguine. Certaines de ces cellules multipotentes vont progressivement s'engager dans le lignage T. Dans le cortex thymique, les cellules Double Négative (DN) vont alors se différencier en thymocytes Doubles Positifs (DP). Puis, la maturation des cellules CD4 et CD8 Simple Positives (SP) a lieu dans la médulla thymique.

NK : cellule Natural killer,  
iSP : cellule immature SP.

réarrangée, la chaîne pré-T $\alpha$  permet l'expression stable de la chaîne  $\beta$ . Les thymocytes exprimant un TCR $\gamma\delta$  fonctionnel se différencient en LT $\gamma\delta$  alors que les cellules exprimant le pré-TCR s'engagent dans le lignage T $\alpha\beta$  (Rothenberg 2002).

## 2 La sélection $\beta$

La sélection  $\beta$  est le premier point de sélection des futurs LT $\alpha\beta$ . Elle consiste à vérifier la fonctionnalité de la chaîne  $\beta$  réarrangée. A cause des délétions et insertions de nucléotides concomitantes à la recombinaison VDJ, la plupart des réarrangements du *TCR $\beta$*  sont incorrects et n'aboutissent pas à la synthèse d'une protéine fonctionnelle. Durant la sélection  $\beta$ , une signalisation via le pré-TCR, le récepteur pour la chimiokine SDF1 (stromal cell-derived factor-1), CXCR4 (CXC-chemokine receptor-4) (Janas, Varano et al. 2010; Trampont, Tosello-Trampont et al. 2010), et Notch1 (Ciofani, Knowles et al. 2006; Maillard, Tu et al. 2006), sont nécessaires pour la survie et l'entrée dans le dernier cycle important de prolifération ayant lieu dans le thymus. Seuls les thymocytes sélectionnés positivement suite à l'expression d'une chaîne  $\beta$  fonctionnelle atteignent le stade DN4. Les thymocytes entrent ensuite dans une phase de repos. Ils cessent de proliférer et diminuent l'expression des enzymes RAG1/2 ce qui exclue toute possibilité d'exprimer un second pré-TCR. Ce processus est appelé « exclusion allélique » du locus *TCR $\beta$*  (Khor and Sleckman 2002). Ces thymocytes commencent à exprimer le corécepteur CD8 puis CD4 devenant ainsi des cellules double positives (DP). A ce stade, l'expression du pré-TCR diminue. Le réarrangement des segments V et J codant pour la chaîne  $\alpha$  du TCR commence, après réexpression de la machinerie protéique nécessaire à ce processus. Si ce réarrangement n'est pas fonctionnel, un second réarrangement le remplace. Ce processus est répété jusqu'à l'appariement correct des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  (Borgulya, Kishi et al. 1992). Le complexe entier du TCR $\alpha\beta$  est alors exprimé à la membrane cellulaire.

La transition des DP en LT matures nécessite des étapes supplémentaires de sélection permettant la génération d'un répertoire de LT matures utiles et non auto-réactifs. Ces points de contrôle correspondent à la sélection positive et négative que nous allons aborder dans les paragraphes suivants.

### 3 La sélection positive des lymphocytes T

La sélection positive est le processus qui permet de restreindre la spécificité des thymocytes au CMH du soi, sélectionnant ainsi les LT « utiles » à l'organisme (Zerrahn, Held et al. 1997). Elle a lieu dans le cortex thymique.

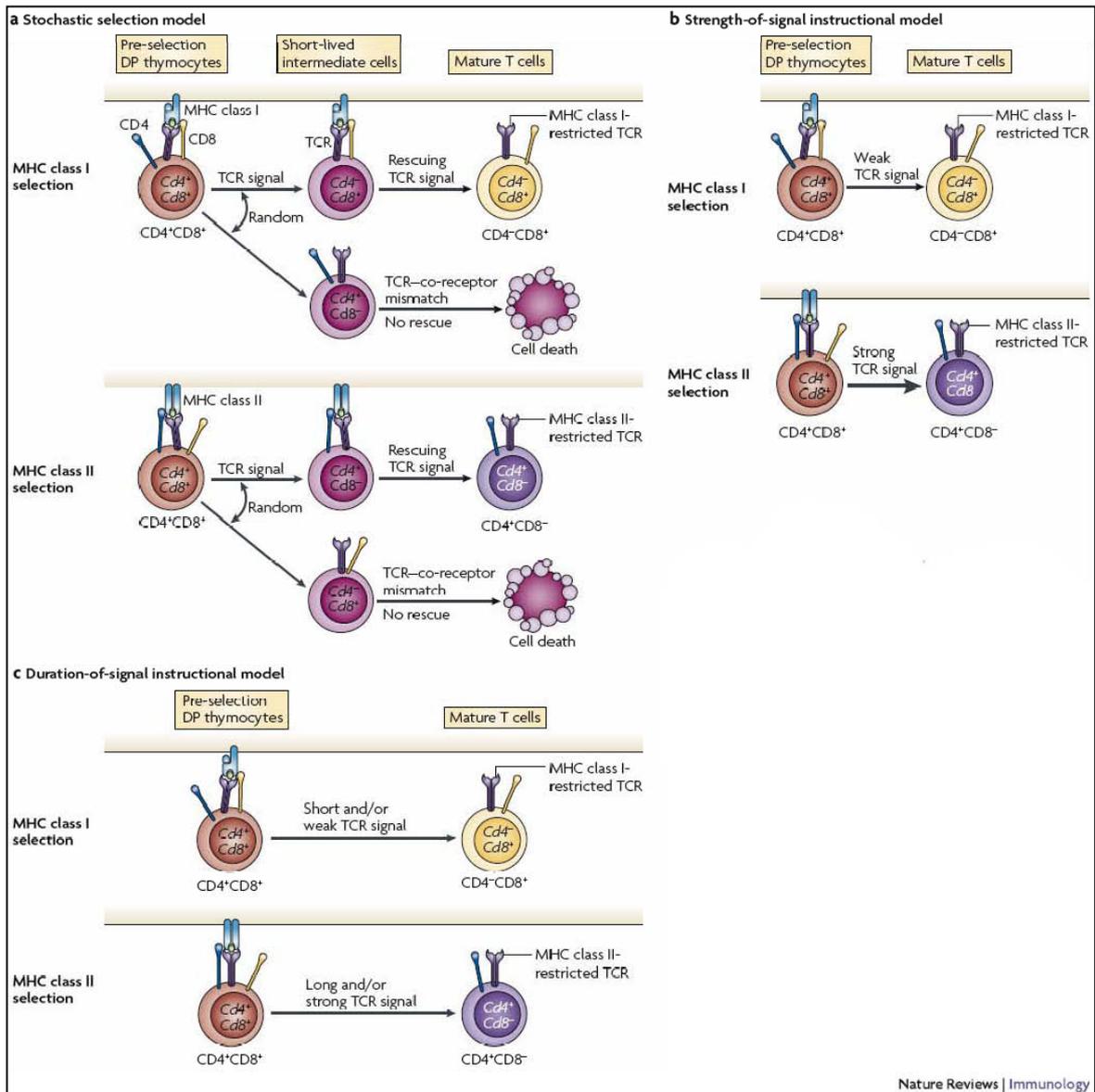
Ce processus de sélection positive a principalement été étudié dans des modèles de souris chimériques. Le compartiment hématopoïétique, compartiment radiosensible, est détruit par irradiation létale puis reconstitué suite à une greffe de moelle osseuse. Les cellules radiosensibles sont ainsi d'origine du donneur alors que les cellules radiorésistantes sont d'origine du receveur. Ces travaux ont révélé que la spécificité des LT est restreinte par le CMH exprimé par les cellules radiorésistantes du receveur (Bevan 1977; Zinkernagel, Callahan et al. 1978). Le rôle du thymus a ensuite été montré lors d'expériences de chimères thymectomisées puis greffées avec des thymus allogéniques. Les LT présents dans ces souris sont restreints par le CMH exprimé par l'épithélium thymique transplanté (Fink and Bevan 1978; Zinkernagel, Callahan et al. 1978). Compte tenu de la grande diversité des TCR générés suite à la recombinaison somatique, la sélection positive permet d'éliminer les thymocytes qui ne reconnaissent pas le complexe ligand-CMH du soi, soit 85% des thymocytes (Merkenschlager, Graf et al. 1997). Ces thymocytes ne reçoivent pas de signal par leur TCR et meurent alors par « négligence ».

Au niveau cellulaire, les thymocytes DP sélectionnés positivement reçoivent un signal de survie leur permettant de continuer leur maturation en LT. Ce signal est délivré suite à la reconnaissance de peptides présentés via les molécules du CMH à la surface des cellules épithéliales du cortex thymique (cTEC). L'expression des molécules de CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe I et II uniquement à la surface des cTEC suffit à la génération de LT (Cosgrove, Chan et al. 1992; Laufer, DeKoning et al. 1996; Capone, Romagnoli et al. 2001). Au contraire, l'expression des molécules de CMH de classe I et II restreinte aux mTEC ne permet pas la production de cellules T (Cosgrove, Chan et al. 1992). Nos connaissances actuelles sur la nature de ces ligands impliqués dans la sélection positive sont limitées. *In vivo*, une corrélation positive existe entre la diversité des peptides présentés par les cTEC et la complexité du répertoire des cellules T (Goldrath and Bevan 1999). Les cTEC possèdent leur propre machinerie moléculaire nécessaire à l'apprêtement et la présentation de l'antigène. Elle se caractérise principalement par

leur capacité macroautophagique (Nedjic, Aichinger et al. 2008) et l'expression de cathepsines, en particulier la cathepsine L (Honey, Nakagawa et al. 2002), de la TSSP (peptidase thymus-specific serine protease) (Gommeaux, Gregoire et al. 2009) et du thymoprotéasome (Murata, Sasaki et al. 2007). Ainsi, ils généreraient des peptides qui sont différents de ceux utilisés par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) thymiques et périphériques.

#### **4 Choix du lignage CD4/CD8**

La co-expression des co-récepteurs CD4 et CD8 est une caractéristique unique aux thymocytes DP. Les co-récepteurs CD4 et CD8 sont des protéines transmembranaires requises pour la signalisation par le TCR. Leurs domaines extracellulaires se lient spécifiquement à des motifs invariants des molécules du CMH de classe II et I respectivement. Leurs domaines intracellulaires sont nécessaires pour la transduction du signal. Ils permettent le recrutement et l'activation de la tyrosine kinase Lck (lymphocyte-specific protein tyrosine kinase) impliquée dans l'initiation de la transduction du signal via le TCR (Doyle and Strominger 1987; Norment, Salter et al. 1988; Shaw, Schroter et al. 1989; Turner, Brodsky et al. 1990). Les thymocytes DP, qui expriment simultanément ces deux co-récepteurs, reçoivent des signaux via leur TCR indépendamment de leur restriction aux molécules du CMH de classe I ou II. Ainsi, théoriquement, tous les TCR potentiellement « utiles » peuvent générer un signal de sélection positive qui protège les cellules DP de la mort cellulaire. Les thymocytes DP sélectionnés positivement atteignent alors le dernier stade de maturation dans le thymus : les stades simple positif (SP) CD4 (CD4+CD8-) ou CD8 (CD4-CD8+) (Figure 1) (Ellmeier, Sawada et al. 1999). Cette dernière étape de différenciation des thymocytes DP implique la baisse de l'expression d'un des deux corécepteurs et le choix définitif du lignage CD4 ou CD8. Deux principaux modèles ont été proposés pour expliquer ce choix : les modèles stochastique ou instructif. Ils se distinguent principalement par l'arrêt aléatoire ou instruite, respectivement, de la transcription d'un des deux corécepteurs. Les modèles de choix du lignage CD4/CD8 initialement conçus devaient représenter deux modèles extrêmes couvrant l'ensemble des possibilités logiques (Janeway 1988). Depuis, la révision de ces deux modèles a abouti à l'intégration de deux



Extrait de Singer et al., *Nature Reviews Immunology*, 2008 (Singer, Adoro et al. 2008).

**Figure 3. Les premiers modèles de choix du lignage T CD4/CD8.**

Les mécanismes sous-jacents au choix du lignage CD4/CD8 ont été expliqués via différents modèles. (a) Le premier fut le modèle stochastique. Il propose que les thymocytes cessent d'exprimer le corécepteur CD4 ou CD8 de façon aléatoire. (b) Le choix du lignage d'après le modèle instructif et de la « force du signal » est dépendant de la force du signal reçu par le TCR. Si ce signal est intense, le thymocyte DP se différencie en cellules CD4 SP. (c) Un autre modèle fut proposé

suite à l'ajout d'une nouvelle notion, la « durée du signal ». Un signal long et/ou intense favorise l'engagement du thymocyte dans le lignage CD4.

nouvelles notions : la « force » et la « durée » du signal reçu par le TCR (Singer, Adoro et al. 2008) (Figure 3).

#### 4.1 Le modèle stochastique

Ce premier modèle (Figure 3a) suggère que l'arrêt de la transcription du gène *CD4* ou *CD8* a lieu de façon aléatoire (Chan, Cosgrove et al. 1993; Davis, Killeen et al. 1993) et qu'une seconde étape de survie dépendante du TCR (appelée « rescue step ») est nécessaire durant la sélection positive. Par conséquent, seuls les thymocytes SP exprimant un TCR dont la spécificité est appariée à l'expression du corécepteur survivent et se différencient en LT matures. Mais, les principes essentiels de ce modèle furent contredits par des observations expérimentales (Keefe, Dave et al. 1999; Itano and Robey 2000; Sarafova, Erman et al. 2005). Par exemple, le découplage entre la restriction du TCR pour la molécule du CMH II et son engagement dans le lignage CD8 invalide ce modèle (Sarafova, Erman et al. 2005).

#### 4.2 Le modèle instructif et le concept de la « force du signal »

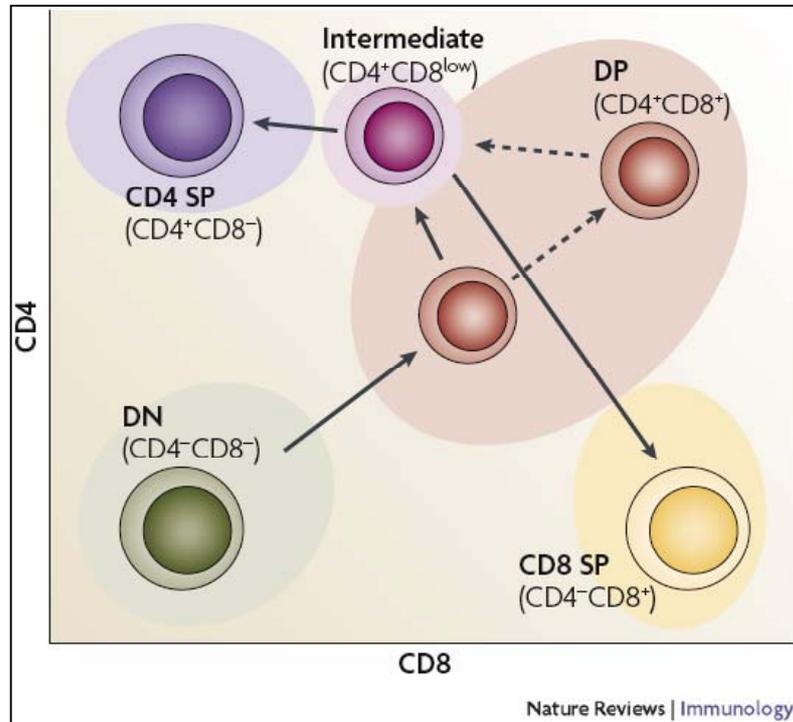
Le modèle instructif du choix du lignage CD4/CD8 postule que lors de la sélection positive, les signaux reçus via le TCR indiquent aux cellules DP de spécifiquement arrêter la transcription du corécepteur non apparié (Figure 3b). Par conséquent, ce modèle sous-entend que les signaux reçus par un TCR restreint aux molécules de CMH de classe I sont distincts de ceux transmis par un TCR restreint aux molécules de CMH de classe II. Dans le modèle original, les corécepteurs CD4 et CD8 ont été décrits comme transduisant des instructions qualitativement différentes (Seong, Chamberlain et al. 1992). Cependant, un modèle alternatif a été proposé suite à l'intégration d'une donnée supplémentaire, la « force du signal ». Les thymocytes DP seraient instruits par des différences dans la force du signal reçu après co-engagement simultané du TCR et du corécepteur lors de la sélection positive (Itano, Salmon et al. 1996). La partie cytoplasmique de la molécule CD4 liant significativement plus de tyrosine kinase Lck que la queue intracellulaire du CD8 (Shaw, Amrein et al. 1989; Wiest, Yuan et al. 1993), le co-engagement du TCR et du CD4 génère un signal plus fort que le co-engagement du TCR et du CD8. La force relative de ces signaux est à l'origine de l'arrêt spécifique de la transcription du gène

*CD4* ou *CD8* (Itano, Salmon et al. 1996). Mais des travaux ont ensuite révélé que la force du signal n'impacte pas le choix du lignage CD4/CD8 et ont ainsi discrédité le modèle instructif et de la « force du signal » (Bosselut, Feigenbaum et al. 2001; Erman, Alag et al. 2006).

#### 4.3 Le modèle de la « durée du signal »

Ce dernier modèle est une alternative au modèle instructif et de la « force du signal » (Figure 3c). Une notion importante y a été ajoutée : la durée du signal transmis par le TCR. En plus de la force du signal, sa durée serait décisive dans le choix du lignage CD4/CD8. Dans ce modèle, les signaux de longue durée reçus par le TCR indiquent aux cellules DP de stopper la transcription du gène *Cd8* et de se différencier en CD4 SP tandis que les signaux de courte durée entraînent l'arrêt de l'expression de la molécule CD4 et la maturation en CD8 SP (Yasutomo, Doyle et al. 2000). Tous les thymocytes DP ayant reçu un signal de survie lors de la sélection positive diminuent l'expression du corécepteur CD8 pour devenir des cellules CD4<sup>+</sup>CD8<sup>low</sup>, précurseurs communs des cellules CD4 et CD8 SP (Lundberg, Heath et al. 1995; Suzuki, Punt et al. 1995; Brugnera, Bhandoola et al. 2000) (Figure 4). Par conséquent, le signal reçu par les TCR restreints aux molécules de CMH de classe I dans les thymocytes CD4<sup>+</sup>CD8<sup>low</sup> est d'une plus courte durée que lorsque le signal est transmis par des TCR restreints aux molécules de CMH de classe II (Singer 2002). Cette diminution d'expression sélective pour le corécepteur CD8 s'explique par une baisse de la transcription du gène *Cd8* et non par l'internalisation des corécepteurs CD8 présents à la surface cellulaire (Barthlott, Kohler et al. 1997; Bosselut, Guinter et al. 2003).

Ainsi, le concept de la durée du signal, en tant que déterminant majeur dans l'engagement dans le lignage CD4 ou CD8, est une caractéristique principale du modèle dernièrement établi : la cinétique de signalisation.



Extrait de Singer et al., *Nature Reviews Immunology*, 2008 (Singer, Adoro et al. 2008).

**Figure 4. Expression des corécepteurs CD4 et CD8 à la surface des thymocytes.**

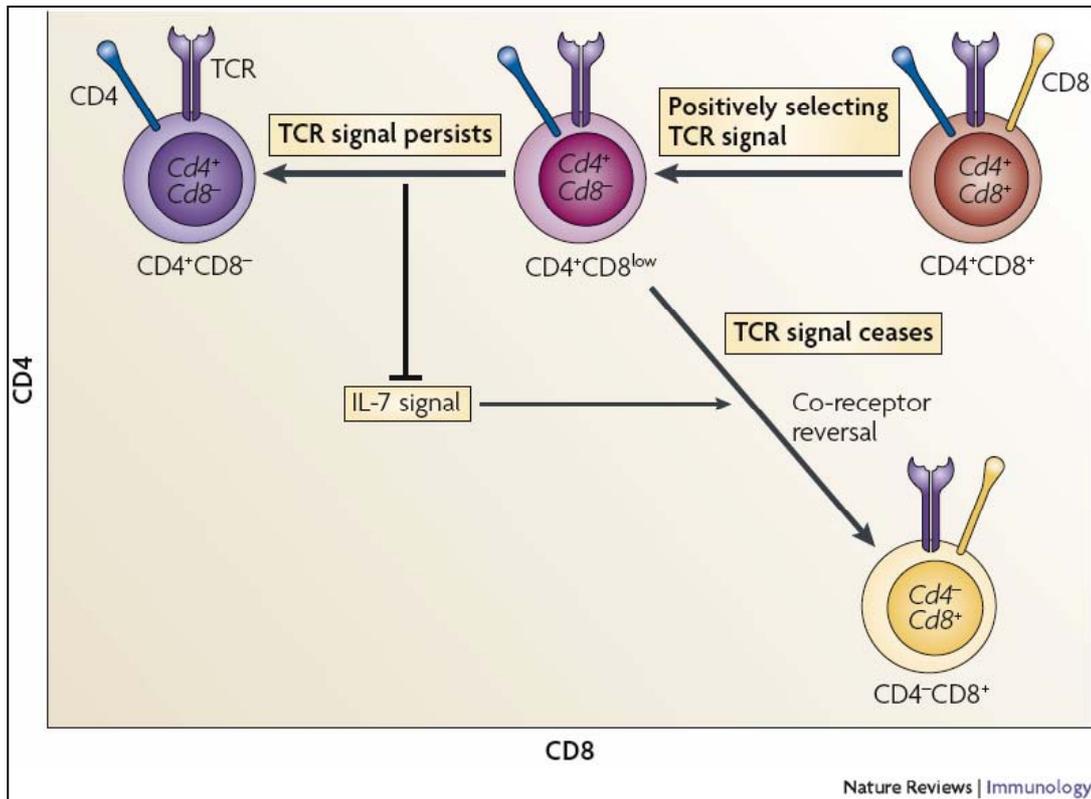
Les thymocytes DN dépourvus des co-récepteurs CD4 et CD8 se différencient en cellules DP exprimant CD4 et CD8. Ces thymocytes DP diminuent ensuite l'expression de la molécule CD8 et sont qualifiés de cellules  $CD4^+CD8^{low}$ . Le processus de choix du lignage déterminera si la cellule  $CD4^+CD8^{low}$  deviendra CD4 ou CD8 SP. Dans le premier cas, elle cessera complètement d'exprimer le corécepteur CD8 tandis qu'une différenciation en thymocyte CD8 SP nécessite la réexpression du récepteur CD8 et l'arrêt de l'expression de la molécule CD4.

#### 4.4 Modèle de la cinétique de signalisation : un modèle consensus non classique

Ce dernier modèle réconcilie l'ensemble des différents principes des modèles classiques (Figure 5). Il propose que l'engagement dans le lignage CD4 ou CD8 est déterminé par la durée du signal transduit par le TCR et par le signal transmis par des cytokines, en particulier l'IL-7 (Brugnera, Bhandoola et al. 2000; Singer 2002; Singer and Bosselut 2004).

Le modèle de la cinétique de signalisation propose que, en premier lieu, les thymocytes DP sélectionnés positivement cessent d'exprimer le corécepteur CD8 (Brugnera, Bhandoola et al. 2000; Singer 2002; Singer and Bosselut 2004). Les signaux transmis par les TCR restreints aux molécules de CMH de classe II sont indépendants de la molécule CD8. Ils pourront donc persister en l'absence de la transcription du gène CD8 et aboutir à un engagement dans le lignage CD4. Au contraire, la signalisation des TCR restreints aux molécules de CMH de classe I cessera en l'absence de la transcription du gène *CD8*. La ré-expression du corécepteur CD8 sera initiée, permettant la génération de cellules CD8 SP. Ainsi, suite à la baisse d'expression du récepteur CD8, la durée de la signalisation transmise par le TCR permet précisément d'identifier le lignage approprié aux thymocytes.

Dans ce modèle, la sélection positive et le choix du lignage sont des événements séquentiels et non concomitants. Ainsi, le choix du lignage s'effectue à ce stade de différenciation intermédiaire et est déterminé par la persistance ou l'arrêt du signal via le TCR. Ce modèle propose aussi que la persistance ou l'arrêt du signal via le TCR ait une corrélation inverse avec la signalisation induite par les cytokines dont le récepteur présente une chaîne commune  $\gamma$ . Cette famille de cytokines est appelée la famille de la chaîne  $\gamma$  commune aux récepteurs de cytokines. Elle regroupe l'IL-2, l'IL-4 l'IL-7, l'IL-9, l'IL-15 et l'IL-21. Ces cytokines, en particulier l'IL-7, jouent un rôle de senseur pour le signal induit par le TCR (Brugnera, Bhandoola et al. 2000; Singer 2002; Singer and Bosselut 2004).



Extrait de Singer et al., *Nature Reviews Immunology*, 2008 (Singer, Adoro et al. 2008).

**Figure 5. Modèle de la cinétique de signalisation : un modèle consensus de choix du lignage CD4/CD8.**

Le modèle de la cinétique de signalisation prend en compte la durée du signal reçu par le TCR ainsi que la nécessité de signaux transmis par des récepteurs aux cytokines. Un signal persistant par le TCR bloque la signalisation par l'IL-7R et entraîne la maturation de la cellule DP en thymocyte CD4 SP. Au contraire, l'arrêt de la signalisation par le TCR dans les cellules CD4<sup>+</sup>CD8<sup>low</sup> associé à une signalisation par l'IL-7R permet l'engagement de ces thymocytes dans le lignage CD8. Ce modèle consensus est le dernier proposé.

#### 4.5 Mécanismes moléculaires du choix du lignage CD4/CD8

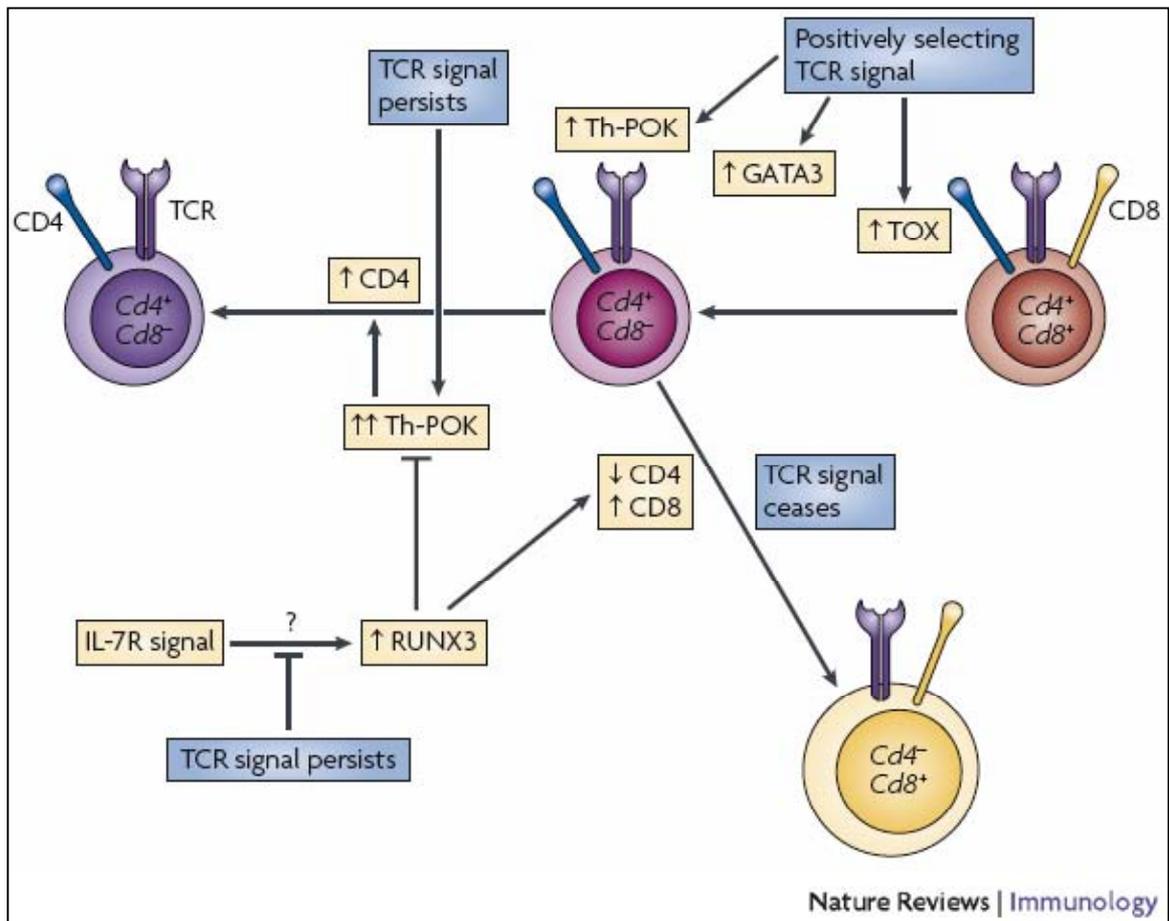
La compréhension du choix du lignage CD4/CD8 a été améliorée suite à l'identification des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la transcription des gènes Cd4 et Cd8. Les facteurs les plus importants sont Th-POK (T-helper-inducing POZ/Kruppel-like factor, aussi nommé cKROX ou ZFP67), Runx3, TOX (thymus HMG (high-mobility group) box protein), GATA3 (Figure 6).

##### Th-POK

Le facteur de transcription Th-POK est une protéine à doigts de zinc codée par le gène *Zbtb7b* (*zinc-finger-and-BTB-domain-containing7B*) (He, Dave et al. 2005).

La découverte de ce facteur de transcription fut fortuite : une mutation spontanée dans le gène *Zbtb7b* a eu lieu chez les souris HD (helper deficient) (He, Dave et al. 2005). Ces animaux présentent un défaut de différenciation thymique des thymocytes restreints aux molécules de CMH de classe II qui les redirige vers le lignage CD8 (Keefe, Dave et al. 1999). En périphérie, la conséquence est une lymphopénie T CD4. La mutation ponctuelle chez ces souris est située dans le second domaine à doigt de zinc de la protéine. Le facteur de transcription exprimé est ainsi incapable de se lier à l'ADN (He, Dave et al. 2005). Par conséquent, la différenciation en LT CD4 requière une molécule Th-POK fonctionnelle. Des expériences de surexpression de Th-POK durant le développement thymique ont révélé que la majorité des thymocytes se différenciait en cellules CD4 SP, indépendamment de la restriction au CMH de leur TCR (He, Dave et al. 2005; Sun, Liu et al. 2005). Ainsi, Th-POK est nécessaire et suffisant pour l'engagement dans le lignage CD4, il représente une molécule régulatrice majeure dans le choix du lignage CD4 et la maturation en LT CD4 (Kappes and He 2006). En accord avec ces résultats, la transduction rétrovirale de Th-POK dans les LT CD8 matures conduit à une diminution de leurs capacités cytotoxiques et au développement par ces LT CD8 de certaines caractéristiques des LT CD4 auxiliaires (Jenkinson, Intlekofer et al. 2007). Ce travail suggère que l'expression de Th-POK est continuellement réprimée dans les LT CD8 matures et révèle un certain degré de plasticité de cette population T.

Th-POK est tout d'abord exprimé par les thymocytes CD4<sup>+</sup>CD8<sup>low</sup> (He, Park et al. 2008) et son expression augmente suite à une signalisation persistante via le TCR (He, Park et al. 2008). Cette observation est en accord avec le concept du



Extrait de Singer et al., *Nature Reviews Immunology*, 2008 (Singer, Adoro et al. 2008).

**Figure 6. Mécanismes moléculaires du choix du lignage T CD4/CD8.**

L'expression de différents facteurs de transcription est requise lors de la différenciation des thymocytes en cellules CD4 ou CD8 SP. L'expression des facteurs nucléaires Th-POK et TOX engage les thymocytes CD4<sup>+</sup>CD8<sup>low</sup> dans le lignage CD4 SP. L'expression de Runx3 est décisive pour l'engagement dans le lignage CD8 SP.

modèle de la cinétique de signalisation. Au niveau moléculaire, Th-POK maintient la transcription du gène *CD4* tout en empêchant celle de gènes impliqués dans la différenciation CD8, tels que Runx3 (Taniuchi, Osato et al. 2002). En périphérie, il est exprimé par les LT CD4 et non par les LT CD8 (He, Dave et al. 2005; Sun, Liu et al. 2005).

### Les protéines Runx

Les protéines Runx sont des membres de la famille des facteurs de transcription à domaine « runt ». Ces protéines présentent des similarités structurales et des sites conservés de liaison à l'ADN (Levanon and Groner 2004). Dans le thymus, Runx1 est principalement exprimé par les thymocytes DN et Runx3 par les cellules SP CD8 sélectionnées positivement (Taniuchi, Osato et al. 2002).

L'expression de Runx3 par les thymocytes sélectionnés positivement est faible (Liu, Taylor et al. 2005; Sato, Ohno et al. 2005). Elle augmente lors de la différenciation des cellules  $CD4^+CD8^{low}$  en thymocytes CD8 SP, permettant la réexpression du corécepteur CD8 (Sato, Ohno et al. 2005). Les protéines Runx1 et 3 se lient au répresseur transcriptionnel du gène *Cd4* et inhibent l'expression du gène *Cd4*. Ceci indique un rôle pour les protéines Runx dans le choix du lignage CD4/CD8 (Taniuchi, Osato et al. 2002). Enfin, ces protéines sont capables de se lier à une séquence du gène *Zbtb7b* et ainsi d'éteindre l'expression de Th-POK (Setoguchi, Tachibana et al. 2008), ce qui représente un autre moyen pour promouvoir la différenciation des thymocytes en CD8 SP. Selon le modèle de la cinétique de signalisation, la signalisation via l'IL-7 et certainement d'autres cytokines favorise directement la surexpression de Runx3 par les thymocytes au stade intermédiaire  $CD4^+CD8^{low}$  (Park, Adoro et al. 2010).

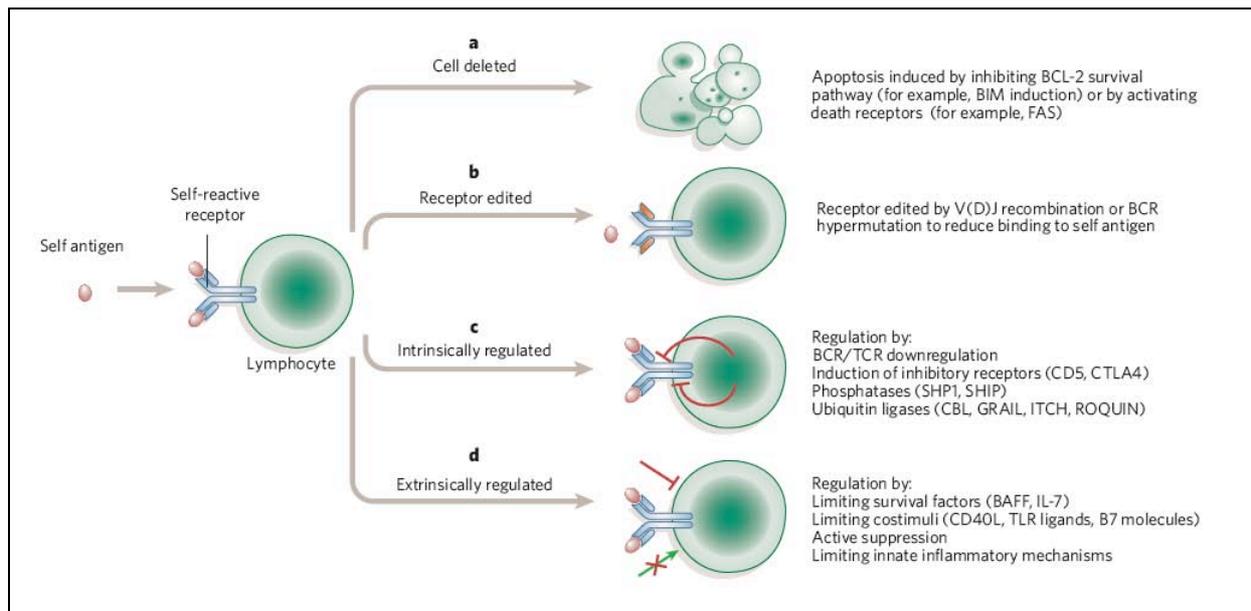
### TOX

Le facteur de transcription TOX appartient à la famille des protéines à boîte HMG. Ces protéines possèdent un site de liaison à l'ADN (Schilham and Clevers 1998; Stros, Launholt et al. 2007). Il régule l'expression de gènes en modulant localement la structure de la chromatine et le recrutement d'autres facteurs nucléaires. L'augmentation de l'expression de TOX dans les cellules DP sélectionnées positivement jouerait un rôle dans la sélection positive et/ou le choix du lignage CD4/CD8 (Wilkinson, Chen et al. 2002). L'analyse de souris déficientes

pour ce facteur nucléaire révèle que la maturation des thymocytes sélectionnés positivement en cellules CD4<sup>+</sup>CD8<sup>low</sup> est interrompue. Ces cellules acquièrent un phénotype CD4<sup>low</sup>CD8<sup>low</sup>. Le résultat est une absence de différenciation en LT CD4, mais pas en LT CD8 (Aliahmad and Kaye 2008). La protéine TOX est requis pour le maintien et la surexpression du corécepteur CD4 dans les thymocytes DP sélectionnés positivement (Aliahmad and Kaye 2008; Hedrick 2008). Ainsi, elle serait primordiale pour un signal persistant via le TCR dans les thymocytes CD4<sup>+</sup>CD8<sup>low</sup> et par conséquent pour la différenciation en LT CD4.

### GATA3

Le gène *GATA3* code pour un facteur de transcription de la famille GATA, protéines nucléaires à doigts de zinc. Il régule positivement la transcription de gènes à différents stades du développement thymique (Hendriks, Nawijn et al. 1999; Hernandez-Hoyos, Anderson et al. 2003). En effet, *GATA3* est exprimé par les ETP et est requis pour la différenciation des thymocytes vers les stades DN (Hendriks, Nawijn et al. 1999). Il joue aussi un rôle important dans le développement des cellules CD4 SP. En effet, *GATA3* est préférentiellement exprimé par les thymocytes CD4 SP (Hendriks, Nawijn et al. 1999). Son expression augmente dans les cellules sélectionnées positivement (Hernandez-Hoyos, Anderson et al. 2003). Une expression soutenue de *GATA3* inhibe la différenciation en LT CD8 (Nawijn, Ferreira et al. 2001). De plus, son inactivation conditionnelle au stade DP diminue drastiquement le nombre de cellules CD4 SP mais pas celui des CD8 SP (Pai, Truitt et al. 2003). Cette étude révèle que *GATA3* joue un rôle dans la survie et/ou la différenciation des thymocytes s'engageant vers le lignage CD4. Contrairement à Th-POK, *GATA3* n'influencerait pas l'engagement dans le lignage CD4 (Hernandez-Hoyos, Anderson et al. 2003). Cependant, l'expression précoce de *GATA3* par rapport à Th-POK ou *RUNX3* dans les thymocytes nouvellement sélectionnés suggère qu'il fonctionne en amont de ces facteurs de transcription. Par conséquent, l'étude de son rôle dans le choix du lignage CD4/CD8 est plus difficile à analyser.



Extrait de Goodnow et al., Nature, 2005 (Goodnow, Sprent et al. 2005).

**Figure 7. Les différents mécanismes de tolérance centrale.**

Des LT auto-réactifs sont générés dans le thymus. La tolérance centrale permet de rendre silencieux les thymocytes potentiellement dangereux. Ces processus sont la délétion clonale (a), l'édition du récepteur (b) et la régulation par des facteurs intrinsèques et extrinsèques (c, d). L'anergie constitue un dernier processus (non illustré sur ce schéma).

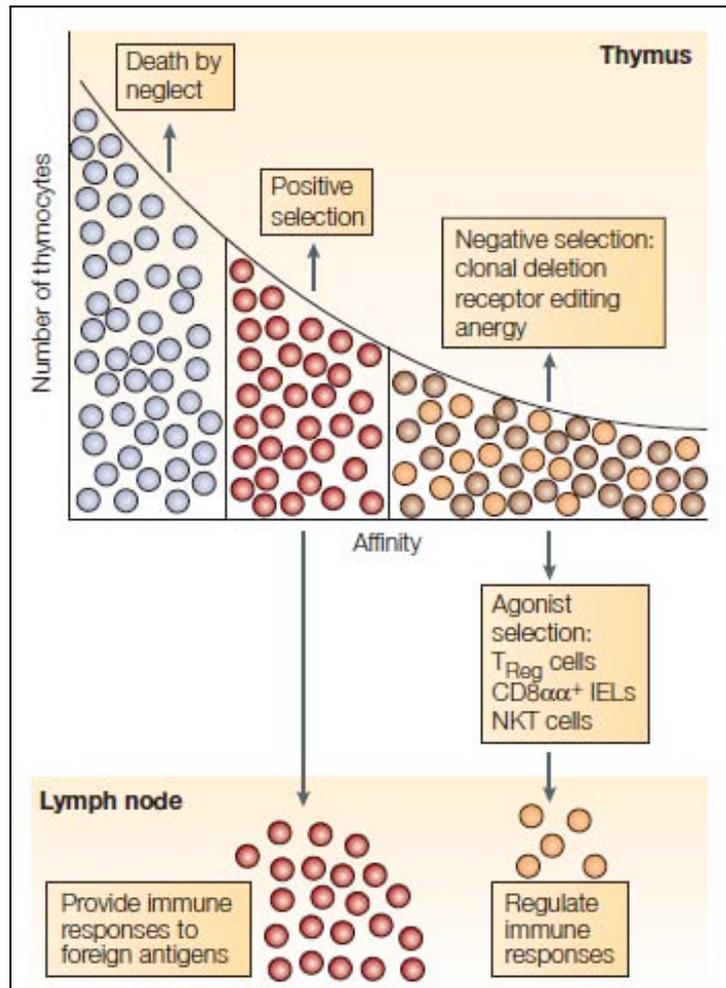
## **II La tolérance centrale**

Chaque lymphocyte ne produit qu'un seul réarrangement V(D)J codant pour un TCR parmi des millions possibles. Si le TCR exprimé réagit avec une forte affinité pour le complexe CMH-peptide du soi, cette cellule est autoréactive et donc potentiellement dangereuse. Elle doit être neutralisée. Pour cela, différentes stratégies existent (Figure 7). L'anergie, la ré-édition du TCR et l'intervention de facteurs intrinsèques et extrinsèques rendent silencieux les thymocytes potentiellement néfastes. Ces stratégies sont donc fortement risquées, leur activation contre des antigènes du soi ne pouvant être totalement exclue. Par contre, la délétion clonale conduit à la mort les thymocytes potentiellement dangereux. Je vais donc me focaliser sur ce dernier mécanisme de tolérance centrale qui semble le plus efficace.

### **1 Mécanisme de la délétion clonale**

Suite à la sélection positive qui enrichit la population T en cellules exprimant avec succès un TCR reconnaissant les complexes CMH-peptide du soi présentés par les cTEC, les thymocytes migrent dans la médulla thymique où ils y séjournent 4 à 5 jours avant d'atteindre la périphérie (McCaughy, Wilken et al. 2007). C'est à ce niveau qu'a lieu la délétion clonale. Elle permet, via l'induction d'apoptose, l'élimination des thymocytes auto-réactifs, c'est-à-dire reconnaissant avec une forte affinité des peptides du soi (Figure 8). En effet, 20 à 50% des TCR générés suite à la recombinaison somatique des gènes V(D)J se lient aux antigènes du soi présentés par les molécules du CMH avec une affinité potentiellement dangereuse (Laufer, DeKoning et al. 1996; Zerrahn, Held et al. 1997).

Les souris exprimant un TCR transgénique représentent un modèle de choix pour analyser les mécanismes de la délétion clonale. Les expériences les plus pertinentes utilisent des souris exprimant un TCR $\alpha\beta$  transgénique spécifique de l'antigène HY à partir stade DP (expression physiologique). Bien que les thymocytes DP exprimant le TCR spécifique de HY rencontrent cet antigène, la délétion clonale est effective au stade SP (Baldwin, Sandau et al. 2005). Ainsi, selon ce modèle, la délétion clonale aurait lieu à un stade tardif du développement thymique, au stade SP.



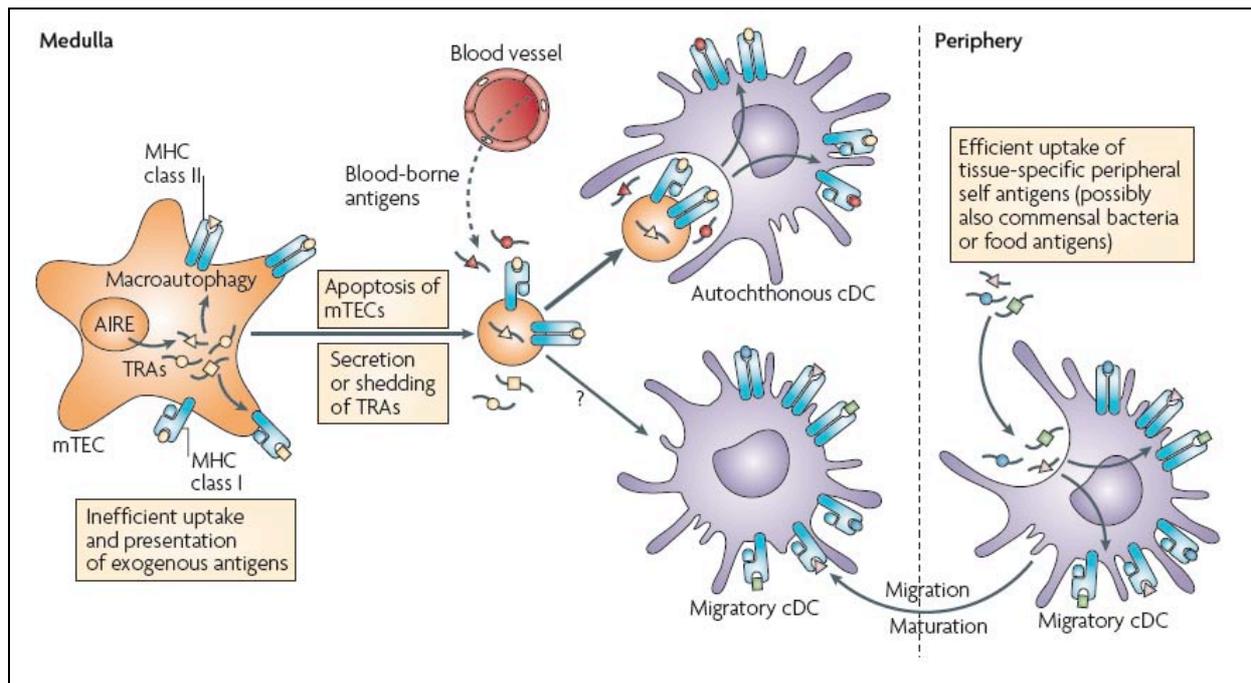
Extrait de Hogquist et al., *Nature Reviews Immunology*, 2005 (Hogquist, Baldwin et al. 2005).

**Figure 8. Sélection des thymocytes selon leur affinité pour les complexes CMH-peptide du soi.**

L'affinité du TCR pour le complexe CMH-ligand du soi exprimé à la surface des TEC et des CPA thymiques détermine le devenir du thymocyte. Si la reconnaissance de ce complexe est trop faible ou trop forte, les cellules meurent par négligence ou sélection négative respectivement. Une affinité intermédiaire permet la sélection positive du thymocyte et ainsi sa survie.

## **2 Les acteurs cellulaires et moléculaires de la délétion clonale**

La médulla thymique joue un rôle crucial dans la sélection négative. Les souris déficientes pour les facteurs de transcription Rel-B (v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B) (Burkly, Hession et al. 1995; Weih, Carrasco et al. 1995), TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6) (Akiyama, Maeda et al. 2005) ou pour le récepteur à la lymphotoxine  $\beta$  (LT- $\beta$ R) (Boehm, Scheu et al. 2003; Chin, Lo et al. 2003) présentent une jonction cortico-médullaire désorganisée associée à une médulla de taille réduite témoignant d'un nombre réduit de mTEC. Chez ces souris, la sélection positive semble normale mais la sélection négative est fortement perturbée ce qui prouve le rôle crucial de la zone médullaire dans ce processus. Les cellules responsable de la sélection négative sont les mTEC, cellules épithéliales radiorésistantes, et les DC, cellules d'origine hématopoïétiques et radiosensibles. La différence de radiosensibilité de ces deux types cellulaires a permis de décortiquer leur rôle respectif dans l'induction de tolérance au soi dans des expériences de chimères hématopoïétiques. Dans le thymus, la médulla est également le site principal d'expression de molécules de costimulation, nécessaire pour cette étape de sélection thymique.



Extrait de Klein et al., *Nature Reviews Immunology*, 2009 (Klein, Hinterberger et al. 2009).

**Figure 9. Répertoire antigénique des mTEC et DC thymiques.**

Les mTEC et les DC sont impliquées dans le processus de sélection négative des thymocytes auto-réactifs. Leur efficacité dépend des antigènes qu'elles apprêtent et présentent à leur surface. Sous le contrôle du facteur de transcription AIRE, les mTEC expriment de façon ectopique des antigènes normalement restreints aux tissus (TRA). Les DC présentent des ligands du soi de différentes origines. En effet, elles sont capables de capturer les TRA présentés par les mTEC. Des DC périphériques peuvent migrer par le sang depuis les tissus périphériques. Ainsi, les DC présenteraient des TRA mais également d'antigènes dérivés de la flore commensale et de l'alimentation.

### Rôle des cellules épithéliales médullaires

Les mTECs sont des cellules distinctes des cTEC de part leur morphologie et leur expression génique. Elles sont capables d'induire l'anergie et la délétion des thymocytes potentiellement dangereux. Une avancée majeure dans la description des fonctions spécifiques des mTEC est la découverte du facteur de transcription AIRE (AutoImmune REgulator). Ce facteur de transcription permet aux mTEC l'expression ectopique d'antigènes dont l'expression est normalement restreinte aux tissus (TRA) (Figure 9) (Anderson, Venanzi et al. 2002). Chez l'Homme, une déficience en AIRE se traduit par le développement d'un syndrome auto-immun polyendocrinien appelé APECED pour « autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy » (Nagamine, Peterson et al. 1997). Il se caractérise par une candidose cutanéomuqueuse, une hypoparathyroïdie et une insuffisance rénale d'origine auto-immune (Ahonen 1985; Ahonen, Miettinen et al. 1987). Les souris déficientes pour AIRE présentent des manifestations auto-immunes similaires au syndrome APECED humain. Elles se caractérisent par une infiltration lymphocytaire multi-organes et la présence d'auto-anticorps circulants (Ramsey, Winqvist et al. 2002). L'expression d'AIRE est indispensable pour la génération d'un répertoire T non auto-réactif (Liston, Lesage et al. 2003; Anderson, Venanzi et al. 2005). Cependant, AIRE ne semble pas réguler l'expression de tous les TRA. Par exemple, les mTECs de souris déficientes pour AIRE expriment la protéine réactive C (CRP), spécifiquement exprimée dans le foie (Anderson, Venanzi et al. 2002).

### Rôle des cellules dendritiques

Les DC sont impliquées dans l'élimination des thymocytes spécifiques d'antigènes du soi (Figure 9). L'expression des molécules de CMH de classe II restreinte aux DC est suffisante pour éliminer les thymocytes CD4 SP auto-réactifs (Brocker, Riedinger et al. 1997). D'élégantes expériences des Dr Gallegos et Dr Bevan ont montré que les DC thymiques sont capables de présentation croisée d'antigènes du soi, c'est-à-dire d'apprêter des antigènes exogènes et de les présenter via les molécules du CMH de classe I (Gallegos and Bevan 2004). Ceci leur permet d'induire une délétion clonale plus large, à la fois des thymocytes CD4 SP et CD8 SP. Les DC sont également capables de capturer des antigènes

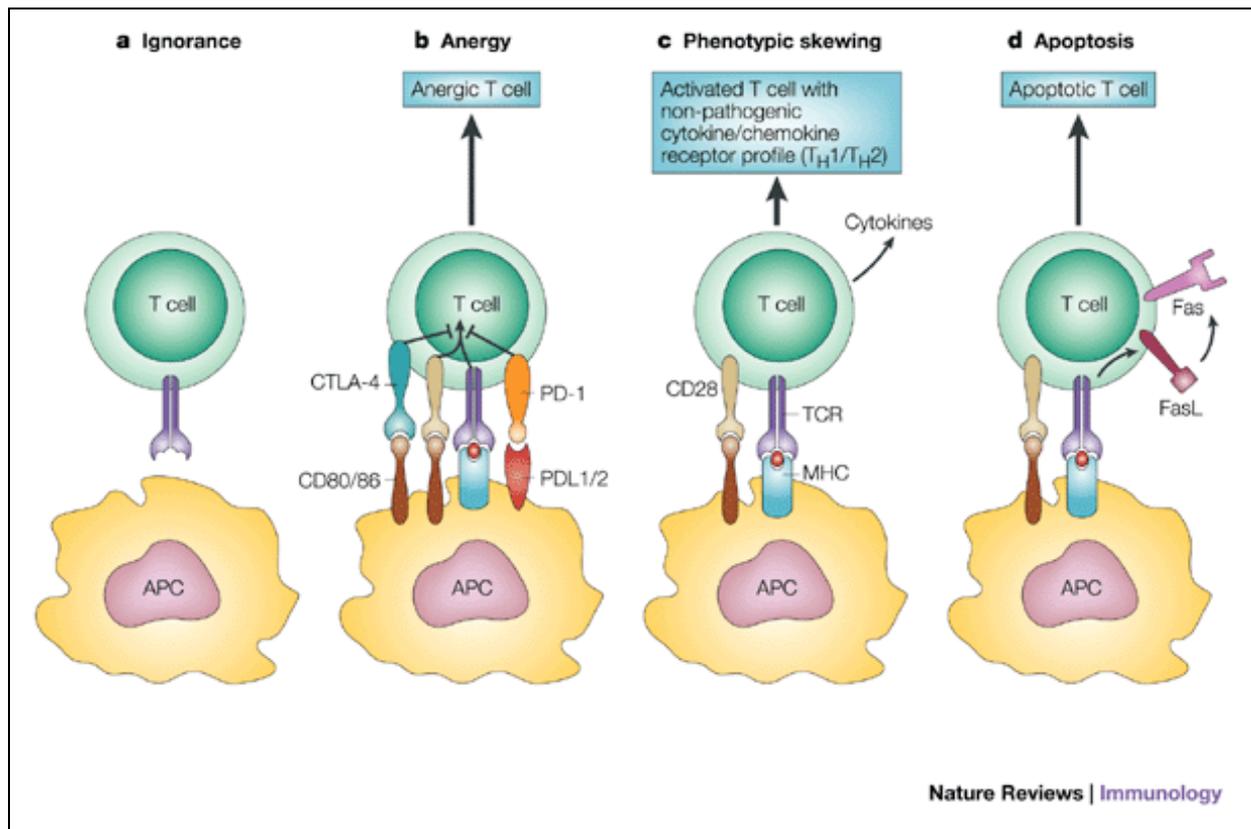
présentés par les mTEC et de les présenter (Koble and Kyewski 2009). Cependant, le rôle des mTECs ne se réduit à un réservoir d'antigènes pour les DC (Hinterberger, Aichinger et al. 2010). Les DC thymiques sont générées dans le thymus à partir d'un précurseur commun aux LT (Ardavin, Wu et al. 1993). L'équipe du Dr von Adrian a démontré l'immigration physiologique de DC périphériques au sein du thymus. Ces DC sont capables de sélectionner négativement des thymocytes CD4 SP spécifiques d'un antigène présent en périphérie (Bonasio, Scimone et al. 2006). Ce mécanisme permettrait une présentation des TRA non exprimés par les mTEC ainsi que des antigènes exogènes dérivés de la flore commensale intestinal et de l'alimentation.

#### *Les molécules de costimulation*

L'expression de molécules de costimulation telles que CD40, CD80 et CD86 contribue à la mise en place de la tolérance centrale par les mTEC et les DC. L'absence d'expression ou le blocage de CD80 ou CD86 révèle leur rôle dans l'élimination des clones auto-réactifs (Gao, Zhang et al. 2002; Buhlmann, Elkin et al. 2003). De façon similaire, le blocage de la molécule CD40 empêche la délétion des thymocytes induite par les superantigènes (Foy, Page et al. 1995). Ces études sont non exhaustives, ce processus de mort cellulaire implique certainement d'autres molécules de costimulation.

### ***III La tolérance périphérique***

Bien que les mécanismes de tolérance centrale soient efficaces, ils sont cependant insuffisants pour éliminer la totalité des thymocytes auto-réactifs et pour prévenir totalement l'apparition de pathologies auto-immunes. Pour remédier à cela, des processus de tolérance périphérique sont mis en place. Les différents mécanismes de tolérance périphériques peuvent être passifs (Figure 10) tels que l'ignorance, l'anergie, la déviation immune et la délétion ; ou actifs. Dans ce dernier cas, ils nécessitent l'intervention de populations T régulatrices.



Extrait de Walker et al., *Nature Reviews Immunology*, 2002 (Walker and Abbas 2002).

**Figure 10. Les différents mécanismes de tolérance périphérique passive.**

Certains LT auto-réactifs générés dans le thymus atteignent la périphérie. Là, des mécanismes supplémentaires de tolérance sont mis en place pour les rendre inoffensifs. (a) L'ignorance est la séquestration de l'antigène du soi. Les LT sont ainsi prévenus de toute activation. (b) L'anergie d'un LT est induite par la reconnaissance d'un complexe CMH-antigène du soi dont il est spécifique, à la surface d'une CPA immature ne délivrant pas de signaux de costimulation. (c) Le principe de la déviation phénotypique est le suivant. Pour contrôler une réponse immune délétère, certains LT se différencient dans le lignage Th opposé. (d) Enfin, la délétion clonale est l'élimination physique du LT auto-réactif par induction d'apoptose.

## 1 La tolérance passive

### 1.1 L'ignorance

La séparation physique entre les LT et les cellules parenchymateuses exprimant les TRA constitue une barrière à la reconnaissance de complexes CMH-peptide du soi (Figure 10a). Les LT naïfs expriment le récepteur aux chimiokines CCR7 et l'intégrine CD62L, ce qui leur permet de circuler entre les organes lymphoïdes secondaires via le sang et la lymphe (Banchereau and Steinman 1998; Mempel, Henrickson et al. 2004; Celli, Lemaitre et al. 2007). Par conséquent, leur exclusion des tissus diminue fortement la probabilité qu'ils rencontrent des cellules exprimant des TRA. Des cellules T CD8 naïves, matures et exprimant un TCR transgénique de forte affinité pour un ligand sont incapables d'induire des manifestations auto-immunes dans des souris exprimant ce même peptide uniquement dans le pancréas (Ohashi, Oehen et al. 1991). Cette expérience montre que les LT ignorent la présence des complexes CMH-ligand du soi présents à la surface des cellules pancréatiques. Ce phénomène d'ignorance peut également être expliqué par une expression de l'antigène en dessous du seuil requis pour l'activation des LT (Kurts, Miller et al. 1998).

### 1.2 L'anergie conale

Le processus d'anergie clonale est défini comme une induction de tolérance par des CPA immatures présentant des antigènes du soi mais en absence de molécules de costimulation (Figure 10b). La rencontre du LT auto-réactif avec une telle CPA rend le LT non fonctionnel.

Les molécules CD28 et CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4) exprimées par les LT et CD80/86 présentes à la surface des CPA jouent un rôle primordial dans l'induction d'anergie clonale. En effet, la neutralisation des molécules CD80/86 par une protéine de fusion immunoglobuline/CTLA-4 interrompt la progression de la maladie lupique chez les souris NZBWF1 (Finck, Linsley et al. 1994). Dans un autre modèle, le blocage de CTLA-4 altère l'induction d'anergie clonale (Perez, Van Parijs et al. 1997). La molécule PD-1 (programmed cell death-1) est une autre protéine responsable de la régulation négative de l'activation des LT. L'expression élevée de PD-1 par les LT anergiques implique cette molécule dans l'induction et le maintien de la tolérance périphérique (Khoury and Sayegh 2004;

Okazaki and Honjo 2006). Les souris déficientes pour PD-1 ou ses ligands (PD-L1 et PD-L2) développent une pathologie auto-immune systémique (Nishimura, Nose et al. 1999; Freeman, Long et al. 2000; Keir, Liang et al. 2006). Cependant, l'expression de ces molécules de costimulation, telles que CTLA-4 et PD-1, est requise pour la fonction des Treg. Ainsi, l'absence d'expression des molécules affecterait l'induction d'anergie et les fonctions suppressives des Treg. Ainsi, l'importance de ce mécanisme de tolérance passive in vivo est difficile à déterminer expérimentalement.

Cependant, une étude récente a montré que certaines cellules stromales CD45<sup>+</sup> des ganglions lymphatiques peuvent exprimer AIRE et effectuer une présentation croisée non immunogénique des TRA (Lee, Epardaud et al. 2007). Après la rencontre avec leur ligand à la surface de ces cellules stromales, les LT CD8 auto-réactifs passent d'un état d'ignorance à un état d'anergie.

### 1.3 La déviation immune

En périphérie, un autre moyen pour contrôler les LT potentiellement dangereux pour l'organisme est la déviation immune. Le principe est une réorientation de la réponse immune vers un phénotype moins agressif (Figure 10c). Par exemple, dans un désordre auto-immun de type 1, la différenciation de LT CD4 en cellules Th2 peut freiner la pathologie (Liblau, Singer et al. 1995).

### 1.4 La délétion clonale

Les LT stimulés de façon répétée expriment FasL, ligand du récepteur de mort Fas. L'expression de Fas par les LT est constitutive. L'activation chronique des LT auto-réactifs en périphérie entraîne leur mort cellulaire, appelée activation induced cell death (AICD), induction d'apoptose suite à l'interaction entre Fas et FasL (Brunner, Mogil et al. 1995; Dhein, Walczak et al. 1995) (Figure 10d). De façon intéressante, les souris *lpr* et *gld*, respectivement déficientes pour Fas et FasL, présentent un syndrome lupique lymphoprolifératif (Watanabe-Fukunaga, Brannan et al. 1992; Sobel, Kakkanaiah et al. 1993). Chez l'Homme, un défaut d'activation de cette voie de mort Fas/FasL a été associé au développement d'un syndrome auto-immun lymphoprolifératif (Fisher, Rosenberg et al. 1995). D'autre part, la délétion clonale peut également être induite par les cellules stromales des ganglions lymphatiques présentent à leur surface des complexes CMH-TRA (Gardner, Devoss

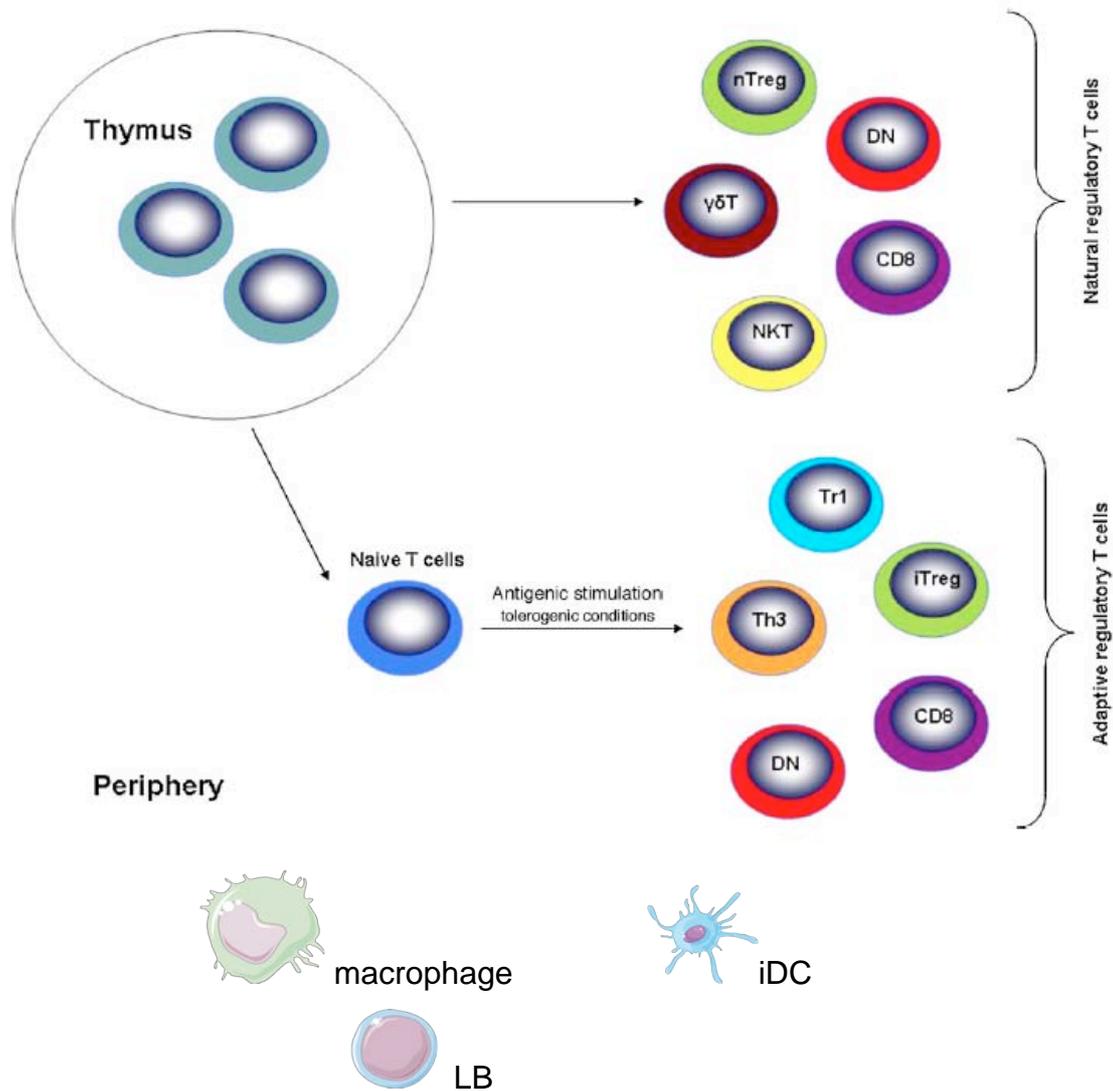
et al. 2008; Cohen, Guidi et al. 2010). Cette génération périphérique de TRA est notamment dépendante de l'expression d'AIRE.

En plus de ces mécanismes passifs de tolérance, des populations cellulaires assurent de façon active le contrôle des cellules potentiellement auto-réactives.

## **2 La tolérance dominante**

### **2.1 Existence de différentes populations régulatrices**

La capacité de LT à contrôler des réponses immunes fut découverte dans les années 1970 (Gershon and Kondo 1970; Gershon and Kondo 1971). Ces cellules T suppressives furent décrites comme une population cellulaire spécialisée capable de sécréter des molécules immunosuppressives. Cependant, l'impossibilité de caractériser ces protéines a conduit à abandonner ce champ d'investigations dans les années 1980 (Moller 1988; Green and Webb 1993). Dr Sakaguchi et ses collègues ont réveillé l'intérêt pour ces cellules T suppressives dans les années 1990. Suite à la description d'une population mineure de LT CD4 (5 à 10%) caractérisée par une forte expression de la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-2 (IL-2R $\alpha$  ou CD25), ils ont démontré son rôle crucial dans le contrôle de LT auto-réactifs *in vivo* (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 1995) (Asano, Toda et al. 1996). Puis, ces LT régulateurs (Treg) ont été décrits *in vitro* comme anergiques et effectivement supprimeurs (Read, Mauze et al. 1998; Takahashi, Kuniyasu et al. 1998; Thornton and Shevach 1998). Plus récemment, chez l'Homme, une population T CD4 présentant un phénotype et des fonctions similaires a été identifiée (Baecher-Allan, Brown et al. 2001; Dieckmann, Plottner et al. 2001; Jonuleit, Schmitt et al. 2001; Levings, Sangregorio et al. 2001; Ng, Duggan et al. 2001; Stephens, Mottet et al. 2001; Taams, Smith et al. 2001).



Adapté de Shalev et al., *Seminars in Immunology*, 2011 (Shalev, Schmelzle et al. 2011).

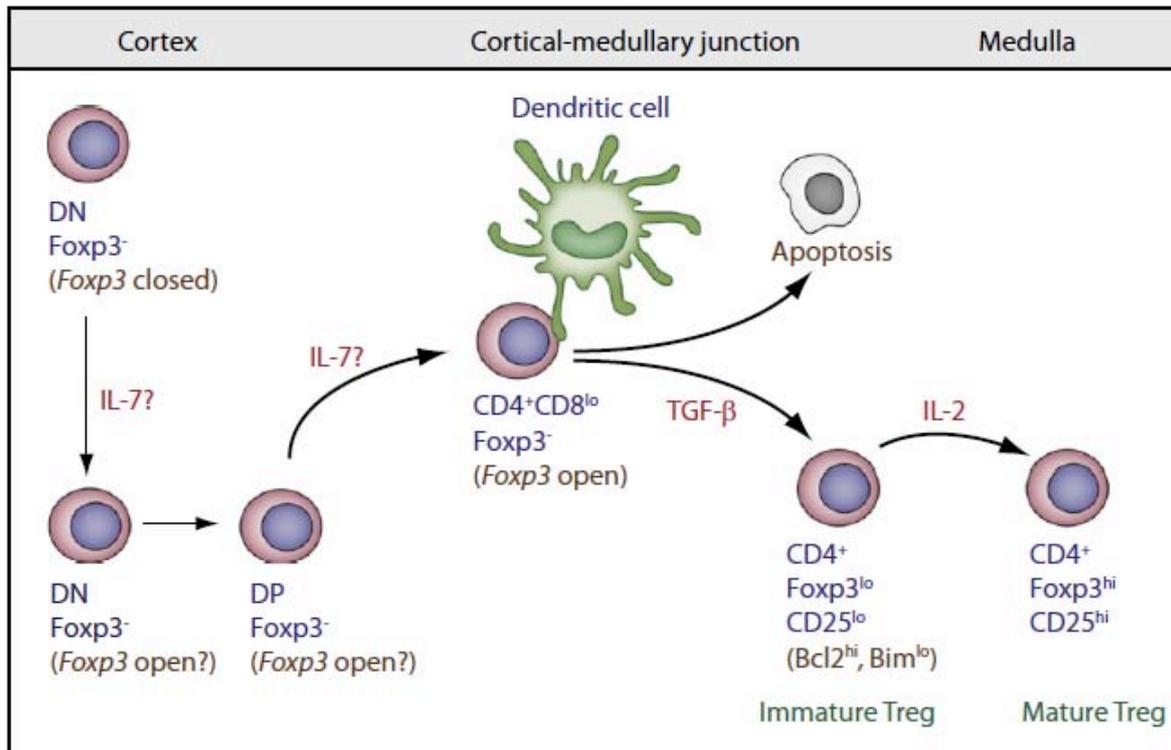
**Figure 11. Existence de différentes populations régulatrices.**

En périphérie, différentes populations de cellules régulatrices existent. Les Treg sont qualifiées de « naturels » lorsqu'ils sont générés dans le thymus. Les populations T suppressives dites « induites » sont constituées de cellules Treg différenciées en périphérie à partir de LT naïfs. En plus des populations T, il existe des LB régulateurs et des DC immatures (iDC) dites « tolérogènes ».

D'autres populations du système immunitaire, non T CD4, possèdent également des fonctions régulatrices (Figure 11). Ce sont des sous-populations de LT CD8 (Xystrakis, Dejean et al. 2004; Bienvenu, Martin et al. 2005; Smith and Kumar 2008), de LB (Mizoguchi, Mizoguchi et al. 1997; Mizoguchi and Bhan 2006), de iNKT (Bendelac, Rivera et al. 1997; van der Vliet, von Blomberg et al. 2001), de macrophages (mosser edwards nri 2008) et de DC tolérogènes (Morelli and Thomson 2007). Parmi les LT CD4, deux populations régulatrices générées en périphérie (et non dans le thymus comme les Treg naturels ou nTreg) : les Treg induits (iTreg) et les Tr1. Elles participent au maintien de la tolérance dominante. Dans les paragraphes suivants, je me focalise sur les cellules régulatrices nTreg, caractérisées par l'expression de CD25 et du facteur de transcription Foxp3 (Forkhead box P3), population que j'ai étudiée au cours de ma thèse.

## 2.2 Développement thymique des lymphocytes $T\alpha\beta$ régulateurs Foxp3<sup>+</sup>

Les nTreg ont été mise en évidence pour la première fois par le groupe du Dr Sakaguchi et al. En effet, il a été constaté que des souris thymectomisées trois jours après leur naissance développent des manifestations pathologiques dépendantes des LT. Le transfert de splénocytes ou thymocytes totaux provenant de souris non manipulées prévient l'apparition de ces lésions (Asano, Toda et al. 1996). Cette expérience démontre que chez la souris, quatre à cinq jours après la naissance, une population de Treg d'origine thymique permet le maintien d'une tolérance dominante en périphérie. Les premiers travaux décrivent que le développement thymique des nTreg commençait au stade DP (Bensinger, Bandeira et al. 2001; Liston, Nutsch et al. 2008) mais des travaux récents suggèrent que cet événement a lieu plus tardivement (Lee and Hsieh 2009; Schallenberg, Tsai et al. 2010). Il semblerait que la plupart des nTreg se développe à partir des cellules CD4 SP dans la médulla thymique peuplée de mTECs et de CPA d'origine hématopoïétique, principalement des DC (Rodewald, Paul et al. 2001; Kyewski and Klein 2006). Les mTECs seraient les principales CPA capables d'induire la sélection des nTreg (Jordan, Boesteanu et al. 2001; Apostolou, Sarukhan et al. 2002). Mais, un défaut d'expression des molécules de CMH de classe II (Hinterberger, Aichinger et al. 2010) ou de costimulation telles que CD80/86 ou CD40 (Proietto, van Dommelen et al. 2008; Spence and Green 2008), restreint à un de ces deux types cellulaires est insuffisant



Extrait de Malek et al., *Immunity*, 2010 (Malek and Castro 2010).

**Figure 12. Modèle de différenciation des Treg à deux étapes.**

La sélection thymique des Treg requière, en particulier, un signal fort par le TCR et la molécule de co-stimulation CD28 associé à des signaux délivrés par le TGF- $\beta$  et l'IL-2. Le modèle actuel de différenciation thymique des Treg est le suivant : la signalisation via le TGF- $\beta$  permet la survie des thymocytes s'engageant dans le lignage Treg. Puis, une signalisation intense par le TCR couplée à un signal par le récepteur CD28 induirait l'expression du récepteur à l'IL-2, CD25. En réponse à cette cytokine, le thymocyte s'engagerait dans le lignage Treg et exprimerait Foxp3.

pour inhiber la différenciation des nTreg. Ainsi, ces travaux établissent que les DCs, aussi bien que les mTECs, sont capables de favoriser le développement des nTreg. Chez l'Homme, ces deux types cellulaires thymiques participeraient également à la génération des nTreg (Roman, Shino et al. 2010). Cependant, il est possible que chaque type cellulaire sélectionne des nTreg avec des spécificités différentes. De plus, le développement thymique des nTreg est influencé par plusieurs facteurs, comme le signal délivré par le TCR, la réponse aux cytokines et l'expression des molécules de costimulations (Figure 12).

### Rôle du signal via le TCR

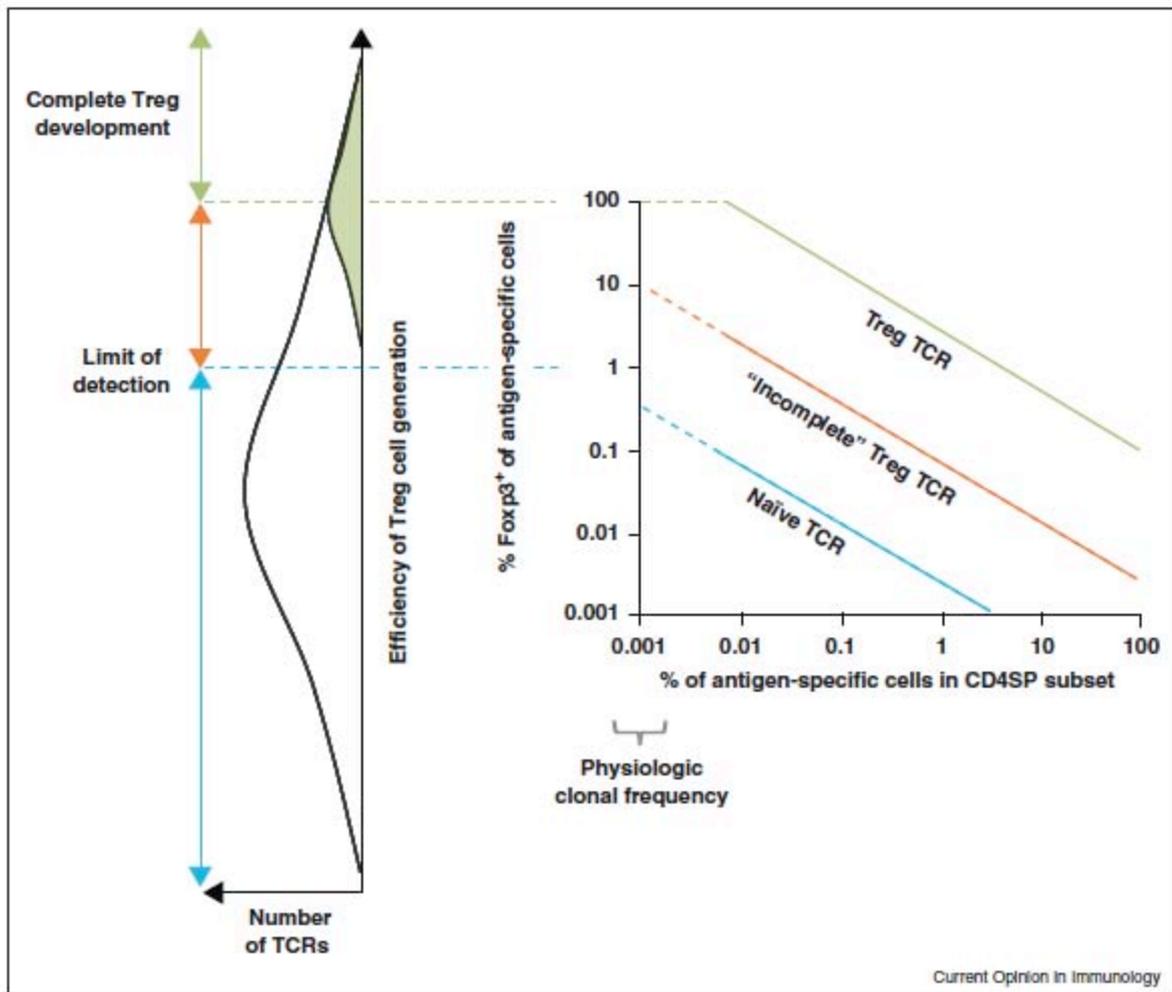
Comme pour les LT conventionnels Foxp3<sup>-</sup> (Tconv), l'engagement du TCR est requis pour la différenciation thymique en nTreg. Les molécules surexprimées par les LT activés via leur TCR, telles que CD25, CD5 et CTLA-4, sont également fortement présentes à la surface des Treg. Ils seraient donc exposés à une force de signal intense via leur TCR. L'expression de la molécule CD5 par les thymocytes et les LT périphériques est proportionnelle à la force du signal reçue via le TCR. Ainsi, CD5 agit comme un rhéostat pour adapter l'intensité de la signalisation du TCR selon le contexte d'activation (Azzam, DeJarnette et al. 2001; Wong, Barton et al. 2001). Ce mécanisme est dépendant de la tyrosine phosphatases SHP-1 (SH 2-containing protein tyrosine phosphatase) (Perez-Villar, Whitney et al. 1999). Sa fonction principale est la régulation négative de différentes voies de signalisation du TCR (Unkeless and Jin 1997). De façon intéressante, les souris déficientes pour la molécule SHP-1 présentent une fréquence augmentée de Treg (Carter, Calabrese et al. 2005).

En accord avec les précédentes données, une signalisation intense par le TCR est requise pour la sélection positive des nTreg et pour induire l'expression de Foxp3. En l'absence de réarrangement endogène du TCR $\alpha\beta$ , les nTreg exprimant un TCR transgénique se développent seulement si le ligand, pour lequel ce TCR est spécifique, est co-exprimé par les TEC (Jordan, Boesteanu et al. 2001; Apostolou, Sarukhan et al. 2002; Kawahata, Misaki et al. 2002). Dans ces travaux, le TCR exprimé est de forte avidité. Cette même expression par les Tconv entraînerait leur mort. Cette observation révèle une résistance des nTreg à la sélection négative et elle a mené à la notion de survie sélective des nTreg exprimant Foxp3 (Apostolou, Sarukhan et al. 2002; Kawahata, Misaki et al. 2002). Cette idée est en accord avec

l'expression de molécules de survie et régulant l'intensité du signal transmis par le TCR dépendante de Foxp3 telles que CD5, PD-1, CTLA-4, OX40, GITR (glucocorticoid induced tumor necrosis factor family-related gene/protein) (Zheng and Rudensky 2007). D'autre part, l'affinité des TCR des Treg pour les antigènes du soi est élevée, elle est même supérieure à celle des TCR des Tconv (Hsieh, Liang et al. 2004).

Dans un autre modèle expérimental de souris transgéniques exprimant un clone de TCR faisant partie du répertoire physiologique des TCR des Treg, il a été montré que la génération de nTreg est efficace si le nombre de précurseurs est fortement restreint (Bautista, Lio et al. 2009). Ainsi, une compétition intraclonale limite l'induction d'expression de Foxp3 dans les thymocytes portant un TCR de même spécificité assurant ainsi un large répertoire de TCR. L'ensemble de ces travaux suggère l'existence de niches spécifiques abritant les antigènes impliqués dans la sélection des nTreg. Elles permettraient leur différenciation en nombre limité (Figure 13) (Leung, Shen et al. 2009). Ces données suggèrent que les TCR des Treg sélectionnés dans ces niches reconnaîtraient des antigènes tissulaires rares plutôt qu'ubiquitaires (Picca, Larkin et al. 2006). Cela est en accord avec d'autres travaux proposant l'existence de Treg périphériques spécifiques d'antigènes (Taguchi, Kontani et al. 1994; Seddon and Mason 1999) et démontrant que le répertoire des Treg varie selon leur localisation (Lathrop, Santacruz et al. 2008).

La comparaison des répertoires du TCR entre les Treg et les Tconv exprimant une chaîne  $\beta$  transgénique et une chaîne  $\alpha$  endogène révèle que le répertoire des Treg est plus varié et assez différent (Pacholczyk, Ignatowicz et al. 2006). Ces données ont été confirmées dans d'autres modèles expérimentaux (Wong, Obst et al. 2007; Pacholczyk and Kern 2008). Etant donné que les répertoires des TCR des Treg et Tconv se recoupent (Hsieh, Zheng et al. 2006), un TCR reconnaissant un antigène du soi peut donc être exprimé par une cellule Treg et Tconv. Ceci suggère que l'expression de Foxp3 et l'engagement dans le lignage nTreg nécessiteraient des signaux supplémentaires (via d'autres récepteurs que le TCR).



Extrait de Lio et al., *Current Opinion in Immunology*, 2011 (Lio and Hsieh 2008).

**Figure 13. Modèle hypothétique de sélection des Treg selon l'affinité de leur TCR.**

L'ensemble des études actuelles montrent que la fréquence d'un clone de TCR donné est inversement proportionnelle avec le pourcentage de cellules T Foxp3+ présentant la même spécificité antigénique (Graphique de droite). Ces données illustrent les différences quantitatives entre les TCR, appelés TCR de Treg primaires, de Treg incomplets et de Treg naïfs. Le graphique de gauche est un modèle hypothétique basé sur les données expérimentales concernant la fréquence faible de Treg au sein de la population T polyclonale normale. En effet, plus la fréquence d'un clone T est importante, moins la proportion de Treg est élevée.

### Rôle des cytokines

Un autre signal essentiel pour la différenciation des thymocytes en nTreg est délivré par des cytokines appartenant à la famille de la chaîne  $\gamma$  commune aux récepteurs de cytokines, en particulier l'IL-2 et, dans une moindre mesure, l'IL-7 et l'IL-15. Les souris déficientes pour l'IL-2 ou pour l'expression de son récepteur (IL-2R $\alpha$  ou l'IL-2R $\beta$ ) présentent une fréquence et un nombre absolu de Treg sévèrement diminués (Fontenot, Rasmussen et al. 2005; Burchill, Yang et al. 2007; Soper, Kasproicz et al. 2007). L'absence d'IL-7 (Peffault de Latour, Dujardin et al. 2006) ou d'IL-15 (Vang, Yang et al. 2008) n'affecte pas la génération des nTreg. Par contre, les souris déficientes pour les voies de signalisation de l'IL-2 et l'IL-7 ou pour la chaîne commune  $\gamma$  du récepteur à ces cytokines sont complètement dépourvues de thymocytes et de LT périphériques Foxp3<sup>+</sup> (Bayer, Lee et al. 2008; Vang, Yang et al. 2008). L'ensemble de ces données montrent que l'IL-2 joue un rôle important mais non-redondant dans le développement des nTreg. Les précurseurs des CD4 SP CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> sont CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> dans les thymus de souris néonatales (Fontenot, Dooley et al. 2005). L'IL-2, associée à un signal fort par le TCR, est requise pour la génération de nTreg. A partir de ces données, Lio et Hsieh ont proposé un modèle de différenciation thymique des nTreg en deux étapes (Burchill, Yang et al. 2008; Lio and Hsieh 2008). Un signal important via le TCR résulterait en une surexpression de CD25. Cette capacité augmentée des précurseurs des nTreg à répondre à l'IL-2 aboutirait à l'expression de Foxp3 (Burchill, Yang et al. 2008; Lio and Hsieh 2008).

Le Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) est également nécessaire pour le développement des nTreg en leur fournissant un signal de survie. Ce signal favorise leur résistance à la sélection négative (Ouyang, Beckett et al. 2010). En effet, l'absence d'expression de la sous-unité I du récepteur au TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ RI) par les thymocytes DP résulte en un important défaut de génération de nTreg durant les premières semaines de vie (Liu, Zhang et al. 2008).

De façon intéressante, les souris déficientes pour l'IL-2 et le TGF- $\beta$  sont totalement dépourvues de Treg (Liu, Zhang et al. 2008). Ce travail démontre la coopération de ces deux cytokines lors du développement des nTreg.

### Rôle de la molécule de costimulation CD28

Le signal de costimulation transmis par la molécule CD28 joue un rôle essentiel dans la différenciation des Treg. Ceci est illustré par le défaut de développement des nTreg chez les souris déficientes pour les molécules CD28 ou CD80/CD86 (Salomon, Lenschow et al. 2000; Tai, Cowan et al. 2005). La partie intracellulaire de CD28 recrute Lck, protéine participant à la transduction du signal par le TCR. Ce domaine de CD28 est critique pour l'induction de l'expression de Foxp3 (Tai, Cowan et al. 2005). Par conséquent, une signalisation coordonnée entre le TCR et CD28 serait nécessaire pour la différenciation thymique des Treg.

Les thymocytes CD4 SP Foxp3<sup>+</sup> expriment fortement le ligand de CD40. La génération des Treg chez les souris déficientes pour CD40 et CD40L est diminuée de 50 à 60%. L'expression de CD40 à la surface des mTEC ou des DC est suffisante pour la génération des nTreg. Ainsi, la molécule de costimulation CD40L est requise pour le développement des nTreg (Spence and Green 2008).

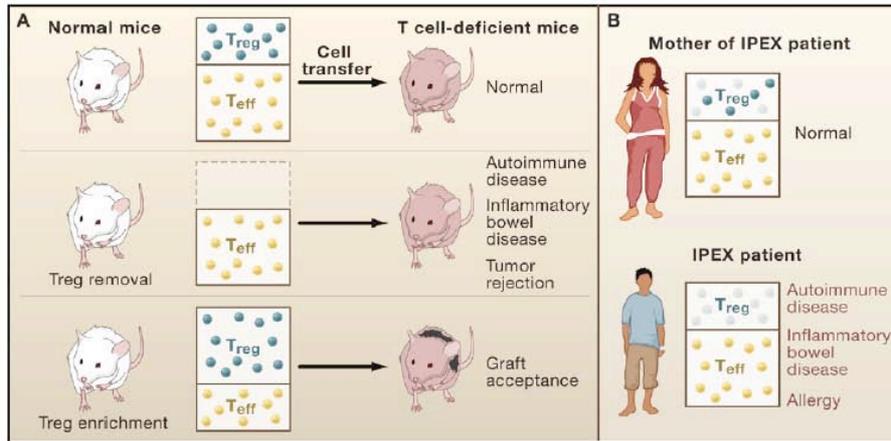
### 2.3 Phénotype des nTreg

Les expériences d'induction d'auto-immunité suite à une thymectomie et de protection grâce à une reconstitution de l'hôte avec des splénocytes totaux ou des LT CD4 issus de souris syngéniques non traitées suggéraient fortement l'existence d'une population T CD4 régulatrice. La clé pour prouver clairement son existence était de trouver un marqueur phénotypique membranaire. La déplétion spécifique de cette population chez des souris adultes devait rompre les mécanismes de tolérance et aboutir à l'apparition d'un désordre auto-immun. En effet, le transfert de LT CD4 périphériques dépourvus des cellules CD5<sup>high</sup> ou CD45RC<sup>low</sup> à des hôtes syngéniques immunodéficients conduit au développement spontanément de manifestations auto-immunes affectant différents organes (Sakaguchi, Fukuma et al. 1985; Powrie and Mason 1990). Le transfert des LT CD4 totaux prévient l'apparition de l'auto-immunité. Puis, la recherche d'un marqueur plus spécifique de la population T CD4 protectrice a abouti à un candidat : la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-2, CD25 (ou IL-2Ra) (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 1995). En effet, le transfert de cellules T CD4 dépourvues de LT CD25<sup>+</sup> à des souris athymiques entraîne le développement de manifestations auto-immunes. Il peut être efficacement inhibé par le cotransfert d'un nombre restreint de LT CD4 CD25<sup>+</sup>.

Le phénotype de ces cellules nTreg CD25<sup>+</sup> se caractérise par la forte expression des molécules CTLA-4 (Takahashi, Tagami et al. 2000), ICOS (inducible costimulator) (Dong, Juedes et al. 2001) et GITR (McHugh, Whitters et al. 2002). Cependant, ces protéines (CD25, CTLA-4, ICOS et GITR) sont non spécifiques car elles sont aussi surexprimées par les Tconv activés. En 2006, la molécule CD127, chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-7, a été décrite comme faiblement exprimée à la surface des nTreg chez la souris et l'Homme (Liu, Putnam et al. 2006; Seddiki, Santner-Nanan et al. 2006). Ainsi, la combinaison du niveau d'expression de CD25 et CD127 permet d'identifier une population enrichie en LT CD4 régulateurs.

#### 2.4 Découverte du facteur de transcription des Treg : Foxp3

Des études sont toujours en cours afin d'identifier un marqueur membranaire exclusif aux Treg. Mais, la découverte du facteur de transcription Foxp3 a révolutionné leur caractérisation phénotypique et fonctionnelle. Une mutation récessive dans le gène de Foxp3 localisé sur le chromosome X a été décrite chez les souris Scurfy. Cette mutation est létale chez les souris mâles dans les premières semaines de vie. Chez ces souris, les Treg sont en nombre très restreint voire nul. Ces souris développent spontanément un syndrome auto-immun. Cette pathologie se caractérise par une hyperactivation des LT CD4 et par leur production excessive de cytokines inflammatoires (Brunkow, Jeffery et al. 2001). De façon intéressante, des mutations dans le gène codant pour Foxp3 chez l'Homme sont la cause du développement du désordre auto-immun appelé IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome). Cette pathologie IPEX se traduit par des atteintes auto-immunes multi-organes, une maladie inflammatoire de l'intestin et une susceptibilité accrue aux infections (Bennett, Christie et al. 2001).



Extrait de Sakaguchi et al., *Cell*, 2008 (Sakaguchi, Yamaguchi et al. 2008).

**Figure 14. Importance chez la souris (A) et l'homme (B) de l'existence des lymphocytes T CD4 régulateurs  $Foxp3^+$ .**

Chez la souris (A) et l'Homme (B), le maintien d'un équilibre entre les populations T CD4 conventionnelles et régulatrices est crucial pour l'homéostasie de l'organisme. (A) En effet, le transfert des LT CD4<sup>+</sup> conventionnels (CD45RB<sup>high</sup> ou CD25<sup>-</sup>) chez des hôtes syngéniques immunodéficients provoque le développement d'un syndrome de dépérissement. Le co-transfert des deux sous-populations de LT CD4 prévient le développement de la pathologie auto-immune. (B) Chez l'Homme, les personnes souffrant de l'IPEX présentent une mutation récessive au niveau du gène *Foxp3*. Il se localise sur le chromosome X. L'IPEX est un syndrome auto-immun multiorgane.

Les similarités immunologiques et cliniques entre les manifestations inflammatoires développées par les patients atteints d'IPEX et les animaux Scurfy ont invité les chercheurs à déterminer le rôle potentiel de Foxp3 dans le développement et la fonction des Treg (Figure 14) (Fontenot, Gavin et al. 2003; Hori, Nomura et al. 2003; Khattri, Cox et al. 2003; Ochs, Ziegler et al. 2005). Chez la souris, ces études ont révélé une expression de Foxp3 restreinte aux LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> périphériques et aux thymocytes CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>, quelque soit l'état d'activation des autres cellules. Les cellules T exprimant Foxp3 apparaissent rapidement après la naissance et leur déplétion conduit au développement de syndromes auto-immuns (Kim, Rasmussen et al. 2007; Lahl, Loddenkemper et al. 2007). La transduction rétrovirale du gène codant pour Foxp3 dans des cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> peut les convertir en LT « Treg-like ». Ces cellules sont capables d'inhiber la prolifération de Tconv in vitro et le développement de pathologies auto-immunes et inflammatoires (Hori, Nomura et al. 2003). Cette expression ectopique de Foxp3 induit aussi la surexpression des molécules membranaires caractéristiques des nTreg telles que CD25, CTLA-4 et GITR. Elle inhibe la production d'IL-2, d'IFN- $\gamma$  et d'IL-4. D'autre part, le transfert de LT CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> issus de souris normales dans les souris Scurfy ou déficientes pour Foxp3 prévient l'apparition de l'inflammation systémique (Fontenot, Gavin et al. 2003). Dans des chimères hématopoïétiques reconstituées avec un mélange de cellules compétentes et déficientes pour Foxp3, les cellules originaires de la moelle osseuse déficiente pour Foxp3 ne se différencient pas en nTreg. En revanche, les cellules originaires de la moelle osseuse sauvage mûrent en nTreg capables de contrôler le développement de pathologies auto-immunes. Ces données montrent un rôle intrinsèque de Foxp3 dans la différenciation thymique et la fonction des Treg. Des souris surexprimant Foxp3 présentent une augmentation du nombre de Treg associé à une expression très forte de Foxp3. Ces nTreg sont capables d'exercer une suppression de la prolifération de Tconv in vitro (Khattri, Cox et al. 2003).

Chez l'Homme, un travail révèle que l'activation in vitro de Tconv induit l'expression de Foxp3 et l'acquisition de fonctions suppressives (Walker, Kasproicz et al. 2003; Walker, Carson et al. 2005). Cependant, une autre étude montre une expression transitoire de Foxp3 et l'absence de fonctions régulatrices par les Tconv stimulés dans des conditions similaires (Gavin, Torgerson et al. 2006).

Ainsi, chez la souris, Foxp3 est le facteur de transcription caractéristique des

Treg, nécessaire et suffisant pour leur développement et leur fonction. Foxp3 est aujourd'hui le marqueur moléculaire le plus spécifique pour les nTreg chez les rongeurs et permet de décrypter les bases moléculaires et génétiques du développement et de la fonction des Treg.

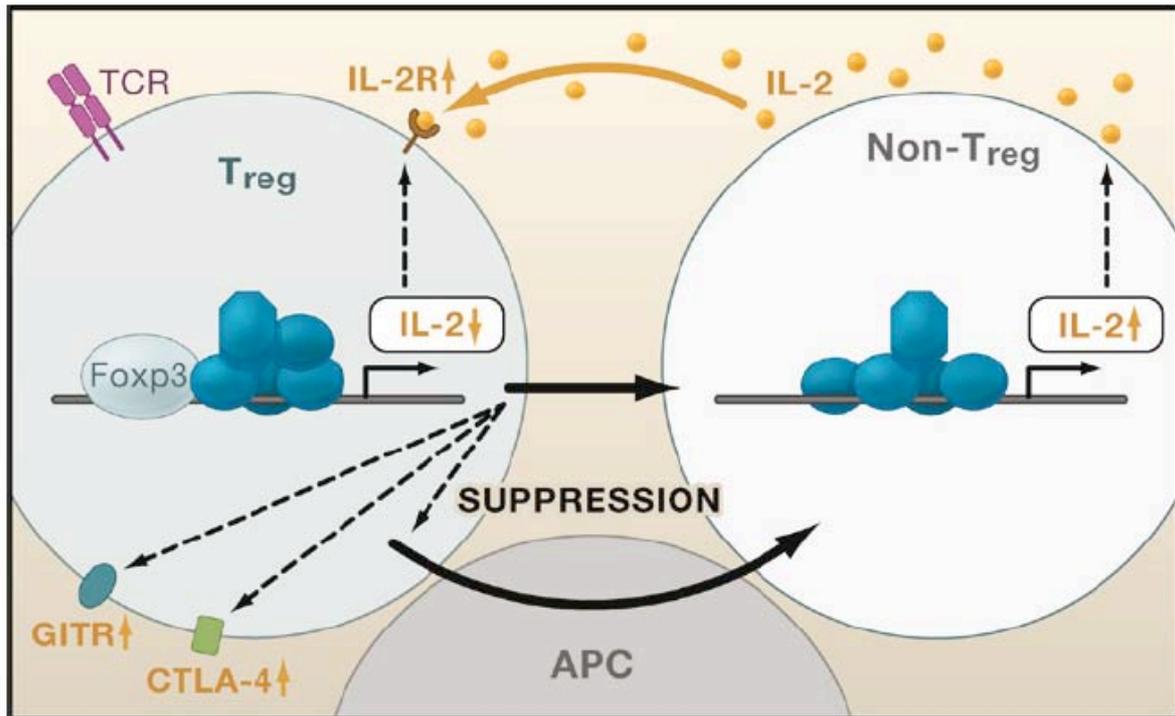
## 2.5 Contrôle de l'homéostasie des Treg

### Rôle de la présence d'antigène en périphérie

Les Treg périphériques, contrairement aux Treg thymiques, issus de rats dépourvus de glandes thyroïdiennes sont incapables de prévenir l'apparition de thyroïdite induite chez un hôte syngénique par thymectomie et irradiation. Par contre, les deux types de Treg contrôlent le développement de diabète induit par thymectomie et irradiation. Ainsi, le défaut des Treg périphériques est causé par l'absence de l'auto-antigène pour lequel ils sont spécifiques (Seddon and Mason 1999). L'ensemble de ces données permet d'établir la notion de survie des Treg en périphérie dépendante de la présence de l'auto-antigène pour lequel ils sont spécifiques.

### Rôle des cytokines

L'IL-2 est la cytokine la plus étudiée pour son impact sur le développement, l'homéostasie et la fonction des Treg (Malek 2008). Il a été clairement établi que l'IL-2 a un rôle essentiel et non redondant dans le contrôle de la fonction des Treg en périphérie (Figure 15). Les souris déficientes pour l'IL-2 ou pour CD25 développent un syndrome lymphoprolifératif et une colite (Sadlack, Merz et al. 1993; Suzuki, Kundig et al. 1995). L'injection à des souris d'anticorps neutralisants pour l'IL-2 conduit à une prolifération diminuée des Treg et à la perte de leur fonctionnalité (Setoguchi, Hori et al. 2005). Les Treg occupent des niches homéostatiques dont l'accès serait contrôlé par la disponibilité en IL-2 (Almeida, Zaragoza et al. 2006; Busse, de la Rosa et al. 2010). L'ensemble de ces données a permis d'établir un modèle : l'IL-2, produite par les cellules Tconv activées, favoriserait la prolifération et survie des Treg en agissant de manière paracrine. Ainsi, cette boucle de rétrocontrôle permettrait le maintien d'un équilibre entre le nombre de Treg et de LT activés en conditions physiologiques. L'expression de CD25 est différente selon l'état d'activation de la cellule Treg. Les Treg activés, caractérisés par la forte expression



Extrait de Sakagushi et al., Cell, 2008 (Shevach 2009).

**Figure 15. L'IL-2, une cytokine majeure pour l'homéostasie des Treg.**

Les interactions entre les Treg, les Tconv et les CPA contrôlent les fonctions des Treg. Les Treg ne produisent pas d'IL-2 et cette cytokine est cruciale pour leur survie et le maintien de leurs fonctions en périphérie. Ils sont par conséquent dépendants de la sécrétion d'IL-2 par les Tconv.

de la molécule CD44, présentent un phénotype CD25<sup>low</sup> ou CD25<sup>-</sup> (Min, Thornton et al. 2007). De façon intéressante, la majorité des Treg périphériques chez les souris déficientes pour l'IL-2 appartient à cette sous-population de Treg CD25<sup>low</sup>CD44<sup>high</sup>. Elle exprime fortement des marqueurs d'activation tels que CD69, CD103 et ICOS (Fontenot, Rasmussen et al. 2005). Le phénotype activé des Treg dans ces souris peut être secondaire au syndrome inflammatoire. Une interprétation alternative de ces résultats est la suivante : la fonction cruciale de l'IL-2 serait de contribuer au maintien de la sous-population de Treg CD25<sup>+</sup>CD44<sup>low</sup>. Cette sous-population présente des fonctions non redondantes pour inhiber le développement des désordres inflammatoires.

En périphérie, la survie des Treg et la surexpression de Foxp3 dépendraient également de l'IL-7 et l'IL-15 (Wuest, Willette-Brown et al. 2008). Mais, l'IL-2 reste la cytokine majeure dans le maintien de l'homéostasie et des fonctions des Treg en périphérie. Enfin, le TGF- $\beta$  semble également influencer l'homéostasie des Treg en agissant sur leur survie. En effet, l'expression du récepteur au TGF- $\beta$  est indispensable à leur fonction et à leur survie (Gorelik and Flavell 2000; Li, Sanjabi et al. 2006; Marie, Liggitt et al. 2006; Ouyang, Beckett et al. 2010).

#### Rôle des récepteurs membranaires

Les souris NOD (non obese diabetic) sont génétiquement prédisposées au développement de diabète auto-immun. Le blocage de CD28 chez ces souris réduit le nombre de Treg en périphérie et exacerbe la pathologie (Tang, Smith et al. 2003). En périphérie, l'expression de la molécule de costimulation CD28 par les Treg est requise pour leur maintien. Elle favorise leur survie et leur auto-renouvellement.

Une autre molécule importante pour l'homéostasie des Treg est la S1P (sphingosine-1-phosphate) (Liu, Burns et al. 2009). Une surexpression de ce récepteur de migration confère un désavantage sélectif aux Treg. Elle modulerait négativement leur prolifération et/ou leur survie.

Le récepteur membranaire CD44 est également impliqué dans l'homéostasie des Treg en périphérie en induisant la prolifération des Treg (Bollyky, Falk et al. 2009).

## 2.6 Recirculation et localisation des Tregs

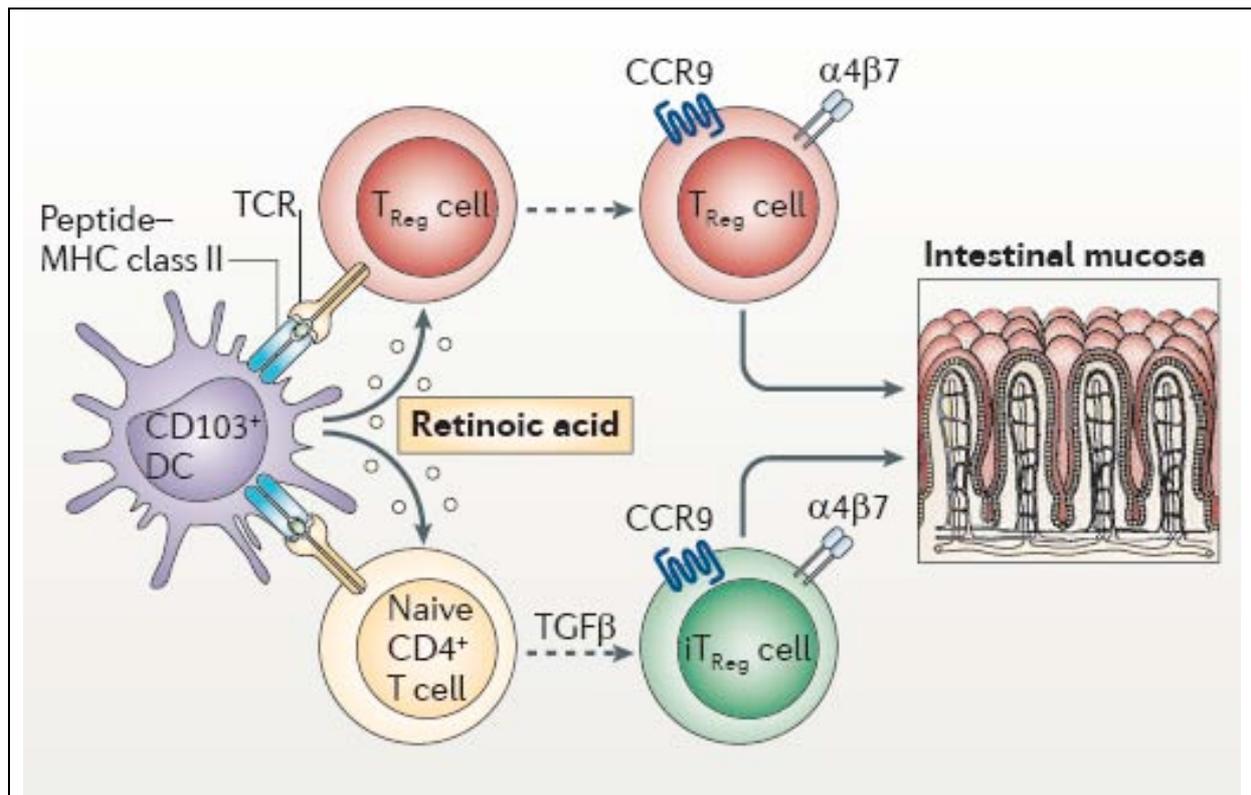
Les DC au sein des ganglions lymphatiques drainants présentent des TRA (Scheinecker, McHugh et al. 2002). Les Treg spécifiques d'antigènes tissulaires sont particulièrement enrichis au niveau de ces zones (Samy, Parker et al. 2005). Ces données suggèrent que les Treg spécifiques d'antigènes migrent et s'activent dans la région des ganglions lymphatiques où sont préférentiellement présentés des peptides du soi. Les Treg expriment un spectre important de récepteurs aux chimiokines (Huehn and Hamann 2005). Dans les ganglions lymphatiques périphériques, 80% des LT Foxp3<sup>+</sup> expriment fortement CCR7. Un Treg sur deux exprime fortement CD62L (ou sélectine L) qui reconnaît les addressines vasculaires CD34, GlyCAM-1 (glycosylation dependent cell adhesion molecule 1) et MadCAM-1 (mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1) exprimés par l'endothélium dans les ganglions lymphatiques et les tissus lymphoïdes muqueux (Szanya, Ermann et al. 2002; You, Slehoffer et al. 2004; Huehn and Hamann 2005). Les Treg sont également capables de migrer au niveau des tissus inflammés, des sites infectieux et des tumeurs (Belkaid, Piccirillo et al. 2002). L'expression de ces récepteurs de domiciliation contrôle leur recirculation et leur localisation.

Le large panel de récepteurs de domiciliation exprimé par les Treg corrèle avec leur hétérogénéité fonctionnelle. Les Treg CCR7<sup>+</sup>CD62L<sup>high</sup> sont capables de migrer dans les organes lymphoïdes secondaires. Cette population de Treg présente des capacités accrues à prévenir le développement de diabète autoimmun chez la souris suggérant le contrôle des LT autoréactifs au sein des ganglions lymphatiques locaux (Szanya, Ermann et al. 2002). Les Treg CD103<sup>+</sup> présentent un phénotype mémoire et des capacités suppressives supérieures aux Treg CD103<sup>-</sup> *in vitro* et *in vivo*. En effet, dans un modèle murin de colite, seuls les Treg CD103<sup>+</sup> sont capables de contrôler l'inflammation dans la muqueuse du côlon (Uhlir, Coombes et al. 2006). De façon similaire, dans le modèle infectieux de *Leishmania major*, l'expression de CCR5 par les Treg est requise pour leur migration au niveau des lésions cutanées épidermiques où ils favorisent la persistance des bactéries (Yurchenko, Tritt et al. 2006). D'autres études montrent l'importance de la domiciliation des Treg dans le contrôle d'une inflammation localisée, la tolérance vis-à-vis d'une allogreffe et la tolérance foeto-maternelle (Lee, Wang et al. 2005; Yurchenko, Tritt et al. 2006;

Kallikourdis, Andersen et al. 2007; Sather, Treuting et al. 2007; Schneider, Meingassner et al. 2007).

Au niveau des barrières épithéliales telles que les intestins et la peau, le système immunitaire est stimulé par la flore commensale. Il doit être capable de tolérer les micro-organismes commensaux et d'éliminer des micro-organismes potentiellement pathogènes. Les métabolites des vitamines A et D contribuent au contrôle de cette balance en participant au développement et à l'homéostasie des Treg au niveau de ces tissus. Au niveau des tissus lymphoïdes associés aux intestins (GALT), les DC CD103<sup>+</sup> produisent à partir de la vitamine A de l'acide rétinoïque. Ce métabolite induit l'expression par les Treg de CCR9 et de l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$ , récepteurs de domiciliation vers les intestins (Figure 16) (Benson, Pino-Lagos et al. 2007; Siewert, Menning et al. 2007). De plus, il participe à la différenciation en périphérie des iTreg (Sun, Hall et al. 2007). Ainsi, il joue un rôle dans le maintien du nombre et de la fonction des Treg, notamment lors de réponses inflammatoires (Coombes, Siddiqui et al. 2007; Mucida, Park et al. 2007; Sun, Hall et al. 2007; Zhou, Kong et al. 2010). De façon similaire à l'acide rétinoïque, au niveau de la peau, la forme active de la vitamine D (1,25-dihydroxyvitamine D3) favorise l'expression de CCR10, récepteur de domiciliation pour l'épiderme (Gorman, Kuritzky et al. 2007; Sigmundsdottir, Pan et al. 2007; Jeffery, Burke et al. 2009). Ainsi, l'enrichissement de ces métabolites dans les intestins et la peau favoriserait la spécialisation des Treg, en les dotant des propriétés migratoires et fonctionnelles nécessaires à l'immunorégulation de ces tissus.

En accord avec l'ensemble de ces travaux, un défaut d'expression des récepteurs de domiciliation par les Treg ou leur blocage compromet leur fonction.



Extrait de Campbell et al., *Nature Reviews Immunology*, 2011 (Campbell and Koch 2011).

**Figure 16. Rôle de l'acide rétinoïque dans la localisation des Treg.**

La vitamine A est métabolisée en acide rétinoïque (RA) par les DC CD103<sup>+</sup>. Le RA induit l'expression par les Treg de récepteurs de domiciliation pour les intestins, comme CCR9 et l'intégrine α4β7. Elle est également impliquée dans l'homéostasie de cette population suppressive en participant à la différenciation périphérique de Treg Foxp3<sup>+</sup>.

ALDH1A1 : Aldéhyde déshydrogénase 1 A1.

## 2.7 Mécanismes d'action des Treg

Les Tregs sont capables d'inhiber la prolifération des Tconv, des LT CD8 (Piccirillo and Shevach 2001), les fonctions effectrices des NK (Ghiringhelli, Menard et al. 2005), des NKT (Azuma, Takahashi et al. 2003) et la production d'Ig par les LB (Lim, Hillsamer et al. 2005). Ce paragraphe décrit les mécanismes d'action mis en place *in vitro* et *in vivo* par les Treg pour contrôler l'activation de ces cibles.

### Mécanismes d'action in vitro

Les expériences de suppression de la prolifération de Tconv par des Treg *in vitro* ont été effectuées selon deux protocoles. Ils diffèrent par le mode de stimulation des LT. Dans le premier, les LT sont stimulés à l'aide des anticorps anti-CD3 et anti-CD28, les Tconv sont donc les seules cibles des Treg. Dans la seconde méthode, une source d'APC est ajoutée dans les puits contenant les Tconv en présence d'anticorps anti-CD3 solubles. Dans ce cas, les Treg peuvent donc agir sur les CPA et/ou les Tconv.

En absence de CPA, plusieurs mécanismes de suppression mis en jeu par les Treg ont été décrits. La consommation de l'IL-2 par les Treg prive les Tconv de cette cytokine et entraîne leur mort (Pandiyani, Zheng et al. 2007). La sécrétion de cytokines immunosuppressives telles que l'IL-35 permet de contrôler la prolifération des Tconv (Collison, Workman et al. 2007). L'expression de granzyme B par les Treg leur confère la capacité d'induire l'apoptose des cellules cibles (Grossman, Verbsky et al. 2004; Gondek, Lu et al. 2005). Après interaction avec son ligand sur la Tconv, la Galectine-1 exprimée par les Treg provoque l'arrêt du cycle cellulaire de la Tconv (Garin, Chu et al. 2007). CTLA-4, exprimé par les Treg, interagit avec CD80/86 à la surface des Tconv et permet un contrôle direct de l'activation et des fonctions effectrices de ces derniers (Paust, Lu et al. 2004; Paust and Cantor 2005). Cependant, en absence de CPA, les Treg murins présentent des fonctions suppressives très réduites. La principale cible des Treg lors du contrôle de la prolifération des LT effecteurs serait donc les CPA.

*In vitro*, différents mécanismes de suppression des Treg contrôlent l'activation des Tconv en modulant le phénotype des CPA. L'expression de la molécule LAG-3 (lymphocyte-activation gene 3) par les Treg inhiberait la maturation des DC après interaction avec leurs molécules du CMH de classe II (Liang, Workman et al. 2008). La molécule CD39 exprimée par les Treg, qui permet l'hydrolyse de l'ATP, priverait

les DC de cette molécule impliquée dans l'augmentation de l'expression de CD86 (Deaglio, Dwyer et al. 2007). La fibrinogène-like (FGL2), molécule sécrétée par les Treg, inhiberait directement la maturation des DC (Shalev, Liu et al. 2008). L'interaction de CTLA-4 exprimé par les Treg avec les molécules de costimulation CD80/86 à la surface des DC réduit l'expression de ces molécules à la surface des DC (Serra, Amrani et al. 2003; Misra, Bayry et al. 2004; Onishi, Fehervari et al. 2008). Enfin, l'expression de la neuropiline 1 (Nrp-1) par les Treg favorise un contact de longue durée avec la DC (Sarris, Andersen et al. 2008). La conséquence est une activation moindre des DC.

Les Treg peuvent aussi moduler le métabolisme de la DC afin contrôler la prolifération des Tconv. Une forte expression de CTLA-4 par les Treg permet l'induction de la synthèse de l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO). Grâce à cette enzyme, le tryptophane, acide aminé essentiel indispensable à la prolifération des Tconv est catabolisé en métabolite toxique, la kynurénine (Forouhar, Anderson et al. 2007; Ball, Yuasa et al. 2009).

#### Mécanismes d'action in vivo

La pertinence des multiples mécanismes de suppression des Treg décrits *in vitro* est controversée car dans ces expériences réductionnistes, plusieurs paramètres physiologiques importants pour le fonctionnement des Treg comme leur migration, leur spécificité antigénique et l'influence potentielle des autres cellules immunitaires sur leur fonction ne sont pas pris en compte. Ainsi, les travaux réalisés *in vivo* sont parfois contradictoires avec ceux effectués *in vitro*.

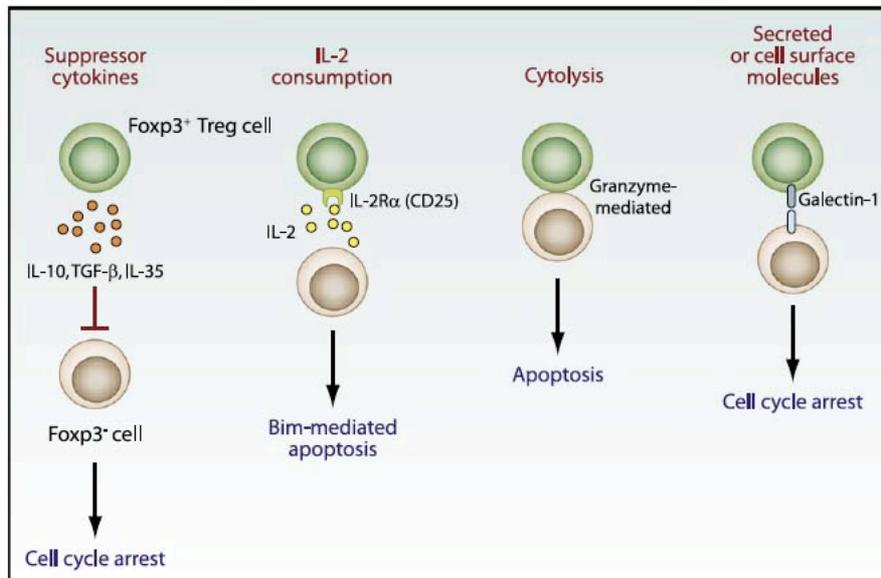
*In vitro*, les Treg sont anergiques alors qu'ils prolifèrent après engagement du TCR avec leur antigène spécifique *in vivo* (Walker, Chodos et al. 2003). *In vitro*, le blocage de l'IL-10 ou du TGF- $\beta$  est sans effet sur les fonctions suppressives des Treg. *In vivo*, l'IL-10 est une cytokine immunosuppressive majeure (Kuhn, Lohler et al. 1993; Moore, de Waal Malefyt et al. 2001). Les Treg doivent répondre à cette cytokine pour maintenir l'expression de Foxp3 et leurs fonctions suppressives (Murai, Turovskaya et al. 2009). Mais, il a été seulement suggéré dans des modèles d'inhibition de rejet de greffe (Kingsley, Karim et al. 2002), de colite spontanée (Kuhn, Lohler et al. 1993; Roers, Siewe et al. 2004) et d'auto-immunité (McGeachy, Stephens et al. 2005) que les Treg soit la source d'IL-10. La production d'IL-10 par les Treg est indispensable pour le maintien de l'homéostasie au niveau

des muqueuses, en particulier intestinale et pulmonaire (Rubtsov, Rasmussen et al. 2008), le contrôle de réponses anti-infectieuses (Belkaid, Piccirillo et al. 2002) et de colite induite par la bactérie *Helicobacter hepaticus* (Maloy, Salaun et al. 2003). Des résultats contradictoires ont été obtenus dans le modèle de transfert cellulaire induisant une colite chez un hôte immunodéficient (Asseman, Mauze et al. 1999; Murai, Turovskaya et al. 2009). Cette divergence peut s'expliquer par le fond génétique des souris. La sécrétion de TGF- $\beta$  par les Treg est nécessaire pour la suppression d'inflammation intestinale (Li, Wan et al. 2007). En effet, les Treg déficients pour le TGF- $\beta$  sont incapables de prévenir le développement de colite. *In vitro*, les Treg bloquent la sécrétion d'IL-2 par les Tconv et consomment cette cytokine ce qui inhibe la prolifération des Tconv. Mais, les LT de souris déficientes pour l'IL-2 ou le récepteur à l'IL-2 prolifèrent normalement *in vivo* après engagement du TCR (Leung, Morefield et al. 2000; Malek 2008). Ces données montrent que l'IL-2 est dispensable à la phase d'expansion des Tconv suite à la stimulation par leur antigène spécifique et remettent en question ce mécanisme de suppression.

L'absence d'expression de CTLA-4 sélective aux Treg chez des souris entraîne une autoimmunité systémique. Cette donnée montre que l'expression de CTLA-4 par les Treg est requise pour empêcher le développement d'un syndrome autoimmun indépendamment de l'expression de CTLA-4 par les Tconv (Wing, Onishi et al. 2008).

La production d'IDO par les DC est induite par les Treg. Différents travaux ont montré l'importance de ce mécanisme d'immunosuppression *in vivo* pour la tolérance foeto-maternelle, pour une transplantation, pour l'échappement tumoral et l'inhibition d'auto-immunité (Munn, Zhou et al. 1998; Grohmann, Fallarino et al. 2003; Puccetti and Grohmann 2007).

L'équipe de Kohm a supplémenté des souris sauvages avec une population polyclonale de Treg. L'immunisation de ces souris avec un peptide encéphalitogène emulsifié dans de l'adjuvant a pour conséquence une encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) de moindre sévérité (Kohm, Carpentier et al. 2002). La suppression de la pathologie est associée à une diminution de l'infiltration par les cellules inflammatoires de l'organe cible, le système nerveux central. Cependant, la production de cytokines par les Tconv est inchangée. Dans d'autres modèles murins d'auto-immunité, il a été reporté que les Treg agissaient sur la différenciation des Tconv en Teff Th1 (Sarween, Chodos et al. 2004; DiPaolo, Glass et al. 2005).



Extrait de Shevach et al., *Immunity*, 2009 (Shevach 2009).

**Figure 17. Mécanismes de suppression des Treg directement sur les Tconv.**

Les mécanismes d'action des Treg sont nombreux. Selon leur localisation et le type de réponse immune à contrôler, les Treg peuvent directement inhiber l'activation des Tconv en produisant des cytokines immunosuppressives, en privant la Tconv d'IL-2, en induisant leur mort cellulaire ou en provoquant l'arrêt du cycle cellulaire de la Tconv, via l'expression de la Galectine-1.

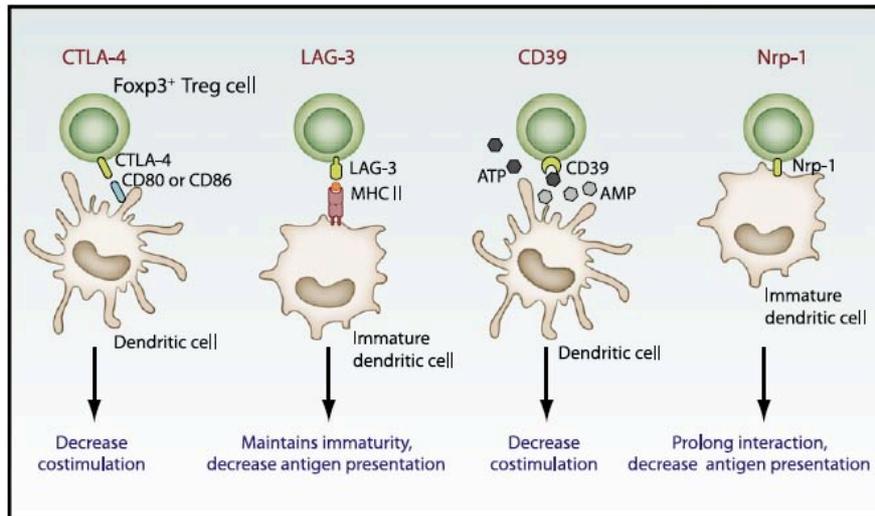
L'imagerie cellulaire par biphoton a montré que, dans les ganglions lymphatiques, en présence de Treg, le contact entre les DC et les Tconv auto-réactifs est d'une durée réduite. L'activation des Tconv est par conséquent prévenue (Tadokoro, Shakhar et al. 2006; Tang, Adams et al. 2006). Ces données suggèrent que les Treg exerceraient leurs fonctions suppressives par le blocage de la maturation des DC et/ou de leur présentation antigénique et par l'inhibition de contact entre les DC et les Tconv.

Enfin, les Treg sont aussi capables d'inhiber la lyse des cellules cibles par les LT CD8 activés *in vivo*. Leur différenciation, migration et contact avec les APC étant inchangés, les Treg agiraient sur les fonctions effectrices terminales des LT CD8 (Mempel, Pittet et al. 2006).

L'ensemble de ces données indique que les Treg peuvent contrôler les réponses immunitaires via différents mécanismes et en agissant directement sur l'activation des LT effecteurs (migration, différenciation, phase effectrice) (Figure 17) et/ou indirectement sur la biologie de la CPA (maturation, métabolisme) (Figure 18).

## 2.8 Treg et contrôle des différentes réponses immunes

Récemment, plusieurs groupes ont démontré que les Tregs utilisent les facteurs de transcription spécifiques des lignages effecteurs Th dans le but de maintenir ou restaurer l'homéostasie du système immunitaire lors de réponses immunes effectrices mettant en jeu les Th1, Th2 et Th17. En effet, T-bet, facteur de transcription nécessaire à l'établissement de réponse Th1, peut être exprimé par une sous-population de Tregs. Il serait requis pour leur fonction et leur homéostasie lors de réponses inflammatoires de type 1 (Koch, Tucker-Heard et al. 2009). De façon similaire, l'équipe du Dr Rudensky a reporté que l'expression par les Tregs de l'IRF4 (interferon regulatory factor 4), facteur de transcription impliqué dans le contrôle de la production d'IL-4 par les LT CD4, est nécessaire pour le contrôle des réponses Th2 par ces mêmes Treg. Les souris déficientes pour l'expression d'IRF4 spécifiquement dans les cellules exprimant Foxp3 développent un syndrome lymphoprolifératif associé à une augmentation sélective du nombre et de la fréquence des LT CD4 producteurs d'IL-4 et d'IL-5 et à des concentrations sériques élevées d'IgG1 et d'IgE (Zheng, Chaudhry et al. 2009). Par contre, les nombres de LT CD4 producteurs d'IL-13 et d'éosinophiles sont normaux. Ces paradoxes suggèrent que l'expression



Extrait de Shevach et al., *Immunity*, 2009 (Shevach 2009).

**Figure 18. Mécanismes de suppression des Treg sur les Tconv via les CPA.**

Pour exercer leurs fonctions suppressives, les Treg peuvent agir sur les DC en modifiant son phénotype. Ils peuvent les maintenir à un stade immature ou diminuer l'expression des molécules de costimulation ou des complexes CMH-peptides. L'activation des Tconv est ainsi indirectement inhibée.

d'IRF4 par les Treg leur confèrerait la capacité de contrôler une composante de la réponse inflammatoire de type 2, à savoir l'activation aberrante de cellules T<sub>FH</sub> et la production d'anticorps de haute affinité.

La délétion spécifique de GATA-3 dans les cellules exprimant Foxp3 révèle un rôle majeur de GATA-3 dans la fonction des Treg. Il permet en particulier l'expression optimale de Foxp3 (Wang, Su et al. 2011). Enfin, la délétion de STAT3 (Signal Transducers and Activators of Transcription 3) spécifiquement dans la population Treg conduit au développement spontané d'une inflammation intestinale létale caractérisée par une production excessive d'IL-17. La sécrétion des cytokines pro-inflammatoires de type 1 et 2 est inchangée (Chaudhry, Rudra et al. 2009). Ce travail montre un défaut sélectif des Treg déficients pour STAT3 contrôler la réponse orchestrée par les LT Th17. Les mécanismes par lesquels l'expression de T-bet, IRF4, GATA3 et STAT3 contrôle l'activité des Treg lors des différentes réponses immunes Th sont encore incompris. Ils seraient impliqués dans les propriétés influençant la migration (Chaudhry, Rudra et al. 2009; Koch, Tucker-Heard et al. 2009; Zheng, Chaudhry et al. 2009), la fonction (Chaudhry, Rudra et al. 2009; Koch, Tucker-Heard et al. 2009; Zheng, Chaudhry et al. 2009) et/ou l'homéostasie des Treg (Koch, Tucker-Heard et al. 2009).

Un modèle peut être construit à partir de l'ensemble de ces données. L'expression sélective de facteurs de transcription spécifiques d'un lignage Th aboutirait à une spécialisation phénotypique et fonctionnelle des Treg. Ce mécanisme leur confèrerait la machinerie moléculaire nécessaire au contrôle de ces différents types de réponses immunes. Ce modèle implique que le traitement de pathologies inflammatoires impliquant les LT Th1, Th2 ou Th17 nécessiterait principalement une sous-population spécifique de Treg, la sous-population exprimant les facteurs nucléaires spécifiques du lignage Th impliqué. Par conséquent, ce modèle est d'une grande importance en thérapeutique.

## 2.9 Conséquences d'un défaut qualitatif et/ou quantitatif des Treg

Les Treg sont indispensables pour le maintien de l'homéostasie de l'organisme. En dehors de la prévention des maladies autoimmunes et inflammatoires (Sakaguchi 2004; Roncarolo and Battaglia 2007), les Treg sont également impliqués dans la phase de rétraction des réponses immunes contre un pathogène (Belkaid 2007),

dans la tolérance foeto-maternelle (Tafari, Alferink et al. 1995; Aluvihare, Kallikourdis et al. 2004) et dans la tolérance aux greffes allogéniques (Joffre, Gorsse et al. 2004; Roncarolo and Battaglia 2007; Joffre, Santolaria et al. 2008). Malheureusement, une régulation exacerbée peut avoir des effets délétaires comme, par exemple, l'absence d'une réponse anti-tumorale efficace pour éradiquer les cellules malignes (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 2001; Viguier, Lemaitre et al. 2004; Zou 2006). Lors de la découverte de cette population régulatrice, le phénotype majeur observé chez les animaux déficients en Treg fut l'apparition de lésions auto-immunes et inflammatoires multi-organes (Sakaguchi 2004). Dans différents modèles, lorsque l'équilibre entre l'activité des cellules T régulatrices et celle des LT effecteurs est rompu en faveur des LT effecteurs, une réponse auto-immune est systématiquement développée. L'altération de cet équilibre peut être induite d'une manière chimique, physique, biologique ou génétique. Il peut perturber le développement thymique ou l'homéostasie des Treg périphériques. Par exemple, la thymectomie néonatale (déficit quantitatif) et l'absence d'expression de CTLA-4 par les Treg (déficit qualitatif) aboutissent au développement de syndrome auto-immun léthal (Asano, Toda et al. 1996; Wing, Onishi et al. 2008).

Des données cliniques en pathologie humaine montrent que le respect de cet équilibre est aussi requis chez l'Homme pour le maintien de l'homéostasie du système immunitaire (Buckner 2010). En effet, les patients présentant une mutation dans le gène codant pour Foxp3 atteints d'IPEX développent des lésions auto-immunes multi-organes (Bennett, Christie et al. 2001; Ochs, Ziegler et al. 2005). Les Treg périphériques des personnes souffrant de sclérose en plaques ou de diabète sont en nombre normal mais présentent un défaut fonctionnel *in vitro* (Ehrenstein, Evans et al. 2004; Viglietta, Baecher-Allan et al. 2004).

#### ***IV La réponse immunitaire orchestrée par les lymphocytes T CD4 effecteurs***

Lors d'une infection par un micro-organisme, la première ligne de défense de l'organisme est constituée par les cellules de l'immunité innée telles que les neutrophiles et les macrophages. Ces cellules se caractérisent par leur capacité à s'activer très rapidement suite à la reconnaissance non spécifique du pathogène. Les antigènes reconnus sont communs à différents pathogènes mais non exprimés

par les cellules de l'organisme. De grandes quantités de molécules pro-inflammatoires (principalement des cytokines et des chimiokines) vont être sécrétées et permettre l'élimination des agents infectieux ou la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative. Cette réponse met en jeu des cellules B et/ou T spécifiques des antigènes du micro-organisme. Selon le type de pathogènes à éliminer, une réponse humorale impliquant l'activation de LB ou une réponse à médiation cytotoxique mettant en jeu les LT CD8 sera mise en place sous le contrôle des LT CD4. En effet, les LT CD4 naïfs (LT n'ayant jamais rencontré l'antigène pour lequel il est spécifique) peuvent se différencier en diverses sous-populations de LT CD4 effecteurs « helper » ou « auxiliaires ». En fonction du type de micro-organismes à éliminer, les cellules du système immunitaire inné, via le type de cytokines sécrétées, instruisent aux LT CD4 naïfs leur devenir (Figure 19). Cette adaptation des LT CD4 au contexte infectieux représente une stratégie fondamentale par laquelle le système immunitaire adaptatif orchestre les réponses immunitaires.

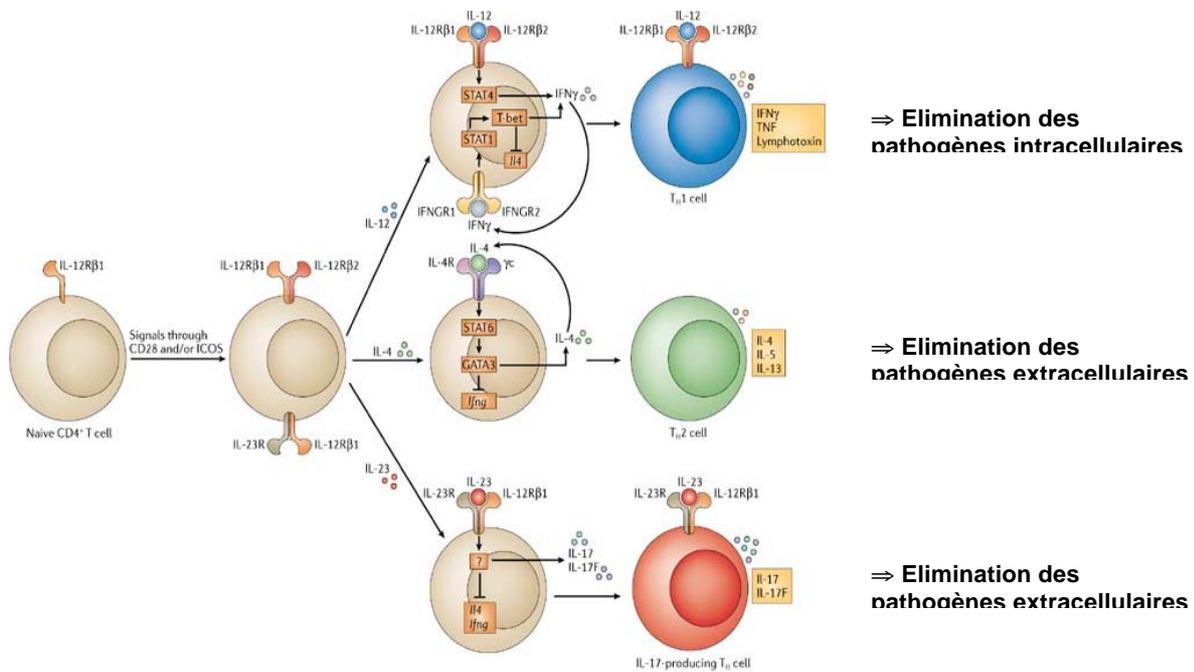
## **1 Fonctions des lymphocytes T CD4 effecteurs**

En 1986, Coffman et Mosmann montrent l'existence des LT Th1 et Th2, populations distinctes par leur sécrétion de cytokines (Mosmann, Cherwinski et al. 1986; Mosmann and Coffman 1989).

En effet, les LT Th1 produisent essentiellement de l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Cette cytokine est importante pour l'activation des macrophages et l'élimination des pathogènes intracellulaires (Szabo, Sullivan et al. 2003).

Les LT Th2 se caractérisent par la sécrétion d'IL-4, IL-5, IL-13 et IL-25. Ces cytokines sont impliquées dans la production d'immunoglobulines (Ig) E, le recrutement des éosinophiles et l'élimination des parasites intracellulaires tels que les helminthes (Ansel, Djuretic et al. 2006).

En 2005, un nouveau lignage est identifié et appelé Th17 (Harrington, Hatton et al. 2005; Park, Li et al. 2005). Ces cellules Th17 jouent des rôles critiques lors de réponses immunes contre les bactéries extracellulaires et les champignons, via leur sécrétion d'IL-17A, IL-17F et IL-22 (Weaver, Hatton et al. 2007). L'IL-17A et l'IL-17F favorisent le développement et le recrutement des neutrophiles. L'action simultanée des trois cytokines renforce la fonction de barrière des cellules épithéliales intestinales (Zheng, Danilenko et al. 2007).



Adapté de Dong et al., Nature Reviews Immunology, 2006 (Dong 2006).

**Figure 19. Les différentes sous-populations T CD4 effectrices.**

En présence d'IL-12, un LT naïf peut se différencier en LT Th1, producteurs d'IFN- $\gamma$ . Ces cellules Th1 sont particulièrement efficaces pour l'élimination des micro-organismes intracellulaires tels que les virus. La différenciation en LT Th2 requière l'IL-4. Ces cellules, caractérisées par la sécrétion d'IL-4, d'IL5 et d'IL-13, jouent un rôle primordial lors des réponses immunes contre un pathogène extracellulaire comme les helminthes. Sous l'influence de l'IL-6 ou l'IL-21 et du TGF- $\beta$ , un LT naïf devient un LT Th17. Leur production d'IL-17-A, d'IL-17-F et d'IL-22 leur confère des capacités pour éradiquer les micro-organismes extracellulaires tels que les bactéries à Gram négatif et les champignons.

En 2008, plusieurs équipes proposent l'existence d'une autre population de LT CD4 auxiliaire : les Th9 producteurs d'IL-9. L'IL-9 a au départ été décrite comme une cytokine Th2 (Saraiva, Christensen et al. 2009). En effet, sous l'influence du TGF- $\beta$ , les LT Th2 seraient capables de produire de l'IL-9 et arrêteraient leur sécrétion d'IL-4 (Schmitt, Germann et al. 1994; Dardalhon, Awasthi et al. 2008; Veldhoen, Uyttenhove et al. 2008). La sécrétion d'IL-9 est commune à différentes sous-populations T CD4 auxiliaires : les Th17 et les Tregs expriment également l'IL-9 (Lu, Lind et al. 2006; Elyaman, Bradshaw et al. 2009; Nowak, Weaver et al. 2009). Par conséquent, les cellules productrices d'IL-9 représenteraient une population mixte de lignages déjà connus telle que les Th2, les Th17 et les Tregs. Leurs fonctions physiologiques sont à ce jour méconnues.

En 2000 puis 2001, chez l'Homme, différents groupes ont décrit les LT CD4 folliculaires, appelés T<sub>FH</sub>. Cette population de LT CD4 présente un phénotype unique caractérisé par une forte expression de CXCR5. Elle est concentrée dans les amygdales dont la structure est comparable à celle des ganglions lymphatiques (Breitfeld, Ohl et al. 2000; Schaerli, Willimann et al. 2000; Kim, Rott et al. 2001). Au sein de cet organe lymphoïde secondaire, les cellules T<sub>FH</sub> représentent une importante proportion des LT CD4. Elles sont requises pour la génération et le maintien des centres germinatifs, structures dans lesquels les LB se différencient en plasmocytes, producteurs d'anticorps (Klein and Dalla-Favera 2008; Rutishauser, Martins et al. 2009). Les LT T<sub>FH</sub> jouent également un rôle lors de la maturation des LB en plasmocytes et LB mémoires (Allen, Okada et al. 2007). L'expression de la molécule de costimulation CD40 (Kim, Lim et al. 2005) et la production d'IL-4 (Yusuf, Kageyama et al. 2010) et d'IL-21 (Chtanova, Tangye et al. 2004; Nurieva, Chung et al. 2008), sont essentielles aux fonctions effectrices des T<sub>FH</sub>.

## **2 Différenciation des lymphocytes T CD4 naïfs en cellules effectrices**

Lorsqu'un LT CD4 naïf est stimulé via son TCR en présence d'IL-12 et/ou d'IFN- $\gamma$ , il se différencie en LT Th1 (Hsieh, Macatonia et al. 1993; Lighvani, Frucht et al. 2001). De façon similaire, l'IL-4 est importante pour la différenciation des LT Th2 (Le Gros, Ben-Sasson et al. 1990; Swain, Weinberg et al. 1990; Seder, Paul et al. 1992). La différenciation des Th17 dépend de la combinaison TGF- $\beta$  et IL-6 *in vitro* (Bettelli, Carrier et al. 2006; Mangan, Harrington et al. 2006; Veldhoen, Hocking et al.

2006) mais l'IL-21, une cytokine produite par les Th17, peut remplacer l'IL-6 (Korn, Bettelli et al. 2007; Nurieva, Yang et al. 2007; Zhou, Ivanov et al. 2007). Par conséquent, une des cytokines produite par chaque sous-population différenciée joue un rôle critique dans l'induction potentielle de cellules dans le même lignage effecteur. La génération de cette une boucle de rétrocontrôle positif est un important principe dans la différenciation des LT CD4. Les cytokines responsables de cette boucle sont l'IFN- $\gamma$  pour les Th1, l'IL-4 pour les Th2 et l'IL-21 pour les Th17.

La stimulation de LT CD4 naïfs, via leur TCR et en présence de TGF $\beta$  et d'IL-4, permet leur différenciation en cellules Th9 (Dardalhon, Awasthi et al. 2008; Veldhoen, Uyttenhove et al. 2008).

La différenciation des T<sub>FH</sub> s'effectuerait selon différentes étapes dépendantes de l'IL-21 et l'IL-6 (Eto, Lao et al. 2011) ainsi que de l'expression d'ICOS (Choi, Kageyama et al. 2011) et d'un TCR de haute affinité (Fazilleau, McHeyzer-Williams et al. 2009).

Une fois le stade effecteur atteint, chaque population T CD4 auxiliaire exprime préférentiellement un récepteur distinct de la famille à l'IL-1 : le récepteur à l'IL-18 pour les Th1, le récepteur à l'IL-33 pour les Th2 et le récepteur à l'IL-1 pour les Th17 (Guo, Wei et al. 2009). La stimulation des LT Th1 par l'IL-18 et l'IL-12 induit une production d'IFN- $\gamma$  indépendante du TCR (Robinson, Shibuya et al. 1997; Yang, Zhu et al. 2001; Chung, Chang et al. 2009; Guo, Wei et al. 2009). De la même façon, l'IL-33 en présence d'IL-2, de l'IL-7 ou du TLSP (trypsin-like serine protease) provoque la sécrétion d'IL-13 par les Th2 (Guo, Wei et al. 2009). L'IL-23 est nécessaire à la différenciation complète et la maintenance des Th17 (McGeachy, Chen et al. 2009). Elle n'est pas impliquée dans les stades initiaux de différenciation car les LT CD4 naïfs sont dépourvus du récepteur à l'IL-23 (Bettelli, Carrier et al. 2006; Veldhoen, Hocking et al. 2006; Korn, Bettelli et al. 2009). D'autre part, l'IL-1 associé à l'IL-6, l'IL-21 ou l'IL-23 conduit à la sécrétion d'IL-17 par les cellules Th17 (Guo, Wei et al. 2009). Cette production de cytokines effectrices par les LT CD4 différenciés est indépendante du TCR et induite par les cytokines pro-inflammatoires présentes sur le site de l'infection. Ces données suggèrent que les cellules CD4 Th fonctionnent comme des cellules effectrices « innate-like » afin d'amplifier la réponse immunitaire.

De façon intéressante, les cytokines importantes pour la différenciation vers un lignage effecteur inhibent généralement l'engagement des cellules T CD4 vers les autres lignages Th. Par exemple, l'IL-4, cytokine majeure pour la différenciation en

Th2, empêche les LT CD4 naïfs de se différencier en LT Th1 et Th17. Ce mécanisme requière principalement la surexpression du répresseur transcriptionnel Gfi-1 (growth factor independence-1) dépendante de STAT6 (Zhu, Jankovic et al. 2006; Zhu, Davidson et al. 2009). Le TGF- $\beta$  favorise le développement des Th17 (Bettelli, Carrier et al. 2006; Mangan, Harrington et al. 2006; Veldhoen, Hocking et al. 2006) tout en inhibant celui des Th1 et Th2 (Gorelik and Flavell 2000; Gorelik, Constant et al. 2002; Park, Li et al. 2005).

### **3 Les voies de signalisation spécifiques à chaque lignage Th**

Lors de l'activation des LT CD4 naïfs, la signalisation par les cytokines joue un rôle primordial dans son devenir. Les protéines STAT sont les facteurs moléculaires majeurs impliqués dans la signalisation intracellulaire induite par les cytokines. Les molécules STAT activées induisent l'expression de facteurs de transcription qui détermine le choix de lignage effecteur des LT CD4 naïfs. Cependant, l'expression d'un facteur de transcription spécifique d'un lignage Th requière absolument un signal par le TCR. Les molécules participant à la voie de signalisation intracellulaire du TCR, telles que NFAT (nuclear factor of activated T cells), NF- $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B) et AP-1 (activator protein-1) sont donc également impliquées dans cet engagement vers un lignage effecteur.

#### **3.1 Voie de signalisation Th1**

T-bet (T-cell-specific T-box transcription factor) est le facteur de transcription régulant la différenciation des cellules Th1 et la production d'IFN- $\gamma$  (Szabo, Kim et al. 2000). En effet, les souris déficientes pour T-bet présentent une diminution sévère de la production d'IFN- $\gamma$  et de la réponse à l'infection par le pathogène intracellulaire *Leishmania major* (Szabo, Sullivan et al. 2002).

La molécule STAT1 activée par l'IFN- $\gamma$  induit l'expression de T-bet lors de la différenciation *in vitro* en Th1 (Lighvani, Frucht et al. 2001; Afkarian, Sedy et al. 2002). Ainsi, la voie de signalisation IFN- $\gamma$ /STAT1/T-bet/IFN- $\gamma$  est un puissant mécanisme d'amplification pour la génération de cellules Th1 *in vitro*. De plus, l'activation de STAT4 par l'IL-12 est critique pour la mise en place d'une réponse immune de type 1 *in vitro* et *in vivo* (Kaplan, Sun et al. 1996; Thierfelder, van Deursen et al. 1996; Cai, Radzanowski et al. 2000). La voie de signalisation IL-

IL-12/STAT4 est aussi responsable de l'expression de T-bet (Usui, Nishikomori et al. 2003; Usui, Preiss et al. 2006; Yang, Ochando et al. 2007). STAT4 peut induire la production d'IFN- $\gamma$  indépendamment de T-bet. L'expression de STAT4 est supérieure dans les LT Th1 que les LT Th2 (Usui, Nishikomori et al. 2003). Cependant, l'importance relative des voies IL-12/STAT4 et IFN- $\gamma$ /STAT1 dans l'induction de l'expression de T-bet et la sécrétion d'IFN- $\gamma$  reste à déterminer *in vivo*.

### 3.2 Voie de signalisation Th2

GATA3 est le facteur de transcription signature d'une différenciation des LT CD4 naïfs en cellules Th2 (Zhang, Jones et al. 1997; Zheng and Flavell 1997; Pai, Truitt et al. 2004; Zhu, Min et al. 2004). La différenciation en Th2 est complètement inhibée *in vitro* comme *in vivo* si l'expression de GATA3 est conditionnellement abolie dans les LT CD4 périphériques (Pai, Truitt et al. 2004; Zhu, Min et al. 2004). L'activation de STAT6 par l'IL-4 est importante pour la différenciation Th2 (Kaplan, Schindler et al. 1996; Shimoda, van Deursen et al. 1996; Takeda, Tanaka et al. 1996). L'équipe d'Arai a montré qu'en l'absence de signalisation par l'IL-4, l'expression de STAT6 sous une forme constitutivement active induit l'expression de GATA3 (Kurata, Lee et al. 1999). Ces données suggèrent que la voie IL-4/STAT6 est nécessaire et suffisante pour l'expression de GATA3 *in vitro* par des cellules T CD4 activées via leur TCR (Zhu, Guo et al. 2001).

Bien qu'*in vivo*, certaines réponses immunes de type 2 requièrent l'engagement de la voie IL-4/STAT6 (Else, Finkelman et al. 1994), une différenciation de LT CD4 en cellules Th2 peut être obtenue en l'absence d'activation de STAT6 (Finkelman, Morris et al. 2000; Jankovic, Kullberg et al. 2000; Min, Prout et al. 2004; Voehringer, Shinkai et al. 2004; van Panhuys, Tang et al. 2008). La mise en place de la réponse immune de type 2 contre *Nippostrongylus brasiliensis* requière l'expression de GATA3 indépendamment de la voie IL-4/STAT6. Deux hypothèses ont été émises : l'existence d'une autre voie responsable de l'augmentation de l'expression de GATA3 ou l'induction du phénotype Th2 seulement par une expression basale de GATA3 dans ces circonstances. En effet, l'expression basale de GATA3 et d'une forme constitutivement active de STAT5 est suffisante pour induire la production d'IL-4 (Zhu, Cote-Sierra et al. 2003). Bien que l'activation de STAT5 n'affecte pas

l'expression initiale de GATA3, elle est requise pour sa maintenance au sein des cellules Th2 différenciées (Guo, Wei et al. 2009).

De façon intéressante, la stimulation de LT CD4 naïfs par de faibles doses d'antigènes induit une expression de GATA3 dépendante du signal transmis par le TCR mais indépendant de l'IL-4 (Yamane, Zhu et al. 2005). Cependant, le mécanisme moléculaire impliqué reste inconnu.

GATA3 peut aussi induire sa propre expression lorsqu'il atteint un certain seuil d'expression (Ouyang, Lohning et al. 2000). Dec2 (differentially expressed in chondrocytes 2) est un autre facteur de transcription possédant un site de liaison au promoteur de GATA3 (Yang, Angkasekwini et al. 2009). Les facteurs GATA3 et Dec2 peuvent établir une boucle de régulation positive de différenciation en Th2.

### 3.3 Voie de signalisation Th17

ROR $\gamma$ t (Retininoic acid-related orphan receptor  $\gamma$ t) est le facteur de transcription nécessaire à la différenciation des cellules Th17 (Ivanov, McKenzie et al. 2006). En effet, les souris déficientes pour ROR $\gamma$ t produisent des quantités diminuées d'IL-17. Le cocktail de cytokines TGF- $\beta$  et IL-6 induit l'expression de ROR $\gamma$ t dans des LT CD4 naïfs activés via leur TCR. L'IL-6, l'IL-21 et l'IL-23, trois cytokines activatrices de STAT3, jouent des rôles critiques dans la différenciation, l'amplification et la maintenance des Th17 (Bettelli, Carrier et al. 2006; Mangan, Harrington et al. 2006; Veldhoen, Hocking et al. 2006; Harris, Grosso et al. 2007; Korn, Bettelli et al. 2007; Mathur, Chang et al. 2007; Nurieva, Yang et al. 2007; Yang, Panopoulos et al. 2007; Zhou, Ivanov et al. 2007; Milner, Brenchley et al. 2008). Le travail de l'équipe d'O'Shea a montré que STAT3 est requis pour l'induction de ROR $\gamma$ t. Il se lie directement au gène *rorc* (Durant, Watford et al. 2010). Les facteurs de transcription BATF et Runx1 sont requis pour l'induction et l'expression optimale de ROR $\gamma$ t, respectivement (Fontenot, Gavin et al. 2003; Zhang, Meng et al. 2008). Cependant, la signalisation transmise par le TCR et les cytokines régulant l'expression et/ou l'activation de BATF (basic leucine zipper transcription factor, ATF-like) et Runx1 lors de la différenciation Th17 reste à déterminer.

### 3.4 Voie de signalisation T<sub>FH</sub>

Le facteur de transcription propre à ce lignage est Bcl6 (B-cell leukemia/lymphoma 6). En effet, une relation causale entre l'expression de Bcl6 et la différenciation des cellules en T<sub>FH</sub> a été démontrée (Johnston, Poholek et al. 2009; Nurieva, Chung et al. 2009; Yu, Rao et al. 2009). En plus de Bcl6, les facteurs de transcription c-maf (c-musculoaponeurotic fibrosarcoma) (Bauquet, Jin et al. 2009), STAT3 (Nurieva, Chung et al. 2008), BATF (Betz, Jordan-Williams et al. 2010) et IRF4 (Kwon, Thierry-Mieg et al. 2009) sont requis pour l'engagement dans le lignage effecteur T<sub>FH</sub>. Dans une revue récente, le Dr Crotty propose un modèle de différenciation des T<sub>FH</sub>. Il se diviserait en plusieurs étapes et serait multifactorielle.

### 3.5 Inter-régulation entre facteurs de transcription de chaque lignage

L'engagement dans un lignage de différenciation Th1, Th2 ou Th17 inhibe l'engagement dans les autres lignages Th. Cette suppression est principalement obtenue par l'inter-régulation entre les facteurs de transcription caractéristiques des différents lignages. Par exemple, une surexpression de T-bet inhibe l'expression de GATA3 (Usui, Preiss et al. 2006). Au contraire, en l'absence de T-bet, l'expression de GATA3 et d'IL-4 est augmentée même en présence d'un environnement pro-Th1. En conditions normales, T-bet réprimerait la différenciation en cellules Th2 (Yagi, Junttila et al. 2010). De même, des LT CD4 déficients pour T-bet stimulées en conditions Th1 produisent de l'IL-17 (Pearce, Mullen et al. 2003). T-bet inhibe l'expression de ROR $\gamma$ t (Mukasa, Balasubramani et al. 2010). Ainsi, T-bet inhibe la différenciation en Th17. D'autre part, GATA3 réprime la différenciation en cellules Th1 (Yagi, Junttila et al. 2010) et Th2 (Usui, Nishikomori et al. 2003). Il est à ce jour inconnu si ROR $\gamma$ t est capable de réguler la différenciation des LT CD4 en LT Th1 ou Th2. Mais des données chez l'Homme suggèrent que l'activation de STAT3 inhiberait la différenciation en Th2 (Minegishi, Saito et al. 2007; Milner, Brenchley et al. 2008).

## ***V L'intestin : un organe paradoxal d'un point de vu***

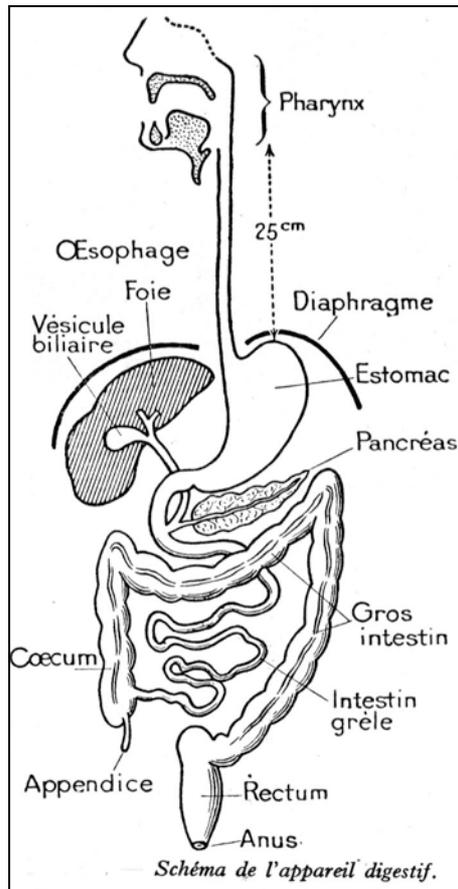
### ***immunologique***

Les muqueuses de l'organisme telles que la peau ou les intestins sont en contact direct avec l'environnement extérieur. Ils sont susceptibles d'être colonisées

par des virus, bactéries, parasites ou champignons potentiellement dangereux. Pour combattre ces micro-organismes, les mammifères ont évolué en élaborant des GALT qui sont enrichis en cellules du système immunitaire inné et acquis. Cependant, les muqueuses sont aussi composées de micro-organismes inoffensifs commensaux, appelés flore commensale. Face à cette constante stimulation antigénique par les antigènes alimentaires et environnementaux, le maintien d'une balance entre tolérance et immunité représente un défi important de régulation pour le système immunitaire au niveau des muqueuses. Il est particulièrement remarquable au niveau du tractus intestinal qui représente la plus vaste muqueuse de l'organisme. Lieu de résidence d'environ  $10^{14}$  bactéries commensales, il constitue l'habitat le plus dense de l'organisme pour les micro-organismes (Ley, Peterson et al. 2006).

La flore commensale intestinale est nécessaire au bon développement du système immunitaire intestinal, apporte des nutriments et module le métabolisme énergétique (Backhed, Ley et al. 2005). Elle se met en place à la naissance mais évolue rapidement lors des premières années de vie. Chez l'adulte, la flore intestinale est propre à chaque personne. Elle est stable dans le temps hormis quelques fluctuations en réponse à des facteurs environnementaux et de développement (Wu, Estrada et al. 2005; Eckburg and Relman 2007; Turnbaugh, Hamady et al. 2009).

Ce chapitre décrit brièvement l'anatomie de l'intestin puis s'intéresse particulièrement au système immunitaire présent dans cet organe.



D'après <http://environnement.ecole.free.fr>

**Figure 20. Anatomie de l'appareil digestif.**

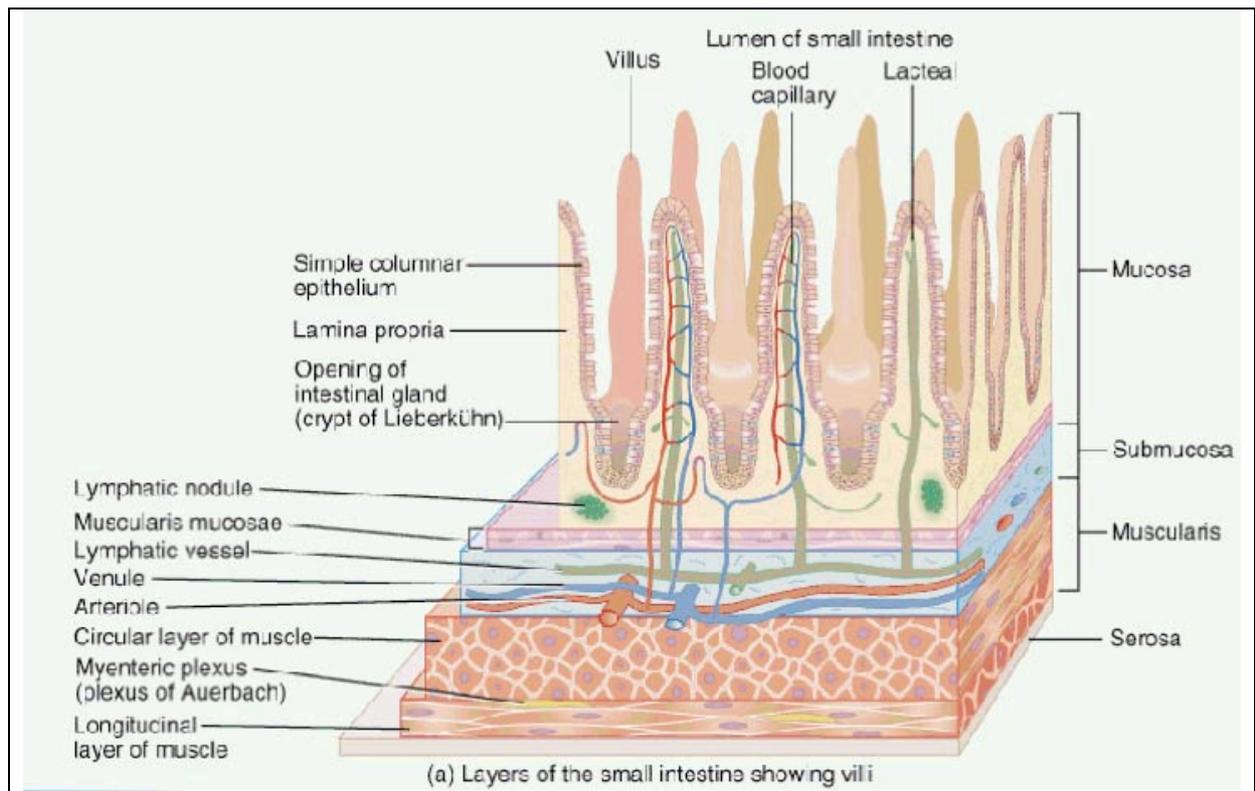
Le tractus digestif est constitué depuis la bouche de l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon), le côlon (cæcum, appendice, côlon ascendant, transverse, descendant et sigmoïde), le rectum, et enfin l'anus.

## 1 Anatomie de l'intestin

Sur le plan anatomique, le tube digestif comporte successivement l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon), le côlon (cæcum, appendice, côlon ascendant, transverse, descendant et sigmoïde), le rectum, et enfin l'anus (Figure 20). Nous restreindrons notre étude à l'intestin grêle, au côlon et au rectum.

Ces parties du tube digestif sont constituées de couches concentriques qui sont à partir de la lumière : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse puis la tunique externe (Figure 21). La muqueuse comporte un épithélium de revêtement et un tissu conjonctif sous-jacent, la *lamina propria*. La *lamina propria* contient du tissu lymphoïde diffus et des follicules lymphoïdes. Selon la localisation, elle renferme des glandes exocrines. Elle est riche en vaisseaux sanguins ce qui lui confèrent des rôles d'absorption, de sécrétion et de défense. La musculuse est organisée en deux couches de tissu musculaire lisse, circulaire interne et longitudinale externe. Entre ces deux couches se situe le plexus nerveux d'Auerbach (ou « plexus myentérique d'Auerbach »). La sous-muqueuse est constituée de tissu conjonctif où se trouvent des vaisseaux sanguins et lymphatiques, site d'absorption des nutriments et des lipides. Entre la musculuse et la sous-muqueuse se trouve le plexus nerveux de Meissner (ou « plexus sous-muqueux de Meissner »).

L'intestin grêle joue le rôle majeur de la fonction d'absorption. L'épithélium de revêtement intestinal est un épithélium prismatique simple. Il est constitué de plusieurs types cellulaires dont les entérocytes, les cellules caliciformes, les cellules neuroendocrines. Les fonctions du côlon sont la déshydratation du bol alimentaire (absorption de l'eau et des électrolytes), la digestion terminale de la cellulose par la flore intestinale et l'évacuation des déchets alimentaires. La muqueuse du côlon comporte un épithélium de revêtement constitué majoritairement de cellules caliciformes qui s'invagine dans la muqueuse en cryptes de Lieberkühn. Contrairement à l'intestin grêle, il est dépourvu de villosité et de cellules de Paneth. Peu d'entérocytes y sont présents. Sa *lamina propria* est particulièrement riche en tissus lymphoïdes.



Extrait de  
[http://faculty.southwest.tn.edu/jwilliams/models\\_of\\_the\\_digestive\\_system.htm](http://faculty.southwest.tn.edu/jwilliams/models_of_the_digestive_system.htm).

**Figure 21. Représentation schématique de la paroi de l'intestin grêle.**

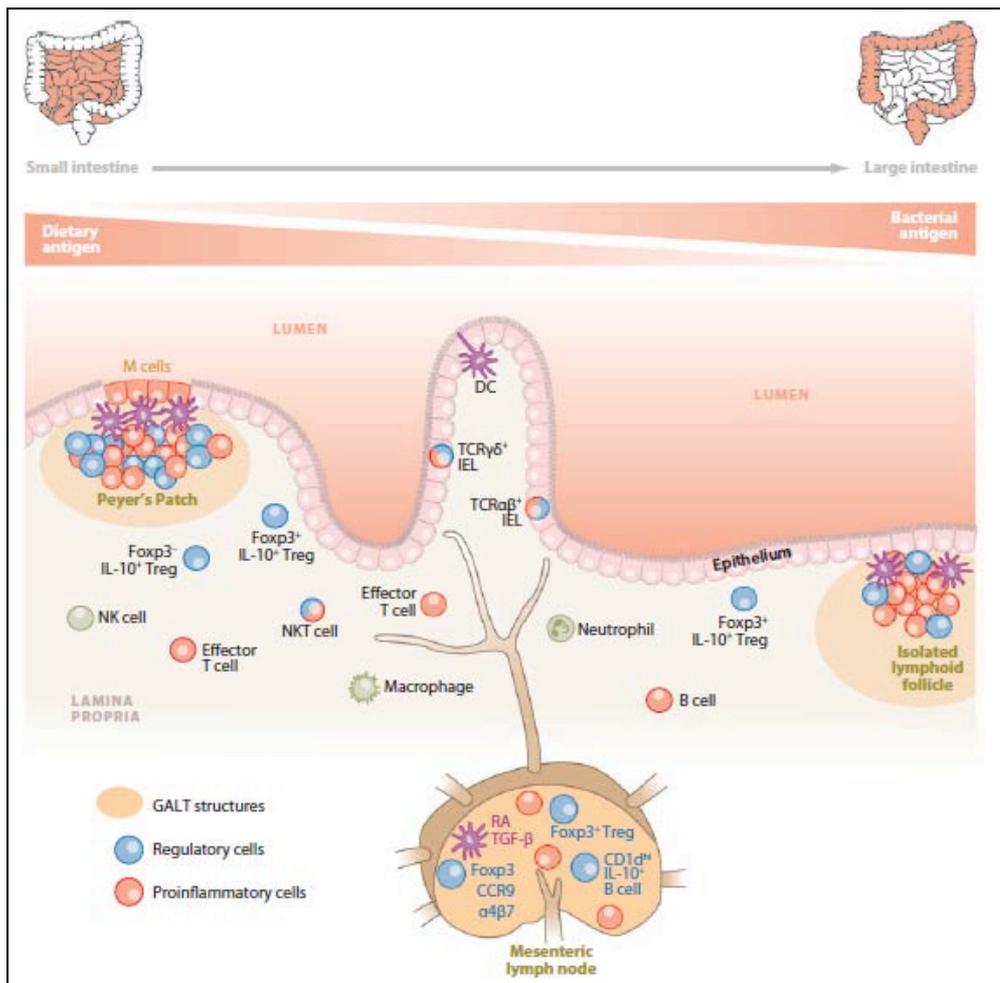
La paroi de l'intestin est composée de quatre couches : la muqueuse (ou *mucosa*), la sous-muqueuse (ou *submmucosa*), la musculueuse (ou *muscularis*) et la tunique externe (ou *serosa*). La *lamina propria* fait partie de la muqueuse.

## **2 Les tissus lymphoïdes associés aux intestins**

Les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (mucosa-associated lymphoid tissue, MALT) sont des organes lymphoïdes secondaires. Ils se situent de manière diffuse dans l'organisme (tube digestif, poumons, peau...) et toujours sous l'épithélium de la muqueuse. Ces MALT sont histologiquement et fonctionnellement proches des follicules trouvés dans les ganglions, ils contiennent des LB et LT auxiliaires. Au niveau du tube digestif, ce sont la *lamina propria* de l'intestin grêle et les GALT. Ces derniers sont composés des amygdales, de l'appendice iléocæcale, des plaques de Peyer, des follicules lymphoïdes isolés et des mLN. Les GALT contiennent à eux seuls plus de cellules immunitaires que tout le reste de l'organisme (Figure 22). Les plaques de Peyer comportent trois zones : l'épithélium de surface qui renferme des cellules particulières, les cellules « M » immunologiques ou mirofold, intercalées entre les entérocytes et spécialisées dans le transport des antigènes ; des follicules lymphoïdes dont la morphologie est identique à celle des ganglions ; et, au dessus des follicules, le dôme qui contient des LB, des LT Th2 et des macrophages. La réponse immune débute au niveau des follicules lymphoïdes et se terminent dans les mLN.

## **3 Les cellules épithéliales intestinales : la première barrière**

La muqueuse intestinale est délimitée par une monocouche de cellules épithéliales intestinales (IEC), principalement des entérocytes, constituant une barrière biologique entre la lumière intestinale et le tissu conjonctif de l'hôte. Pour assurer cette fonction, elle est dotée de plusieurs adaptations physiques. Des jonctions cellulaires serrées empêchent un passage paracellulaire et des extensions microvillaires riches en actine forment une bordure en brosse sur la face apicale des cellules qui prévient l'adhésion et la pénétration des micro-organismes (Shen and Turner 2006). Cette barrière physique est renforcée par d'autres moyens de défense grâce à des cellules spécialisées : les cellules caliciformes (ou à gobelet) et les cellules de Paneth. Les cellules caliciformes régulent la production de mucus et des facteurs qui contribuent à l'homéostasie des IEC (Taupin and Podolsky 2003; McVay, Keilbaugh et al. 2006). Le mucus sécrété recouvre l'épithélium intestinal et ainsi limite les contacts entre la flore commensale et les entérocytes (Sansone 2004). Les cellules de Paneth sécrètent des peptides présentant des propriétés anti-



Extrait de Izcue et al., *Annual Review of Immunology*, 2009 (Izcue, Coombes et al. 2009).

### Figure 22. Les GALT.

Les GALT sont les tissus lymphoïdes où ont lieu les réponses immunes intestinales. Ce terme regroupe les plaques de Peyer, les follicules lymphoïdes isolés et les mLN (ainsi que les amygdales et l'appendice iléocœcale non représentées sur ce schéma). Ils sont composés de diverses populations du système immunitaire innée et adaptatif.

- IEL : intraepithelial lymphocytes,
- NKT : natural killer T cell,
- DC : dendritic cell,
- Treg : regulatory T cell.

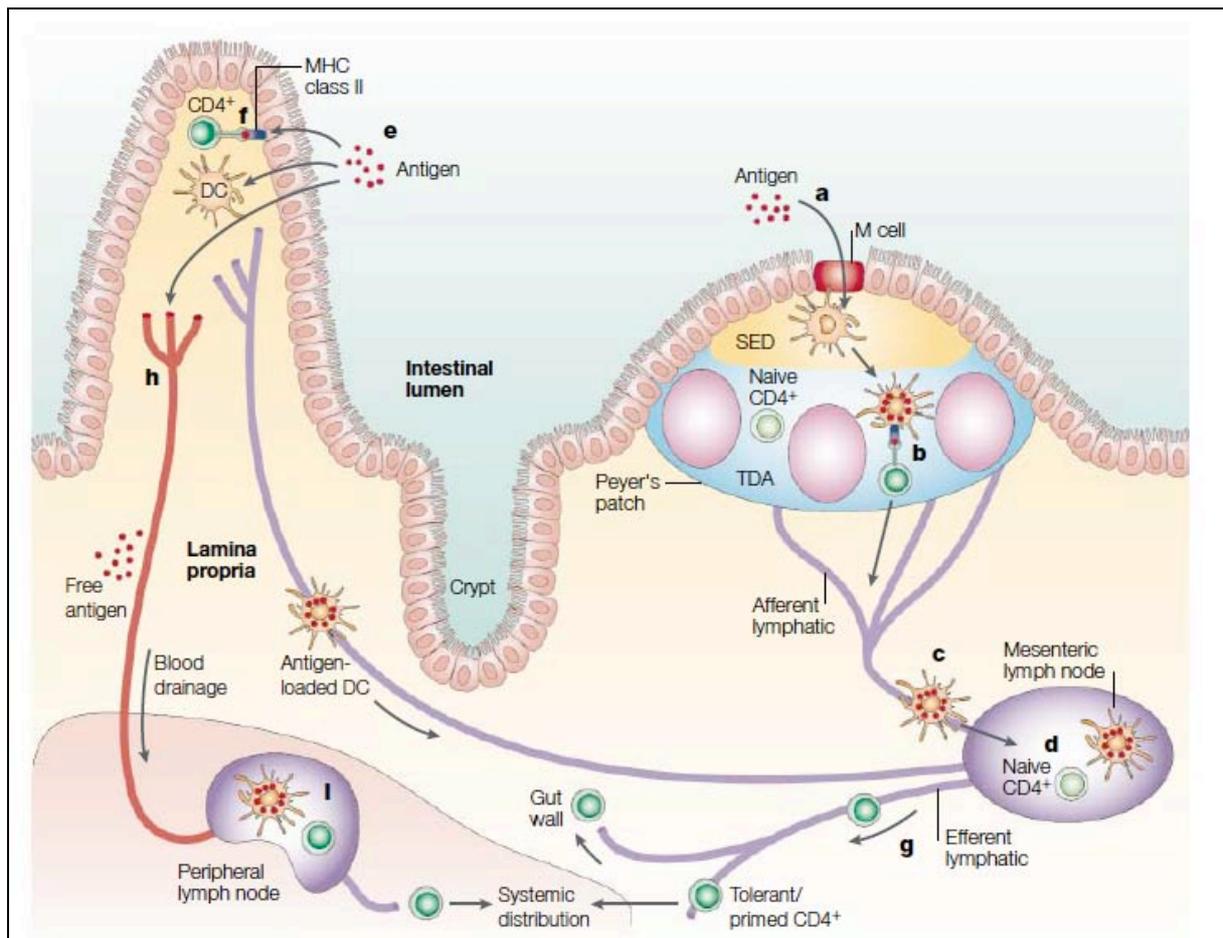
microbiennes grâce à leur richesse en résidus hydrophobiques et basiques tels que les défensines, les cathélicidines et calprotectines (Ganz 2003; Salzman, Ghosh et al. 2003). Un autre mécanisme de défense mis au point par les IEC est la sécrétion chlorée qui prévient l'adhérence des micro-organismes aux IEC (Resnick, Colgan et al. 1993; Strohmeier, Lencer et al. 1997). Ainsi, en plus de permettre la digestion et l'adsorption de nutriments, les entérocytes sont essentiels à l'établissement d'une barrière empêchant l'entrée de bactéries commensales et pathogènes dans la *lamina propria* sous-jacente.

Compte tenu du risque d'invasion par les micro-organismes de la flore intestinale, un réseau complexe constitué par les cellules du système immunitaire inné et acquis existe au sein de la muqueuse intestinale. Il doit être sophistiqué afin de contrôler de façon fine l'intégrité de la barrière épithéliale et de la muqueuse intestinale.

## **4 Le système immunitaire intestinal**

### **4.1 Le système immunitaire inné**

En plus de la barrière physique et biochimique formée par les différentes IEC, des cellules du système immunitaire inné sont présentes dans la lamina propria afin de mettre en place une réponse immunitaire rapide et efficace en cas d'invasion par des antigènes issus de la lumière intestinale. En conditions non inflammatoires, les cellules « M » et les DC échantillonnent continuellement le contenu de la lumière intestinale (Rescigno, Urbano et al. 2001). Des macrophages, mastocytes et éosinophiles sont présents dans la lamina propria (MacDonald 2003). En absence d'infection, les DC peuvent rester quiescentes au niveau de la lamina propria. Elles peuvent également capturer des antigènes de la lumière intestinale puis migrer dans les GALT où elles vont rendre tolérants les LT spécifiques des ces antigènes (Figure 23) (Rescigno, Urbano et al. 2001; Mowat 2003; Coombes and Powrie 2008). Dans ces conditions, ces cellules favorisent donc l'état de tolérance intestinale. Par contre, si des antigènes franchissent l'épithélium intestinal, les DC vont s'activer et permettre le recrutement rapide de macrophages et neutrophiles (Sansonetti 2004). Ces cellules vont éliminer les pathogènes grâce à la phagocytose, à leur action antimicrobienne et à leur production de cytokines et de chimiokines. Cette sécrétion de molécules pro-inflammatoires favorisent la lyse des pathogènes, recrutent d'autres



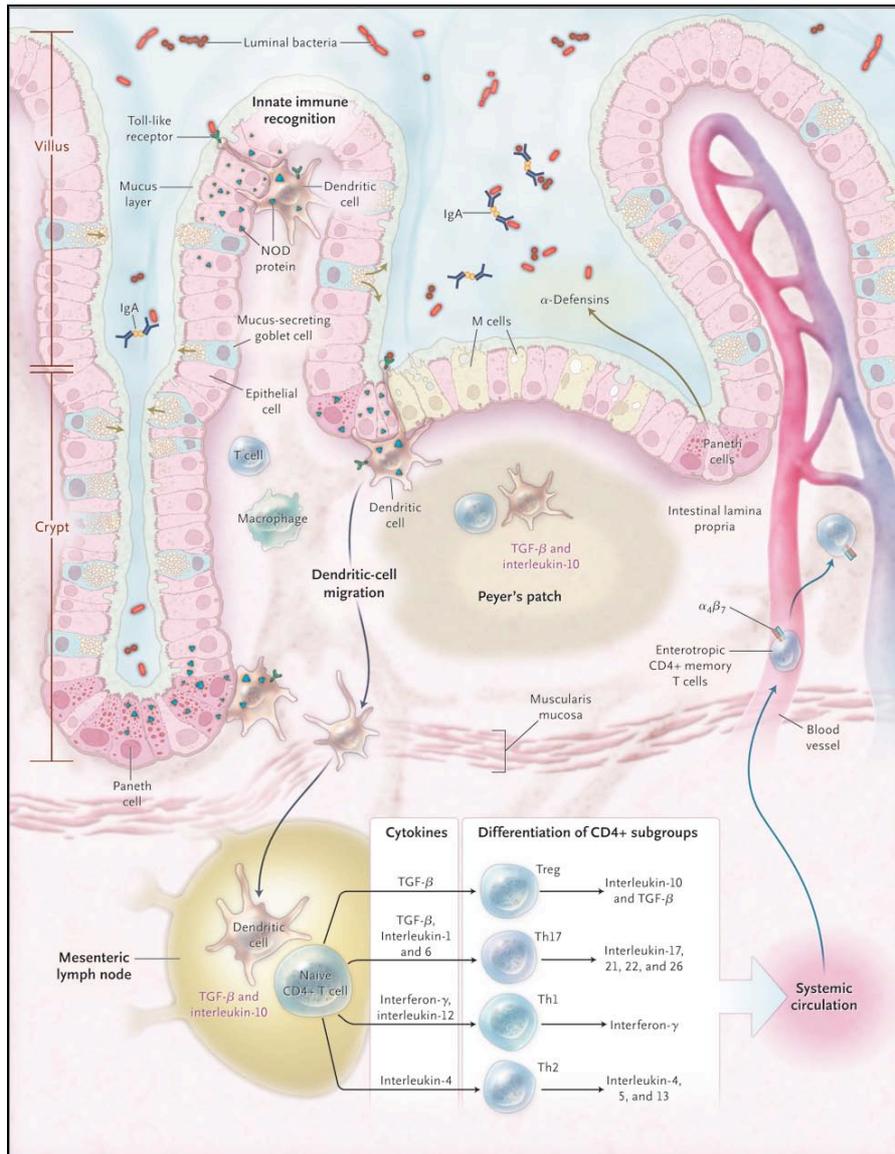
Extrait de Mcl Mowat et al., *Nature Reviews Immunology*, 2003 (Mowat 2003).

**Figure 23. Capture de l'antigène au sein des GALT.**

(a) Au niveau des GALT, la capture de l'antigène peut être effectuée par les cellules « M » ou les DC. Les cellules « M » se localisent dans l'épithélium intestinal, elles sont donc en contact direct avec le contenu de la lumière intestinale. Les DC émettent des extensions cytoplasmiques afin de traverser l'épithélium intestinal et capturer des antigènes intraluminaux. (b) Les DC ainsi chargées en ligands peuvent activer ou rendre tolérants des LT dans les PP ou la lamina propria. (c-d) Elles peuvent également migrer jusqu'aux mLN pour effectuer ces mêmes actions. (e-h-i) Les DC chargées d'antigènes intraluminaux peuvent également rejoindre des LN périphériques par la voie sanguine.

cellules du système immunitaire inné et signalent le danger. D'autre part, les DC activées migrent jusqu'aux mLN où elles vont activer les LT spécifiques du micro-organisme (Figure 24). Les macrophages intestinaux sont ensuite requis lors de la phase de résolution de l'infection. Ils participent au nettoyage du site inflammatoire. De plus, ils contribuent à l'homéostasie intestinale. En conditions physiologiques, les macrophages sont dépourvus de la molécule TREM-1 (triggering receptor expressed on myeloid cells 1) (Bouchon, Dietrich et al. 2000). Une stimulation via ce récepteur induit la production de cytokines pro-inflammatoires (Schenk, Bouchon et al. 2007). De ce fait, en réponse aux bactéries entériques commensales, ils produisent de l'IL-10 ce qui favorise un état de tolérance (Kamada, Hisamatsu et al. 2005). De plus, les macrophages intestinaux chez l'Homme répondent peu en terme de sécrétion de cytokines aux stimuli bactériens mais sont capables de phagocyter et digérer les bactéries (Smythies, Sellers et al. 2005).

Au niveau moléculaire, les cellules du système immunitaire inné ainsi que les IEC expriment des récepteurs reconnaissant les motifs microbiens tels que les Toll-Like Receptor (TLR) et les récepteurs NOD1/2 (nucleotide-binding oligomerization domain containing 1/2). Ces cellules sont aptes à maintenir l'homéostasie intestinale et contrôler une invasion bactérienne (Inohara and Nunez 2003; Abreu 2010). Les souris déficientes pour NOD2 produisent moins de défensines- $\alpha$  et sont plus susceptibles à une infection par certaines bactéries commensales (Kobayashi, Chamillard et al. 2005).



Extrait de Abraham et al., *New England Journal of Medicine*, 2009 (Abraham and Cho 2009).

**Figure 24. La réponse immune physiologique au niveau des intestins.**

Après capture de l'antigène dans la lumière intestinale, les DC agissent au niveau des plaques de Peyer ou des mLN qu'elles rejoignent par la voie lymphatique. Au sein de ces GALT, elles orchestrent la différenciation des LT CD4 naïfs spécifiques de ce ligand en LT Th1, Th2, Th17 ou Treg. Les LT effecteurs exprimant les récepteurs de domiciliation entérotopiques (CCR9, l'intégrine  $\alpha_4\beta_7$ ) gagnent, par la voie sanguine, la lamina propria où ils exerceront leur fonction.

#### 4.2 Le système immunitaire adaptatif

En conditions physiologiques, la *lamina propria* des intestins est également constituée de cellules du système immunitaire adaptatif telles que les LB, les LT CD4 et les LT CD8 $\alpha\alpha$  dits « innés ». Les LT intraépithéliaux (IEL), population spécifique de l'intestin, se localisent au niveau de l'épithélium intestinal.

Les LB sont principalement différenciés en plasmocytes sécréteurs d'IgA, les autres sous-classes d'Ig étant largement sous-représentées (Fagarasan and Honjo 2003). Ces IgA sécrétoires traversent l'épithélium intestinal et se lient à des antigènes intraluminaux (substances étrangères antigéniques, toxines, micro-organismes), limitant ainsi localement leur adhésion à la surface épithéliale intestinale et empêchant leur pénétration à travers l'épithélium (Macpherson, Gatto et al. 2000; Macpherson and Uhr 2004; Suzuki, Meek et al. 2004). Ces Ig renforcent la barrière passive constituée du mucus et des peptides anti-microbiens, à la surface de l'épithélium intestinal.

Les cellules Th17 sont enrichies au niveau de la *lamina propria* intestinale par rapport aux autres tissus (Atarashi, Nishimura et al. 2008; Ivanov, Frutos Rde et al. 2008; Zaph, Du et al. 2008). Mais le rôle de la flore commensale dans la différenciation de ces cellules est controversé (Atarashi, Nishimura et al. 2008; Zaph, Du et al. 2008).

Les IEL sont des populations T très hétérogènes (Cheroutre, Lambolez et al. 2011). En effet, ils regroupent des LT  $\gamma\delta$  et  $\alpha\beta$ . Les LT  $\alpha\beta$  sont CD8<sup>+</sup> et peuvent être divisés en différentes sous classes selon l'expression des molécules CD2, CD5 et CD28. La distribution des sous-populations d'IEL varie dans la muqueuse de l'intestin grêle et du colon. Leur principale fonction est de réguler la constante régénération des IEC par leur sécrétion de facteurs de croissance et d'aider à maintenir la fonction de barrière des IEC en restreignant la transmigration des micro-organismes présents dans la lumière intestinale (Dalton, Cruickshank et al. 2006).

#### 4.3 Rôle de la flore intestinale

Un mutualisme existe entre la flore commensale et l'épithélium intestinal pour maintenir son intégrité. Par exemple, la reconnaissance des ligands des TLR2 et TLR9 par les IEC augmente la fonction de barrière de l'épithélium intestinal (Madsen,

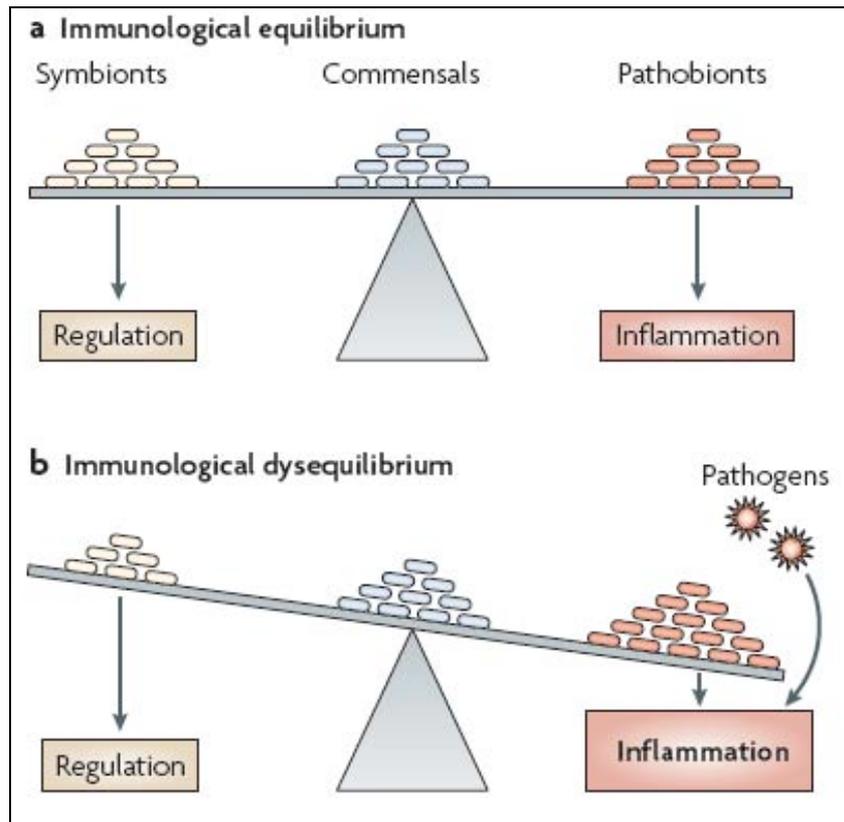
Cornish et al. 2001; Cario 2005). De plus, la flore commensale elle-même exerce des fonctions anti-inflammatoires (Neish, Gewirtz et al. 2000; Kojima, Musch et al. 2003).

La flore intestinale est régulée par le système immunitaire de l'hôte et en retour, le microbiote intestinal module activement les réponses immunes adaptatives de l'hôte. Les bactéries symbiotiques sont utiles à l'hôte en extrayant les nutriments des aliments, en empêchant la colonisation de la lumière intestinale par des micro-organismes pathogènes et en contribuant au développement de l'architecture intestinale (Hooper and Gordon 2001).

L'influence de la flore intestinale sur les aspects développementaux des réponses immunes adaptatives a été analysée chez les animaux élevés dans un environnement exempt de pathogènes. Ils présentent des défauts de maturation des GALT et des réponses humorales exacerbées (Klaasen, Van der Heijden et al. 1993; Umesaki, Okada et al. 1995; Round and Mazmanian 2009). Ces études montrent l'importance de la flore commensale intestinale pour le développement et l'homéostasie du système immunitaire au niveau des GALT.

De plus, la flore intestinale influence la réponse effectrice Th17 (Gaboriau-Routhiau, Rakotobe et al. 2009; Ivanov, Atarashi et al. 2009) mais aussi celle des Treg (Cong, Weaver et al. 2002; Maynard, Harrington et al. 2007).

L'abondante flore intestinale et sa proximité avec les cellules composant les GALT représentent un véritable challenge immunologique. Les premiers travaux étudiant cette cohabitation surprenante ont proposé que le système immunitaire intestinal est tolérant aux antigènes des bactéries commensales. Cette tolérance est rompue lors de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) (Duchmann, Kaiser et al. 1995) (Figure 25). Les mécanismes mis en place pour maintenir l'homéostasie intestinale sont l'ignorance, et la génération d'un environnement tolérant à la flore intestinale. Le chapitre suivant aborde ces aspects.



Extrait de Round et al., *Nature Reviews Immunology*, 2009 (Round and Mazmanian 2009).

**Figure 25. Balance entre les micro-organismes constituant la flore intestinale symbiotique et les micro-organismes pathogènes.**

La flore intestinale est composée de micro-organismes commensaux qui sont ni bénéfiques, ni néfastes pour l'organisme. Par contre, l'organisme a besoin des micro-organismes symbiotiques pour divers processus biologiques (digestion des aliments, synthèse de vitamines...). Ils protègent également la muqueuse intestinale de l'invasion par des pathogènes. En effet, en conditions physiologiques, un équilibre existe entre les micro-organismes symbiotiques et pathogènes. La rupture de cet équilibre résulte en une inflammation intestinale qui peut favoriser le développement de MICI chez les personnes génétiquement prédisposées.

## 5 Mécanismes de tolérance intestinale

### 5.1 L'ignorance intestinale

L'existence d'une séparation physique entre la flore intestinale et les GALT suggère l'existence d'un phénomène d'ignorance immunologique. L'équipe de MacPherson a remarqué l'absence d'Ig dirigées contre *Enterobacter cloacae*, une souche bactérienne commensale dominante chez des souris normales (Macpherson, Gatto et al. 2000). Par contre, suite à l'injection d'un inoculum de ces organismes vivants, ces mêmes souris produisent des IgG spécifiques. Ces données suggèrent l'existence d'un état d'ignorance par séquestration des antigènes dans la lumière intestinale, plutôt que de tolérance envers la flore microbienne intestinale (Konrad, Cong et al. 2006; Cong, Feng et al. 2009). Cependant, le rôle des Treg dans la maintenance de l'homéostasie intestinale est incontestable.

### 5.2 Mécanismes actifs de tolérance

#### Les différentes populations de Treg

Différentes populations de Treg ont été décrites au niveau de l'intestin : les Treg naturels (nTreg) et induits (iTreg) exprimant Foxp3, et les Tr1 producteurs d'IL10. Ces populations présenteraient des fonctions non redondantes. Les souris déficientes pour Foxp3 développent une inflammation multi-organe létale. L'intestin est particulièrement affecté. Cette inflammation peut être contrôlée par le transfert de Treg issus d'une souris sauvages (Fontenot, Gavin et al. 2003). Les souris dont les LT sont déficients pour l'IL-10 ou le TGF- $\beta$  développent spontanément une colite (Roers, Siewe et al. 2004; Li, Wan et al. 2007; Rubtsov, Rasmussen et al. 2008).

Bien que les nTreg et les iTreg présentent des profils transcriptionnels différents (Hill, Feuerer et al. 2007; Wei, Wei et al. 2009), ils sont indistinguables au niveau cellulaire dû à l'absence de marqueurs phénotypiques membranaires. Ainsi, l'étude de la contribution des iTreg dans le contrôle de l'homéostasie intestinale est difficile. Un modèle consiste à transférer des LT CD4 CD45RB<sup>high</sup> Foxp3<sup>-</sup> dans des souris Rag2<sup>-/-</sup>. Les cellules naïves transférées se différencient peu en cellules exprimant Foxp3 mais plutôt en cellules effectrices naïves Th1 et Th17 (Powrie, Correa-Oliveira et al. 1994; Leppkes, Becker et al. 2009). Cependant, en absence d'inflammation (souris receveuses déficientes pour Rag2 et IL23p19), les cellules transférées

expriment préférentiellement Foxp3 et migrent dans la lamina propria du côlon et les mLN (Izcue, Hue et al. 2008). Ces iTreg sont fonctionnels et contribuent à la protection de la colite. En effet, des LT CD4 CD45RB<sup>high</sup> déficients pour Foxp3 transférés chez ces mêmes hôtes induisent une colite. En conditions non inflammatoires, les mLN et GALT seraient des sites privilégiés ou « niches » préférentielles pour la génération de Treg périphériques (Lathrop, Santacruz et al. 2008; Barnes, Krebs et al. 2009; Medoff, Sandall et al. 2009; Molinero, Yang et al. 2009). Ces iTreg collaboreraient avec les nTreg, présents en plus grande proportion, au maintien de l'homéostasie intestinale. Plusieurs travaux suggèrent fortement que les antigènes intestinaux, tels que des antigènes du soi dérivés des cellules de l'intestin ou des antigènes exogènes issus de la lumière intestinale, façonneraient le pool de Treg intestinaux (Chen, Kuchroo et al. 1994; Lathrop, Santacruz et al. 2008). De plus, l'induction de tolérance orale est efficace pour la différenciation d'iTreg en particulier au niveau des GALT (Coombes, Siddiqui et al. 2007; Sun, Hall et al. 2007). Ces iTreg sont ensuite fonctionnels dans l'intestin et au niveau systémique (Curotto de Lafaille and Lafaille 2009). Des mécanismes différents de suppression ont été mis en évidence selon l'origine de l'antigène : l'alimentation ou la flore intestinale. L'IL-10 est indispensable seulement dans le second cas (Fowler and Powrie 2002).

### Rôle de l'IL-10

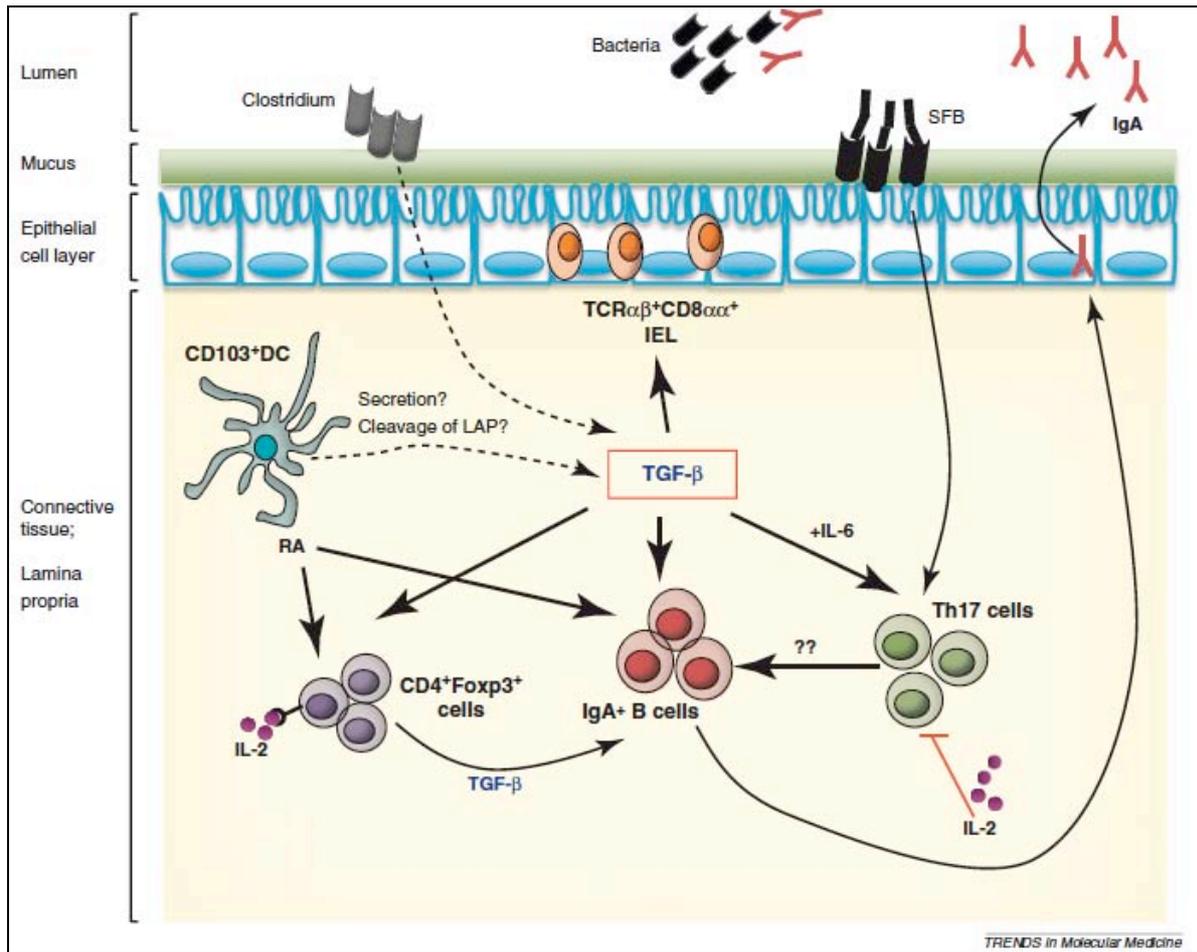
L'IL-10 est requise pour la protection contre certaines bactéries intestinales, elles-mêmes inductrices de la sécrétion d'IL-10 (Kullberg, Ward et al. 1998; Stepankova, Powrie et al. 2007; Mazmanian, Round et al. 2008). La composition et la densité de la flore commensale intestinale varient énormément tout le long du tube digestif, les besoins en IL-10 varieraient de façon similaire. L'IL-10 est une cytokine immunosuppressive exprimée par les Treg Foxp3<sup>+</sup>. Tandis que les Treg exprimant Foxp3 constituent une population régulatrice constamment présente, l'IL-10 agit comme un facteur inductible d'immunorégulation entrant en action au moment et à l'endroit où il y a inflammation. La sécrétion d'IL-10 par les Treg est importante pour l'homéostasie intestinale (Kamanaka, Kim et al. 2006; Maynard, Harrington et al. 2007). Mais d'autres cellules T CD4, telles que les Tr1, y participent de façon non redondante en produisant cette cytokine immunosuppressive (Vieira, Christensen et al. 2004; Maynard, Harrington et al. 2007; Rubtsov, Rasmussen et al. 2008). Ces

travaux montrent aussi que la répartition des Treg Foxp3<sup>+</sup> et des Tr1 est différente suggérant que le tractus intestinal présente des microenvironnements immunologiquement distincts.

### Rôle du TGF- $\beta$

Le TGF- $\beta$  est aussi une cytokine immunosuppressive importante pour le maintien et les fonctions effectrices des Treg et des Tr1 (Chen, Kuchroo et al. 1994; Powrie, Carlino et al. 1996; Marie, Letterio et al. 2005; Li, Sanjabi et al. 2006; Maynard, Harrington et al. 2007). Les Treg constituent une source de TGF- $\beta$  mais elle serait peu impliquée dans le contrôle du développement de la colite. Des données suggèrent fortement que les Tr1 et d'autres populations cellulaires non suppressives, productrices de TGF- $\beta$ , contribueraient au maintien de l'homéostasie intestinale (Maynard, Harrington et al. 2007). Les intestins présentent une forte concentration de TGF- $\beta$  mais sous forme inactive. Les intégrines  $\alpha_v\beta_6$  et  $\alpha_v\beta_8$ , exprimées respectivement par les cellules épithéliales intestinales et les DC, jouent un rôle clé dans l'activation du TGF- $\beta$  (Munger, Huang et al. 1999; Lacy-Hulbert, Smith et al. 2007; Travis, Reizis et al. 2007). Un des mécanismes est le clivage du complexe TGF- $\beta$ /LAP (latency-associated peptide) par l'intégrines  $\alpha_v\beta_6$  (Munger, Huang et al. 1999). La thrombospondine et la furine, exprimées par les Treg, présentent les mêmes capacités d'activation du TGF- $\beta$  (Crawford, Stellmach et al. 1998; Oida, Zhang et al. 2003; Pesu, Watford et al. 2008). Ainsi, les DC, les entérocytes et les Treg collaborent pour activer le TGF- $\beta$  et maintenir un état de tolérance au niveau de l'intestin.

Les LT effecteurs colitogéniques doivent répondre au TGF- $\beta$  pour être contrôlées (Gorelik and Flavell 2000; Fahlen, Read et al. 2005; Li, Sanjabi et al. 2006; Marie, Liggitt et al. 2006; Fantini, Rizzo et al. 2009).



Extrait de Konkel et al., Trends in Molecular Medicine, 2011 (Konkel and Chen 2011).

**Figure 26. Les niches intestinales de Treg.**

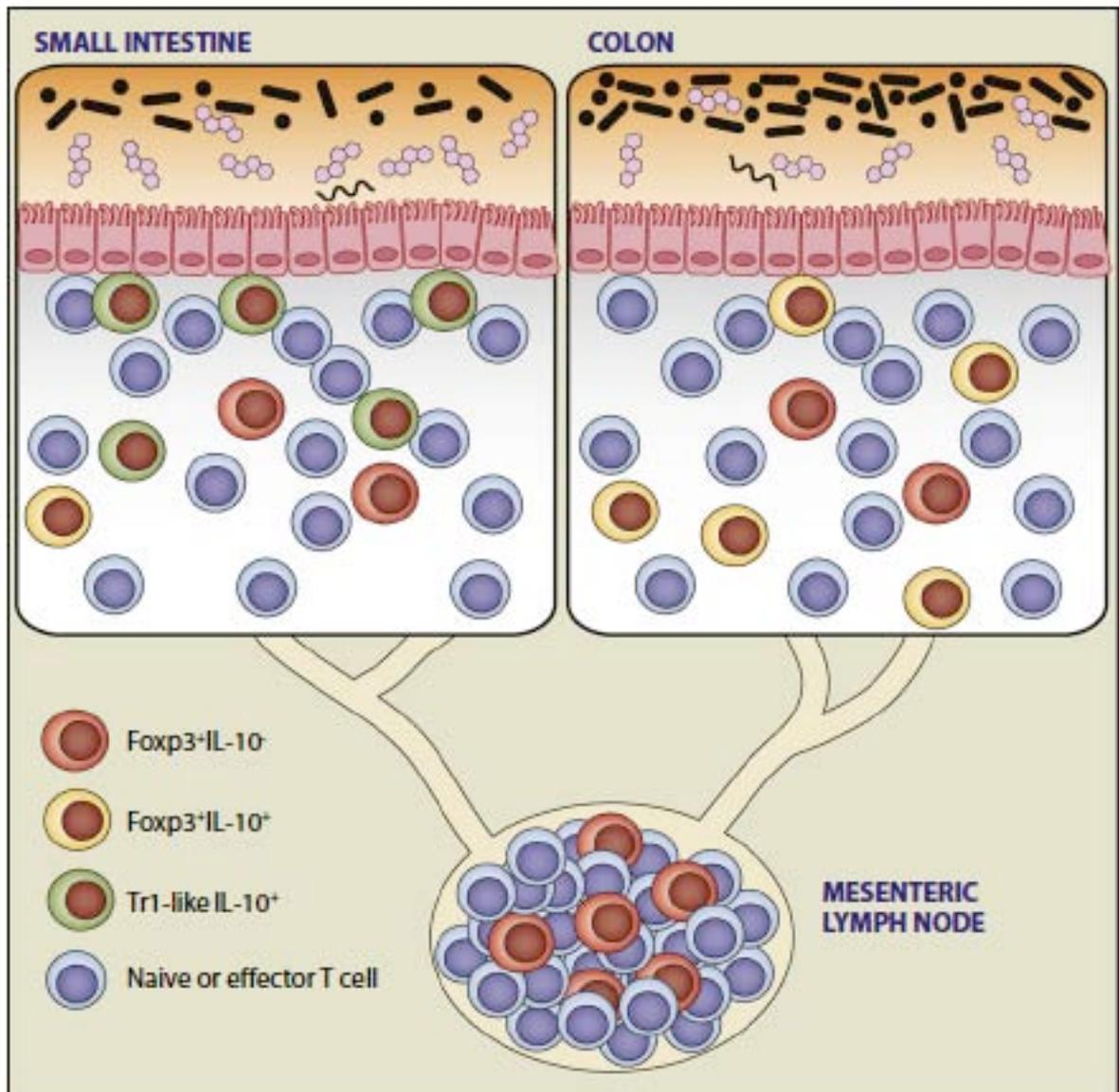
Le TGF- $\beta$  est une cytokine importante pour l'homéostasie du système immunitaire intestinale. En plus de cette cytokine, l'acide rétinoïque (RA) et l'IL-2 favorisent également un environnement de tolérance en permettant la différenciation de Treg. De plus, l'IL-2 inhibe la différenciation en cellules Th17.

### Facteurs conditionnant les niches intestinales de Treg

Le TGF- $\beta$  est un des facteurs qui contrôle la taille et la composition des niches intestinales de Treg (Figure 26). La fréquence des Treg est en effet réduite en l'absence de signalisation par le TGF- $\beta$ RII (Li, Sanjabi et al. 2006; Marie, Liggitt et al. 2006) mais est inchangée en l'absence de production de TGF- $\beta$ 1 par les LT (Li, Wan et al. 2007). D'autres isoformes du TGF- $\beta$  compenseraient le défaut de TGF- $\beta$ 1. De plus, d'autres sources cellulaires de TGF- $\beta$ , que les LT, contribueraient à la maintenance du compartiment intestinal des Treg. Les cellules apoptotiques, telles que les entérocytes dont le renouvellement est fréquent, représentent une source importante de TGF- $\beta$  actif (Chen, Frank et al. 2001) capable d'augmenter la production de TGF- $\beta$  par les DC et macrophages (Perruche, Zhang et al. 2008). De plus, des métabolites immunorégulateurs générés par la flore commensale, tels que l'ATP (Atarashi, Nishimura et al. 2008), et des composants bactériens (Mazmanian, Round et al. 2008; Sokol, Pigneur et al. 2008), comme le polysaccharide A (Mazmanian, Round et al. 2008), contribuent au maintien de la balance Th17-Treg. En plus de réguler le rapport Treg/Teff, les molécules dérivées de la flore commensale et de l'alimentation influencent la fréquence des Treg exprimant Foxp3 et des Tr1. Les molécules d'ADN d'origine bactérienne présentes dans la lumière intestinale sont des ligands activateurs pour le TLR9 (Hall, Bouladoux et al. 2008). La stimulation de DC et de LT en coculture par le TLR9 induit une production de cytokines pro-inflammatoires et les souris déficientes pour ce TLR présentent une proportion augmentée de Treg dans la lamina propria de l'intestin grêle (Maynard and Weaver 2009). Alors que la signalisation via le TLR9 inhiberait la différenciation des Treg Foxp3<sup>+</sup>, son influence sur la génération de Tr1 reste à déterminer. Au contraire, l'acide rétinoïque, un métabolite issu de la vitamine A, favorise la génération d'iTreg (Coombes, Siddiqui et al. 2007; Mucida, Park et al. 2007; Sun, Hall et al. 2007) et limite l'expression d'IL-10 (Maynard and Weaver 2009). Ainsi, les ligands du TLR9 et le RA influencent réciproquement l'accumulation des Tr1 et des iTreg dans l'intestin, mais d'autres facteurs sont impliqués dans la régulation de l'expression de l'IL-10 par les Treg Foxp3<sup>+</sup>. L'identification des cellules délivrant le signal induisant l'expression de Foxp3 et l'IL-10 permettant la différenciation des iTreg est un champ de recherche très dynamique. Les DC intestinales exprimant l'intégrine  $\alpha_E\beta_7$  ou CD103 et les macrophages intestinaux CD11b<sup>+</sup> présentent des capacités uniques à stocker et

produire du RA et ainsi représentent de puissants générateurs d'iTreg (Coombes, Siddiqui et al. 2007; Denning, Wang et al. 2007; Sun, Hall et al. 2007). Chez une souris sauvage, les DC CD103<sup>+</sup> représentent 30 à 50% des DC intestinales et sont distribuées de façon homogène dans la lamina propria de l'intestin grêle, du côlon et des mLN (Annacker, Coombes et al. 2005; Sun, Hall et al. 2007). Par contre, les proportions des Treg Foxp3<sup>+</sup>IL-10<sup>-</sup>, Foxp3<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> et des Tr1 varient considérablement entre les compartiments intestinaux (Figure 27) (Maynard, Harrington et al. 2007). Les données disponibles actuellement sont insuffisantes pour expliquer ce phénomène.

Le rôle majeur du système immunitaire de la muqueuse intestinale est à la fois de tolérer les micro-organismes commensaux et d'éradiquer les micro-organismes pathogènes sans réponse immunitaire excessive. En effet, une réponse immunitaire exacerbée peut aboutir au développement de MICI, de la maladie Coéliqua (CeD) ou d'une allergie.



Extrait de Barnes et al., *Immunity*, 2009 (Barnes and Powrie 2009).

**Figure 27. Répartition des différentes populations de Treg au niveau de l'intestin.**

L'IL-10 est une cytokine immunosuppressive majeure au niveau de l'intestin. Elle permet la survie des nTreg, la génération des Tr1 et le contrôle de l'activation de différentes cellules du système immunitaire. Sa concentration régule la composition des sous-populations de Treg au sein de l'intestin et des mLN.

## **VI Les maladies chroniques inflammatoires des intestins**

Chez l'Homme, les MICI sont des désordres intestinaux caractérisés par une inflammation chronique idiopathique de la paroi intestinale. Les principales pathologies sont la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH). Bien que les patients atteints de ces deux pathologies présentent des symptômes communs tels que diarrhée avec ou sans émissions sanglantes, des douleurs abdominales et un amaigrissement, la MC et la RCH sont distinctes d'un point de vue clinique. En effet, les patients atteints de la MC présentent des lésions inflammatoires tout au long du tube digestif alors que dans la RCH, les zones intestinales affectées sont principalement le côlon et le rectum. Les lésions développées par les patients atteints de la MC sont multifocales et transmurales tandis que l'inflammation lors de RCH est homogène et restreinte à la muqueuse du côlon (Cho 2008) (Table 1). Les deux pathologies ont tendance à évoluer par « poussées », alternant des phases d'activité d'intensité variable (« poussées » ou rechutes) avec des phases de rémission qui peuvent être asymptomatiques. Les patients atteints de MICI présentent souvent divers symptômes extra-intestinaux tels que de l'arthralgie, et peuvent développer d'autres désordres inflammatoires chroniques tels que la cholangite sclérosante primaire, la spondylarthrite ankylosante et le psoriasis (Loftus 2004).

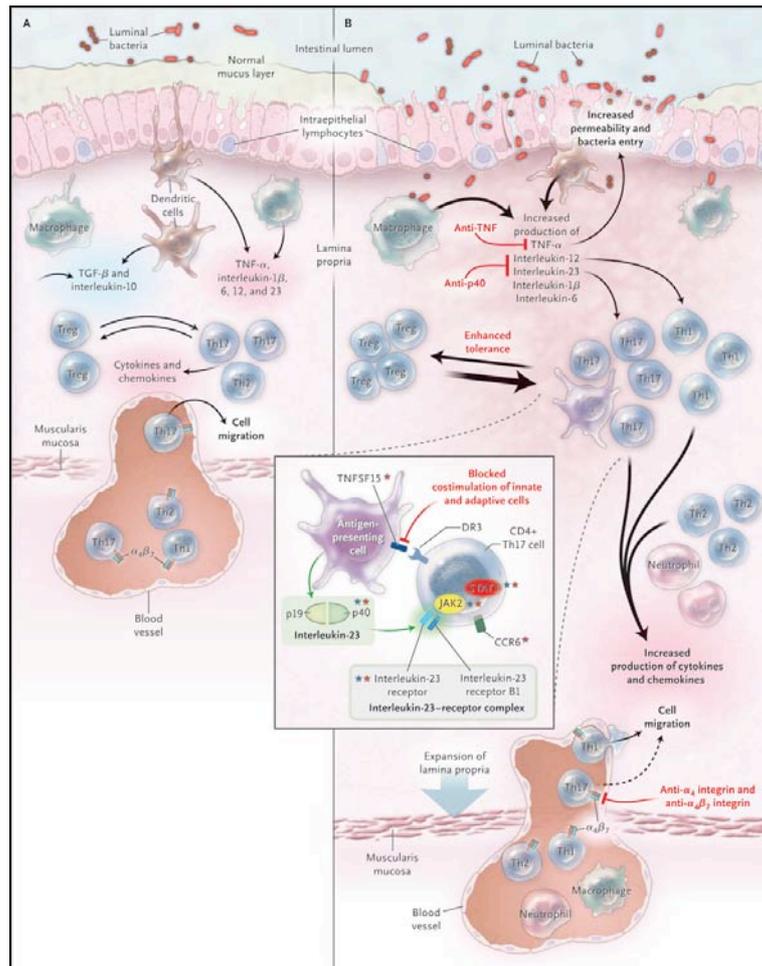
Le pic de l'incidence est entre 15 et 29 ans pour les femmes et les hommes (Johnston and Logan 2008). Les plus fortes incidences sont en Europe du Nord, au Royaume-Uni et en Amérique du Nord. De récentes études épidémiologiques montrent que l'incidence et la prévalence des MICI commencent à se stabiliser dans les zones présentant les plus hautes incidences. Par contre, elles continuent d'augmenter (surtout pour la RCH) dans les zones avec une incidence faible comme l'Europe centrale, l'Asie, l'Afrique et l'Amérique latine (Loftus 2004). La morbidité est élevée.

	Crohn's disease (CD)	Ulcerative colitis (UC)
Incidence	3.1–14.6 per 100 000	6–14.3 per 100 000
Clinical presentation of disease	All gastrointestinal track from mouth to anus can be affected  Most cases are in distal small bowel and proximal large bowel Half of patients have disease affecting both ileum and colon A third of patients have disease confined to the small bowel (mostly the ileum) 20–25% have disease confined to the colon Mucosal, submucosal and transmural inflammation Discontinuous inflammation with skipped segments	Occurs first in the rectum and progresses proximally  Inflammation is restricted to the colon  Mucosal, not transmural inflammation Continuous inflammation
Sociogeographic distribution	Higher rates in northern latitudes and in industrialized, urban and richer populations	Higher rates in northern latitudes and in industrialized, urban and richer populations
Environmental risk factors	Smoking	Smoking and appendectomy seem to be protective

*Extrait de Budarf et al., Trends in Genetics, 2009 (Budarf, Labbe et al. 2009).*

**Table 1. Caractéristiques de la MC et de la RCH.**

La MC et la RCH sont les principales MICI décrites chez l'Homme. Elles appartiennent à la même classe de pathologies mais elles présentent des caractéristiques cliniques très différentes. La cigarette est, à la fois, un facteur de risque environnemental majeur de la MC et un facteur protégeant du développement de la RCH.



Extrait de Abraham et al., *New England Journal of Medicine*, 2009 (Abraham and Cho 2009).

**Figure 28. Réponse immunitaire en cas de MICI.**

En cas de rupture de la barrière intestinale, les cellules du système immunitaire s'activent et produisent d'importantes quantités de cytokines, telles que du TNF- $\alpha$ , de l'IL1 $\beta$ , de l'IL-6, de l'IL-23 et des chimiokines. Ces dernières favorisent le recrutement d'autres leucocytes. Dans ce contexte inflammatoire, les LT CD4 Th17 de la lamina propria prolifèrent. L'ensemble de ces événements conduit au développement d'une réponse inflammatoire qui peut devenir chronique. Les stratégies thérapeutiques actuelles visent à limiter l'inflammation en bloquant les molécules indiquées par des flèches rouges.

## 1 Physiopathologie des maladies chroniques inflammatoires des intestins

Les cellules du système immunitaire peuplant la *lamina propria* intestinale doivent être tolérantes face aux micro-organismes constituant la flore commensale intestinale et, en même temps, s'activer face aux micro-organismes pathogènes et/ou une surpopulation de la lumière intestinale. Une régulation fine détermine si une tolérance immune ou une réponse inflammatoire doit être initiée. Un déséquilibre dans cette balance peut aboutir au développement d'une MICI. Une MICI active se caractérise notamment par une importante infiltration de la lamina propria par les cellules du système immunitaire inné (neutrophiles, macrophages, DC) et acquis (LT et LB) (Figure 28).

Etant données les limitations inhérentes à la population humaine, la majorité des mécanismes physiopathologiques des MICI décrits provient des travaux menés chez l'animal. Ils ont permis d'importantes avancées dans l'identification des populations cellulaires effectrices impliquées et dans la détermination de leurs mécanismes d'action favorisant l'inflammation intestinale.

### 1.1 Rôle de la flore commensale intestinale

Les données obtenues chez les patients atteints de MICI et dans les modèles animaux de MICI mettent en avant le rôle de la flore intestinale lors d'inflammation intestinale. De façon intéressante, dans la majorité de modèles animaux induits (Mombaerts, Mizoguchi et al. 1993; Aranda, Sydora et al. 1997; Boivin, Ormsby et al. 1997; Dianda, Hanby et al. 1997; Sellon, Tonkonogy et al. 1998) ou spontanés (Sundberg, Elson et al. 1994; Cong, Brandwein et al. 1998; Matsumoto, Okabe et al. 1998), les souris élevées dans un environnement exempt de pathogènes sont protégées du développement de MICI, suggérant fortement un rôle de la flore commensale intestinale dans le physiopathologie des colites. La flore intestinale des patients atteints de MICI est réduite quantitativement et qualitativement par rapport aux patients contrôles (Eckburg and Relman 2007; Frank, St Amand et al. 2007). Si ce changement est la cause du désordre ou une conséquence est inconnu. La présence de bactéries intestinales est requise pour le développement de l'inflammation dans la plupart des modèles animaux de MICI (Elson Immunol Rev 2005). Bien que certains pathogènes spécifiques furent impliqués dans l'apparition de MICI, aucun n'a été décrit comme la cause de la pathologie.

### 1.2 Rupture de la fonction de barrière des cellules épithéliales intestinales

Lors de MICI, les espaces paracellulaires entre les entérocytes présentent une perméabilité augmentée et la régulation des jonctions serrées est défectueuse. Ces anomalies peuvent être dues à un défaut primaire dans la fonction de barrière ou être une conséquence de l'inflammation (Musch, Clarke et al. 2002; Bruewer, Luegering et al. 2003; Turner 2006; Dahan, Roda et al. 2008). L'inflammation observée lors de MICI résulte souvent de lésions continues qui entraînent l'érosion de la barrière intestinale, des ulcérations et une production diminuée de défensines (Wehkamp, Salzman et al. 2005; Simms, Doecke et al. 2008). Ce phénomène amplifie alors l'inflammation en augmentant l'exposition aux bactéries intraluminales. Une étude montre que l'augmentation de la perméabilité intestinale précède les signes cliniques de MICI (Hollander, Vadheim et al. 1986). Cependant, cette relation cause à effet reste confirmée.

### 1.3 Rôle des cellules myéloïdes

La MC et la RCH sont caractérisées au niveau de la muqueuse intestinale par un recrutement de cellules myéloïdes effectrices telles que les macrophages, les DC et les neutrophiles. Les macrophages résidents présentent des capacités limitées à s'activer (Smythies, Sellers et al. 2005). L'expression de TREM-1 à la surface des macrophages intestinaux est augmentée dans des modèles murins de MICI et chez des patients souffrant de MICI (Schenk, Bouchon et al. 2007). Après migration sur le site inflammatoire, les monocytes et les cellules polynucléaires s'activent principalement par la voie des TLR. Cela résulte en une expression accrue de cytokines, de chimiokines, de molécules d'adhésion et de costimulation. Ces molécules pro-inflammatoires sont l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$ , l'IL-6, l'IL-8, CCL1, CCL3 et d'autres chimiokines, des molécules d'adhésion telles que ICAM1 et des molécules de costimulation comme CD40, CD80, CD86, ICOS (Sartor 2006). L'ensemble de ces facteurs pro-inflammatoires est fortement exprimé lors des phases actives de la MC et de la RCH. L'implication du TNF- $\alpha$  dans la physiopathologie des MICI est particulièrement démontrée par le fait que le traitement des patients par l'administration d'anticorps monoclonaux neutralisants le TNF- $\alpha$  est efficace (Targan, Hanauer et al. 1997; Jarnerot, Hertervig et al. 2005). Une des caractéristiques de la

Mouse Model	Tissue Affected	Histology Resembles	Effector T Cells Detected
T cell transfer	Colon	CD	Th1, Th17
IL-10-deficient	Colon	CD	Th1, Th17
STAT-4 transgenic	Colon	CD	Th1
C3H/HeJBir	Cecum	CD	Th1, Th17
SAMP1/Yit	Distal SI	CD	Th1, Th2
TNBS Colitis	Colon	CD	Th1, Th17
Chronic DSS Colitis	Colon	UC	Th1, Th2, Th17
Oxazolone Colitis	Colon	UC	Th2, NKT Cells
TCR $\alpha$ -deficient	Colon	UC	"Th1," "Th2"

*Extrait de Maynard, et al., Immunity, 2009 (Maynard and Weaver 2009).*

**Table 2. Modèles de MICI dépendant des lymphocytes T CD4.**

Les différentes populations de LT effecteurs Th sont impliquées dans le développement d'inflammation intestinale chez l'animal. Selon la polarisation de la réponse immune (Th1, Th2 ou Th17), ils constituent des modèles expérimentaux de la MC ou de la RCH.

MC est la formation de granulomes. Les DC immatures CD11c<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> produisent de l'IL-23 ce qui contribue à la formation de granulomes dans un modèle murin de colite (Mizoguchi, Ogawa et al. 2007). Mais, les autres mécanismes sous-jacents sont mal compris.

#### 1.4 Rôle des lymphocytes T CD4 effecteurs

Dans les colites expérimentales, les lymphocytes T intestinaux répondent aux antigènes fécaux. Le rôle des LT CD4 est majeur dans la physiopathologie des MICI chez l'Homme et l'animal. Une réponse T CD4 excessive ou inappropriée est une des caractéristiques des MICI (Table 2).

Les LT Th1 furent à l'origine décrits comme les cellules pathogènes responsables du développement de la MC et de l'inflammation intestinale dans les modèles murins de cette MICI (Powrie, Correa-Oliveira et al. 1994; Berg, Davidson et al. 1996; Neurath, Weigmann et al. 2002; Mannon, Fuss et al. 2004; Matsuoka, Inoue et al. 2004; Beltran, Candia et al. 2009). Mais les LT Th17, population T CD4 effectrice découverte plus récemment, sont également impliqués dans la physiopathologie de la MC. En plus des cellules productrices d'IFN- $\gamma$  décrites dans des études antérieures, une large proportion des LT CD4 retrouvés dans la muqueuse intestinale de souris immunodéficente transférées avec des LT CD4 naïfs (protocole induisant une colite) ou de souris déficientes pour l'IL-10 sont des cellules productrices d'IL-17 ou d'IL-17 et d'IFN- $\gamma$  (Yen, Cheung et al. 2006; Izcue, Hue et al. 2008). De façon importante, le transfert adoptif de LT Th17 spécifiques d'antigènes bactériens intestinaux dans un hôte immunodéficient induit une colite plus sévère que celui de Th1. De plus, la pathologie peut être développée suite à l'injection d'une quantité moindre de cellules Th17 (Elson, Cong et al. 2007). Le traitement avec l'anticorps monoclonal anti-IL-23p19, au moment du transfert cellulaire ou après l'induction de l'inflammation, inhibe la colite. Ces données indiquent que l'IL-23 est requise pour le maintien de la population Th17 pathogène (Elson, Cong et al. 2007). La délétion du gène codant pour l'IL-23p19, et non celui codant pour l'IL-12p40, prévient le développement de la colite spontanée chez les souris déficientes pour l'IL-10 (Yen, Cheung et al. 2006). Ces données prouvent que l'IL-23, et non l'IL-12, est nécessaire pour l'apparition des lésions inflammatoires intestinales dans ce modèle. L'ensemble de ces données implique la population effectrice T CD4 Th17

dépendante de l'IL-23 dans le développement de MICI. Cependant, le transfert de LT CD4 naïfs déficients pour l'IL-17A, l'IL-17F ou l'IL-22 dans un hôte immunodéficient induit une colite de même sévérité que celui de LT CD4 naïfs sauvages (Izcue, Hue et al. 2008; Leppkes, Becker et al. 2009). La neutralisation de l'IL-17A lors du transfert de LT CD4 naïfs déficients pour l'IL-17F chez une souris lymphopénique provoque une inflammation de même sévérité que la colite induite par des LT CD4 naïfs déficients pour ROR $\gamma$ t. Ces résultats suggèrent que ROR $\gamma$ t est responsable de la sécrétion d'IL-17A et d'IL-17F, cytokines aux fonctions redondantes dans l'induction de colite dans ce modèle (Leppkes, Becker et al. 2009). Ces données sont en désaccord avec plusieurs expériences antérieures. En effet, la déficience en T-bet, en IFN- $\gamma$  ou la neutralisation de l'IFN- $\gamma$  sont suffisants pour prévenir l'apparition de la colite dans ce modèle (Powrie, Correa-Oliveira et al. 1994; Berg, Davidson et al. 1996; Neurath, Weigmann et al. 2002). L'état de dépérissement chez les animaux transférés avec des LT CD4 naïfs déficients pour l'IL-17A par rapport aux souris transférées des LT CD4 naïfs sauvages est plus rapide (O'Connor, Kamanaka et al. 2009). Cette dernière étude suggère un rôle régulateur de l'IL-17A dans les phases précoces de la colite, cette population T supprimerait la production d'IFN- $\gamma$  par les LT Th1 colitogènes.

Les cytokines associées aux cellules Th17 sont augmentées chez les patients atteints de la MC. Les biopsies de côlon issues de patients atteints de la MC présentent des niveaux élevés d'IL-17A, IL-17F, IL-21 et IL-22, en comparaison avec avec les patients contrôles sains (Fujino, Andoh et al. 2003; Nielsen, Kirman et al. 2003; Andoh, Zhang et al. 2005; Seiderer, Elben et al. 2008).

L'IL-23 joue un rôle pro-inflammatoire indiscutable dans la physiopathologie des MICI. Mais, l'effet des autres cytokines de la voie Th17 est plus controversé. Des expériences montrent que l'IL-17A est une cytokine protectrice (Ogawa, Andoh et al. 2004), pro-inflammatoire (Zhang, Zheng et al. 2006) ou sans effet (Izcue, Hue et al. 2008). L'IL-21, également augmentée dans les lésions de patients atteints de la MC, contribue au développement de colite en favorisant, en présence de TGF- $\beta$ , la différenciation des cellules en Th17 (Monteleone, Monteleone et al. 2005; Fina, Sarra et al. 2008). Par contre, l'IL-22 serait protectrice principalement par le maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale et l'homéostasie des cellules de Goblet (Sugimoto, Ogawa et al. 2008; Zenewicz, Yancopoulos et al. 2008).

Compte tenu des données expérimentales contradictoires, l'étude de l'implication des LT Th1 et/ou Th17 lors de colites expérimentales reste un champ de recherche très dynamique. Néanmoins, il est bien établi que des LT CD4 producteurs d'IFN- $\gamma$  et d'IL-17 sont détectables à tous les stades de la MICI dans le modèle animal de transfert de LT naïfs et chez les patients atteints de la MC. La clé de ce phénomène est peut être dans la plasticité des LT Th17. En effet, une plasticité développementale a été démontrée dans le lignage Th17 : des LT Th17 peuvent se convertir en cellules productrices d'IFN- $\gamma$  (Annunziato, Cosmi et al. 2007; Lexberg, Taubner et al. 2008; Lee, Turner et al. 2009).

La RCH serait une pathologie impliquant les LT CD4 Th2. Cette hypothèse est basée sur l'absence d'élévation de l'IFN- $\gamma$  et sur la production d'auto-anticorps contre les neutrophiles et la tropomyosine chez les patients atteints de RCH (Das, Dasgupta et al. 1993; Niessner and Volk 1995; Targan, Landers et al. 1995). Ces auto-anticorps sont indirectement impliqués dans la physiopathologie de cette MICI. Cependant, aucune preuve directe impliquant les LT Th2 n'existe. En effet, la proportion de LT CD4 producteurs d'IL-4 est réduite chez les patients atteints de MICI par rapport aux sujets contrôles mais l'IL-5 est augmentée chez patients atteints de RCH par rapport aux sujets atteints de MC et contrôles (Fuss, Neurath et al. 1996). Les transcripts de l'IL-4 et l'IL-13 sont augmentés chez les patients atteints de RCH en phase de rechute par rapport aux sujets en phase de rémission et aux contrôles. Cependant, la source majeure d'IL-13 provient des NKT aussi présents dans la *lamina propria* des patients atteints de RCH (Fuss, Heller et al. 2004). L'étude des mécanismes physiopathologiques responsables de la RCH est limitée par le nombre restreint de modèles animaux. Sur la base du modèle animal de colite induite par l'administration d'oxazolone (modèle Th2), Fuss et ses collègues ont suggéré que la RCH est une pathologie de type 2 atypique médiée par des NKT sécréteurs d'IL-13 (Fuss, Heller et al. 2004). Enfin, des études suggèrent que l'EBI3 (Epstein-Barr virus induced gene 3) (Christ, Stevens et al. 1998), l'IL-25 (Zaph, Du et al. 2008), et la TSLP (Ziegler and Liu 2006; Zaph, Troy et al. 2007), facteurs pro-Th2 exprimés dans la muqueuse intestinales des atteints de RCH, orienteraient les LT vers une différenciation Th2.

### 1.5 Défauts de la population Treg

Un nombre important de modèles expérimentaux de colite résulte d'un défaut de la population T CD4 régulatrice (cf Table 4, chapitre « Modèles animaux de MICI ») (Bouma and Strober 2003).

Comme décrit dans le paragraphe concernant la tolérance intestinale, les cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10 et le TGF- $\beta$ 1 sont importantes pour maintenir la tolérance intestinale. Concernant l'IL-10, l'équipe de Kronenberg a montré que des Treg déficients pour l'IL-10R perdent l'expression de Foxp3 et ainsi leurs fonctions suppressives (Murai, Turovskaya et al. 2009). Par contre, la source cellulaire principale d'IL-10 est une autre population que les Treg. D'autres études montrent des résultats contradictoires. Les Treg déficients pour l'IL-10 sont capables de contrôler le développement d'inflammation intestinale dans le même modèle de colite induite par le transfert de cellules naïves (Asseman, Mauze et al. 1999) ou induite par *Helicobacter hepaticus* (Maloy, Salaun et al. 2003). Ils sont moins efficaces pour contrôler une colite déjà établie (Uhlir, Coombes et al. 2006). De plus, une déficience sélective des Treg pour l'IL-10 chez la souris résulte en une colite spontanée et des réponses inflammatoires au niveau d'autres muqueuses comme la peau et les poumons (Rubtsov, Rasmussen et al. 2008). Ces dernières études révèlent un rôle majeur de l'IL-10 sécrétée par les Treg dans le maintien de l'homéostasie intestinale. L'importance du TGF- $\beta$ 1 produit par les Treg dans le contrôle d'une colite expérimentale est encore débattue (Fahlen, Read et al. 2005; Li, Wan et al. 2007). Les Treg expriment la protéine membranaire Latency-Associated Peptide (LAP), molécule témoin de la production de TGF- $\beta$ 1 mature (Li, Wan et al. 2006). Une autre cytokine immunorégulatrice, l'IL-35, serait impliquée dans le contrôle de colite par les Treg. En effet, les Treg déficients pour cette cytokine sont moins efficaces pour inhiber une colite induite par des LT CD4 naïfs (Collison, Workman et al. 2007).

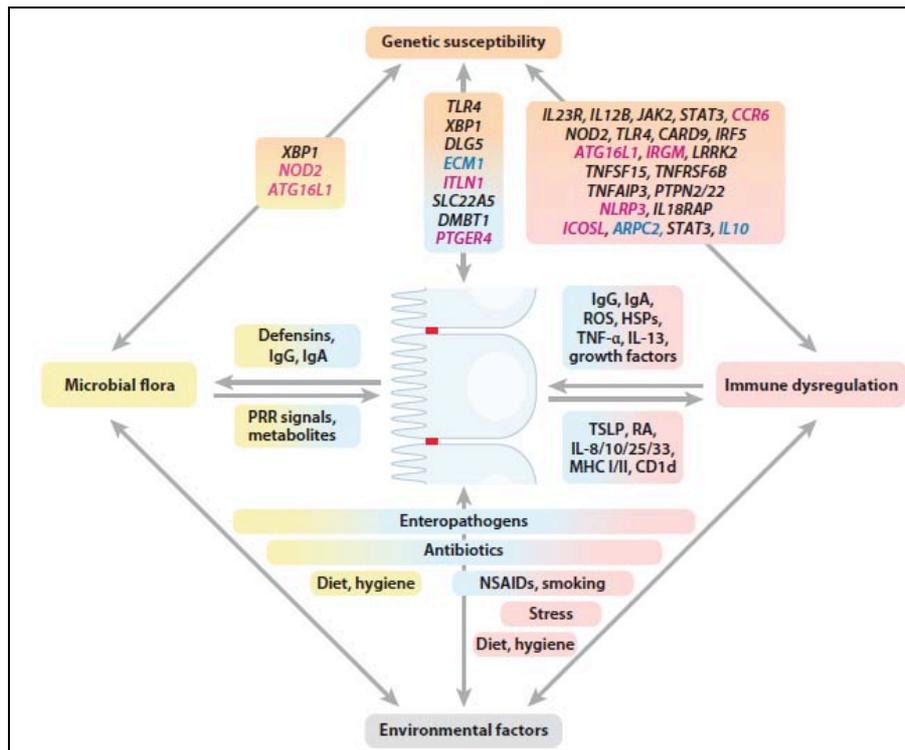
L'expression de la molécule CTLA-4 est requise pour les fonctions des Treg. En effet, les souris dont les cellules Foxp3<sup>+</sup> sont déficientes pour CTLA-4 succombent suite au développement de diverses pathologies auto-immunes (Wing, Onishi et al. 2008). Ce phénotype est similaire aux souris déficientes pour CTLA-4 (Waterhouse, Penninger et al. 1995). De façon intéressante, un des effets secondaires présentés par des patients traités avec un anticorps bloquant CTLA-4 est le développement

d'entérocolite (Cranmer and Hersh 2007). Cette observation suggère que chez l'Homme, comme chez la souris, CTLA-4 joue un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie intestinale. Cependant, le mécanisme sous-jacent reste méconnu.

Par ailleurs, les Tregs déficients pour CCR4 et CCR7, incapables de migrer dans les mLN, présentent un défaut à prévenir le développement de colite (Schneider, Meingassner et al. 2007; Yuan, Bromley et al. 2007). Les Treg déficients pour l'intégrine  $\beta 7$ , nécessaire pour leur migration vers la *lamina propria* et les tissus intraépithéliaux, contrôlent la colite induite par le transfert de cellules T CD4 naïfs (Denning, Kim et al. 2005). L'ensemble de ces données suggère que les Tregs exercent leurs fonctions suppressives au niveau des mLN dans ce modèle. De façon intéressante, les Treg transférés dans un hôte après établissement de la colite atteindraient les mLN puis proliféreraient avant de rejoindre les tissus intestinaux où ils exerceraient leur activité suppressive sur les LT colitogéniques (Mottet, Uhlig et al. 2003; Uhlig, Coombes et al. 2006). Ces données suggèrent que les Treg seraient également capables de contrôler l'activation de LT effecteurs sur le site inflammatoire.

## **2 Etiologie des maladies chroniques inflammatoires des intestins**

Malgré de nombreuses années de recherche, les causes des MICI restent mal comprises. Cependant, il est bien établi que, de façon similaire à d'autres pathologies inflammatoires chroniques, les MICI sont des maladies multifactorielles. Elles sont causées par une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux (Figure 29).



Extrait de Kaser et al., *Annual Review of Immunology*, 2010 (Kaser, Zeissig et al. 2010).

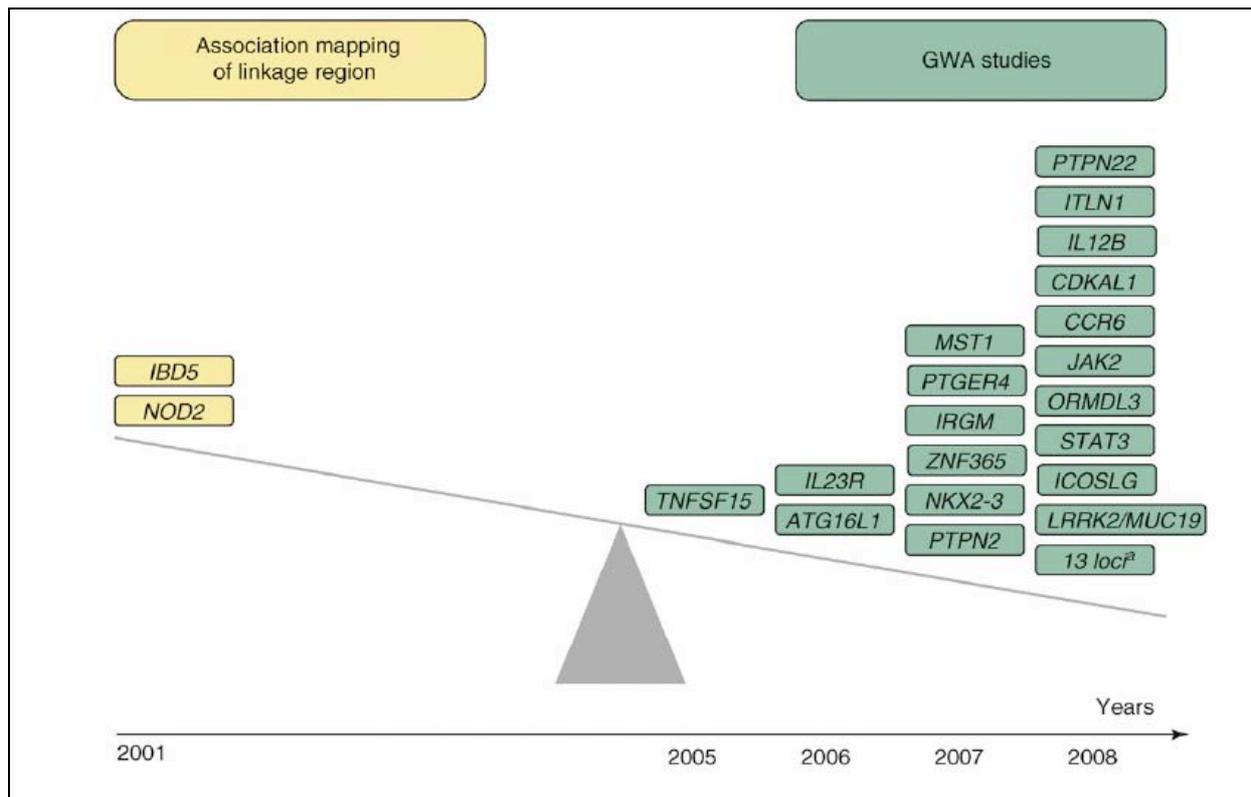
**Figure 29. Les MICI : des pathologies multifactorielles.**

Les causes des MICI sont multifactorielles. Les patients atteints sont des individus génétiquement prédisposés et vivant dans un environnement présentant plusieurs facteurs de risque pour ce type d'inflammation intestinale. Les défauts génétiques et les facteurs environnementaux influencent quantitativement et qualitativement la flore intestinale. Ils sont également responsables de dysfonctions du système immunitaire ce qui peut aboutir à une perte de tolérance.

## 2.1 Facteurs génétiques

L'implication de facteurs génétiques a été établie suite aux observations suivantes : 5 à 10 % des patients atteints de MICI ont un membre de leur famille au premier degré affecté (Binder 1998; Cho and Brant 2011). Pour ces patients, le risque relatif d'avoir un enfant atteint est 30 à 40 fois plus élevé pour la MC et 10 à 20 fois plus élevé pour la RCH. Le taux de concordance est plus important pour les jumeaux monozygotes que pour les dizygotes (pour la MC: 50 à 58% versus 0 à 12%; pour la RCH : 6 à 14% versus 0 à 5%). De plus, dans 75 à 80% des familles dont un membre est affecté par une des deux MICI, si une autre personne de la famille est affectée, elle développe la même MICI. Ces données suggèrent qu'un ensemble de gènes est associé aux deux pathologies alors que certains variants alléliques sont seulement impliqués dans l'un ou l'autre des désordres.

Ces pathologies sont depuis longtemps reconnues comme multigéniques mais la recherche des gènes de susceptibilité reste difficile. Chez l'Homme, les études d'association génomique (ou genome wide association studies (GWAS)) établissent une corrélation entre des régions géniques ou des variations alléliques d'un gène (au moyen de single-nucleotide polymorphisms (SNP)) situées sur l'ensemble du génome et un phénotype. Ils ont permis la découverte de nombreux polymorphismes au niveau de gènes impliqués dans les fonctions du système immunitaire inné et adaptatif (Figure 30 et Table 3). Cependant, l'expression d'un seul polymorphisme est insuffisante pour développer la maladie démontrant la complexité de ce désordre multifactoriel. Les modèles animaux déficients pour ces mêmes gènes ont permis de confirmer leur implication et de mieux comprendre les mécanismes physiopathologies impliqués.



Extrait de Budarf, et al., *Trends in Genetics*, 2009 (Budarf, Labbe et al. 2009).

**Figure 30. Découverte des gènes de susceptibilité aux MICI.**

Différentes stratégies génétiques existent pour découvrir des locus ou gènes de susceptibilité à des désordres. Ces dernières années, le recours aux GWAS a permis de progresser rapidement dans l'identification de gènes impliqués dans le développement de MICI.

Gene symbol	Gene name	Crohn's disease	Ulcerative colitis	Others
ARPC2	Actin-related protein 2/3 complex, subunit 2	NT	Yes	No
ATG16L1	Autophagy-related 16-like 1	Yes	No	No
CCNY	Cyclin Y	Yes	Yes	No
CCR6 <sup>b</sup>	Chemokine (C-C motif) receptor 6	Yes	No	No
CDKAL1	Cyclin-dependent kinase 5 regulatory subunit associated protein 1-like 1	Yes	No	Psoriasis
ECM1	Extracellular matrix protein 1	NT	Yes	No
HERC2	Hect domain and RLD 2	Yes	Yes	No
ICOSLG	Inducible T-cell co-stimulator ligand	Yes	No	No
IFN $\gamma$ <sup>b</sup>	Interferon $\gamma$	NT	Yes	No
IL10	Interleukin 10	NT	Yes	No
IL12B	Interleukin 12B	Yes	Yes	Psoriasis
IL18RAP	Interleukin 18 receptor accessory protein	Yes	Yes	T1D, CeD
IL2/IL21	Interleukin 2 and interleukin 21	NT	Yes	T1D, RA, CeD
IL23R	Interleukin 23 receptor	Yes	Yes	Psoriasis, AS
IRGM <sup>b</sup>	Immunity-related GTPase family, M	Yes	No	No
ITLN <sup>b</sup>	Intelectin 1	Yes	No	No
JAK2 <sup>b</sup>	Janus kinase 2	Yes	No	No
KIF21B <sup>b</sup>	Kinesin family member 21B	Yes	No	No
LRKK2, MUC19 <sup>b</sup>	Leucine-rich repeat kinase 2, mucin 19	Yes	No	No
MHC region	Major histocompatibility complex	Yes	Yes	Multiple <sup>c</sup>
MST1 <sup>b</sup>	Macrophage stimulating 1	Yes	Yes	No
NKX2-3	NK2 transcription-factor-related, locus 3	Yes	Yes	No
NOD2	Nucleotide-binding oligomerization-domain-containing 2	Yes	No	No
ORMDL3 <sup>b</sup>	ORM1-like 3	Yes	No	Asthma
PLA2G2E <sup>b</sup>	Phospholipase A2, group IIE	NT	Yes	No
PSMG1 <sup>b</sup>	Proteasome assembly chaperone 1	Yes	Yes	No
PTGER4	Prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)	Yes	Yes	No
PTPN2	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2	Yes	Yes	T1D
PTPN22 <sup>b</sup>	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22	Yes	Yes	Psoriasis, T1D, AS, SLE
PUS10	Pseudouridylate synthase 10	Yes	Yes	No
STAT3 <sup>b</sup>	Signal transducer and activator of transcription 3	Yes	Yes	T1D
TNFRSF6B <sup>b</sup>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6b	Yes	Yes	No
TNFSF15 <sup>b</sup>	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 15	Yes	No	No
ZNF365	Zinc finger protein 365	Yes	Yes	No

Extrait de Budarf, et al., *Trends in Genetics*, 2009 (Budarf, Labbe et al. 2009).

### **Table 3. Gènes de susceptibilité à la MC et/ou la RCH.**

Certains gènes de susceptibilité sont communs à la MC et la RCH. Ils peuvent même être communs à d'autres pathologies inflammatoires chroniques tels que la maladie coeliaque, le psoriasis. Ces données suggèrent que la physiopathologie de ces désordres partage certaines similitudes.

AS : la spondylarthrite ankylosante

CeD : la maladie Coeliaque

SLE : le lupus systémique érythémateux

T1D : le diabète de type 1

### Gènes impliqués dans le système immunitaire inné

En 2001, le gène *NOD2* (ou *CARD15*) fut identifié comme un gène de susceptibilité à la MC mais pas la RCH (Hugot, Chamaillard et al. 2001; Ogura, Bonen et al. 2001). La protéine NOD2 est un récepteur permettant la reconnaissance intracellulaire du peptidoglycane (composant de la paroi bactérienne) par les cellules du système immunitaire inné. Au niveau de l'intestin, les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les cellules de Paneth, les macrophages et les DC expriment NOD2. Trois SNP (Arg702Trp, Gly908Arg et Leu 1007fsinsC) sont fortement associés à la susceptibilité à la MC (Economou, Trikalinos et al. 2004; Cho and Weaver 2007). Il reste encore à comprendre la relation physiopathologique entre l'expression d'un variant allélique de *NOD2* et le développement de la MC (Kobayashi, Chamaillard et al. 2005).

Certains polymorphismes des gènes *ATG16L1* (autophagy related 16-like 1) et *IRGM* (immunity-related GTPase family) ont également été impliqués spécifiquement comme facteur de susceptibilité à la MC (Hampe, Franke et al. 2007; McCarroll and Altshuler 2007; Parkes, Barrett et al. 2007; Rioux, Xavier et al. 2007). Ces deux protéines jouent un rôle dans le processus d'autophagie. Ce mécanisme participe à l'élimination des composants intracellulaires tels que les organelles, les corps apoptotiques et les micro-organismes (Levine and Deretic 2007). Chez la souris, la protéine ATG16L1 serait impliquée dans la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et contrôlerait l'inflammation intestinale (Saitoh, Fujita et al. 2008). Les souris exprimant faiblement ATG16L1 ainsi que les patients atteints de la MC portant le variant allélique associé à une susceptibilité à la MC présentent un défaut morphologique des cellules de Paneth (Cadwell, Liu et al. 2008). D'autre part, les souris déficientes pour IRGM sont incapables d'éliminer les pathogènes intracellulaires *Toxoplasma gondii* et *L. monocytogenes* (Collazo, Yap et al. 2001). Une autre étude reporte le rôle de cette protéine dans l'autophagie, processus impliqué dans le contrôle des charges mycobactériennes intracellulaires (Singh, Davis et al. 2006).

Les polymorphismes dans les gènes *NOD2*, *ATG16L1* et *IRGM* sont associés avec le développement de la MC et non de la RCH. Cette observation suggère que l'altération dans les processus d'élimination des pathogènes intracellulaires est une caractéristique de la physiopathologie de la MC. Ce défaut primaire résulterait en une réponse compensatoire et délétère de type Th1, requise pour l'élimination de

pathogènes intracellulaires. Des LT Th1 sont en effet présents dans la *lamina propria* des patients atteints de la MC (Fuss, Neurath et al. 1996; Plevy, Landers et al. 1997).

### Gènes impliqués dans le système immunitaire adaptatif

Des polymorphismes dans les gènes codant pour les molécules du CMH de classe II (Fernando, Stevens et al. 2008; Franke, Balschun et al. 2008; Silverberg, Cho et al. 2009) confèrent une susceptibilité au développement de MICI.

La signalisation par l'IL-23 est médiée par l'engagement de l'IL-23 (cytokine hétérodimérique composée des sous-unités p19 et p40) avec son récepteur hétérodimérique composé des chaînes IL23R et IL-23R $\beta$ 1. Cela résulte en l'activation de la voie de signalisation janus-associated kinase (JAK)-STAT qui régule la transcription de nombreux gènes, en particulier des gènes codant pour des cytokines. L'implication de cette voie dans l'inflammation a été reportée dans plusieurs modèles animaux de MICI (Hue, Ahern et al. 2006; Yen, Cheung et al. 2006; Elson, Cong et al. 2007; McGeachy and Cua 2007; Izcue, Hue et al. 2008; Kobayashi, Okamoto et al. 2008). L'IL-23, sécrétée par les macrophages et les DC, contribueraient à la prolifération et/ou à la survie des cellules Th17 (McGeachy and Cua 2008). Cette cytokine contribue aussi à l'inflammation intestinale par des voies indépendantes des Th17 (Izcue, Hue et al. 2008). De plus, les niveaux des cytokines IL-23 et IL-17 sont élevés dans la muqueuse du côlon des patients atteints de la MC et de la RCH (Fujino, Andoh et al. 2003; Annunziato, Cosmi et al. 2007; Saruta, Yu et al. 2007). Une très significative association entre l'IL23R et le développement de MICI a été reportée (Duerr, Taylor et al. 2006).

Comme décrit précédemment, d'importants mécanismes de tolérance sont mis en place au niveau de l'intestin. Les cytokines immunosuppressives IL-10 et TGF- $\beta$  dans les plaques de Peyer, les mLN et la *lamina propria* sont impliquées dans ces mécanismes de tolérance (Elson, Cong et al. 2005). Une étude génétique montre une association génétique entre l'IL-10 et la RCH (Franke, Balschun et al. 2008). Elle corrèle avec les modèles animaux de déficience en IL-10 atteints d'une colite et d'une dysplasie intestinale (Elson, Cong et al. 2005). D'autre part, une association entre des polymorphismes dans les gènes codant pour les sous-unités du récepteur à l'IL-10 (*IL-10RA* et *IL-10RB*) et le développement de la MC renforce l'importance de cette voie de régulation dans l'homéostasie intestinale (Glocker, Kotlarz et al. 2009). Le mécanisme d'autophagie participe à la tolérance par les LT à de multiples

niveaux. Les polymorphismes dans les gènes de l'autophagie associés avec la MC pourraient augmenter la susceptibilité des patients à une inflammation intestinale suite à un défaut de tolérance par les LT (Levine and Deretic 2007; Nedjic, Aichinger et al. 2008).

## 2.2 Facteurs environnementaux

Des facteurs environnementaux tels que la cigarette, le stress, certains médicaments, les infections, le statut socio-économique seraient impliqués dans la physiopathologie des MICI. Ces facteurs environnementaux influenceraient la flore intestinale et les fonctions des cellules du système immunitaire résidentes dans la *lamina propria*. Ces données expliqueraient la forte incidence dans les pays du Nord (Danese, Sans et al. 2004).

## 3 **Traitements des maladies chroniques inflammatoires des intestins**

A l'heure actuelle, la cause de ces MICI est inconnue. Les traitements agissent donc sur les symptômes des patients, ils ne sont pas curatifs. Le but des traitements suivis par les patients est d'améliorer leurs conditions de vie en augmentant la fréquence et la durée des périodes de rémission.

Le 5-ASA (5-aminosalicylate) est le traitement le plus largement utilisé. Cet anti-inflammatoire augmente l'expression de PPAR- $\gamma$  (peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$ ) dans les IEC. Les voies de NF- $\kappa$ B et des MAP (mitogen activated protein) kinases dans les IEC sont inhibées, réduisant l'activation du système immunitaire (Rousseaux, Lefebvre et al. 2005; Dubuquoy, Rousseaux et al. 2006).

Dans les formes les plus sévères de MICI, des corticoïdes sont administrés.

Les médecins ont également recours aux traitements anti-infectieux avec le *Flagyl*® (métronidazole) (Colombel, Cortot et al. 2001) et immunosuppresseurs dont le *Méthotrexate*® (Cosnes, Nion-Larmurier et al. 2005; Baumgart and Sandborn 2007).

Il existe également des traitements dits « biologiques ». Régulièrement, de nouveaux essais ciblant des cytokines inflammatoires sont entrepris. C'est le cas pour le TNF- $\alpha$  impliqué dans les MICI avec le *Remicade* (inflximab), un anticorps monoclonal anti-TNF- $\alpha$ . Cependant, cet anticorps chimérique peut induire une réponse contre lui-même diminuant ainsi son efficacité et augmentant la

susceptibilité aux infections (Rutgeerts, Van Assche et al. 2004). Il a donc été remplacé par un anticorps humanisé (fragment Fab humain), le certolizumab pegol (Schreiber, Khaliq-Kareemi et al. 2007). Une autre thérapie est d'inhiber la migration des leucocytes sanguins au niveau de l'intestin en bloquant leur adhésion aux cellules endothéliales via le *natalizumab*®, un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre l'intégrine  $\alpha_4$  (Targan, Feagan et al. 2007). Plus récemment, un anticorps dirigé contre la sous-unité p40 commune à l'IL-12 et l'IL-23 a également été mise au point, l'*ustekinumab*® (Sandborn, Feagan et al. 2008). Il induit une rémission chez les patients ayant une MC active. D'autres molécules comme le *vizilizumab*®, un anticorps anti-CD3, la *basiliximab*®, un anticorps anti-CD25, ou le *tocilizumab*®, un anticorps dirigé contre l'IL-6 ont été développés (Peyrin-Biroulet, Desreumaux et al. 2008).

Si les traitements médicaux sont inefficaces ou si des complications surviennent, la chirurgie devient nécessaire. Après dix ans d'évolution de la maladie, plus d'un patient sur deux a subi une intervention chirurgicale (résection grêlique, colectomie). Elle permet souvent d'obtenir des rémissions prolongées, mais elle n'est pas curative.

Les traitements utilisés chez les patients atteints de MICI présentent de nombreux effets secondaires (lymphomes, susceptibilité aux infections) et ne sont pas curatifs. Le développement de thérapies plus spécifiques est par conséquent nécessaire. En plus de mieux comprendre la physiopathologie des MICI, l'utilisation de modèles animaux permet la mise au point de nouvelles stratégies thérapeutiques.

#### **4 Modèles animaux des maladies chroniques inflammatoires des intestins**

L'étude de modèles animaux d'inflammation intestinale a permis une meilleure compréhension de l'immunité mucoale (Elson, Cong et al. 2005). Ces modèles ne reflètent pas la complexité de la physiopathologie des MICI chez l'Homme et ne peuvent donc remplacer les études menées sur les patients. Mais, ils représentent des outils fiables pour l'étude de plusieurs aspects difficiles à analyser chez l'Homme, par exemple les mécanismes physiopathologiques lors de l'initiation de la pathologie et l'effet de traitements. Les symptômes cliniques chez l'Homme sont très hétérogènes. Cette observation est retrouvée dans les différents modèles animaux

de MICI présentant des lésions intestinales semblables à celles reportées chez les patients atteints de MICI. L'induction de MICI dans les divers modèles animaux est effectuée suite à l'administration d'agents chimiques, la délétion ciblée de gène ou le transfert de LT colitogéniques. Enfin, quelques modèles animaux spontanés de MICI existent.

#### 4.1 Modèles induits par des molécules chimiques

Les modèles de MICI peuvent être induits par des agents chimiques tels que le TNBS (acide trinitro benzene sulfonique), l'oxazolone et le DSS (dextran sodium sulfate). Ils sont très utilisés en laboratoire compte tenu de leur simplicité protocolaire et de leur faible coût. L'administration de la molécule chimique est effectuée par voie orale ou intra-rectale. L'éthanol dans lequel est dissous le TNBS ou l'oxazolone provoque une rupture de la barrière intestinale et met en contact la flore et l'immunité intestinale sous-jacente. Les agents chimiques agissent alors comme des haptènes et rendent le contenu antigénique de la lumière intestinale immunogène (Wirtz, Neufert et al. 2007). Les lésions inflammatoires affectent principalement le côlon (colite) et parfois l'iléon (iléite).

La physiopathologie de la colite induite par le TNBS est une inflammation transmurale sévère du côlon ayant plusieurs similitudes la MC et la RCH (Heller, Fuss et al. 2002; Wirtz, Neufert et al. 2007; Alex, Zachos et al. 2009). Les LT Th1 et Th2 joueraient le rôle dans la réponse immune mucoale (Dohi, Fujihashi et al. 1999; Fuss, Marth et al. 1999; Dohi, Fujihashi et al. 2000). Ce modèle permet principalement l'étude des phases précoces de l'inflammation.

Le modèle induit par l'administration d'oxazolone est décrit comme un modèle aigu de colite dépendant des LT Th2. En effet, les premiers infiltrats inflammatoires sont caractérisés par la présence de cellules T CD4 sécrétrices d'IL-4, IL-5 et IL-13. Une administration systémique d'anticors anti-IL-4 supprime la maladie. Ainsi, il présente certaines caractéristiques de la RCH (Boirivant, Fuss et al. 1998).

Les polymères de DSS dilués dans l'eau de boisson des souris induisent une colite aiguë très reproductible. Elle se caractérise par des diarrhées sanglantes, des ulcérations et des infiltrations de granulocytes (Okayasu, Hatakeyama et al. 1990; Mahler, Bristol et al. 1998; Wirtz, Neufert et al. 2007). Toxique pour les cellules épithéliales intestinales, le DSS affecte l'intégrité de la barrière mucoale. Les souris

SCID (severe combined immunodeficiency) et Rag1<sup>-/-</sup> déficientes en LT et B développent aussi une colite sévère (Dieleman, Ridwan et al. 1994), excluant un rôle pour les cellules du système immunitaire adaptatif lors de la phase aiguë de l'inflammation. Ainsi, ce modèle est particulièrement utilisé pour l'étude de la contribution des cellules du système immunitaire inné lors d'une inflammation aiguë et les mécanismes impliqués dans la réparation de la barrière intestinale (Williams, Fuller et al. 2001). Ce modèle présente des similarités avec la RCH.

Ces modèles sont des modèles de choix pour la mise au point de thérapies. Ils sont très utilisés dans les protocoles de l'industrie pharmaceutique. Mais, ils restent plutôt artificiels et assez loin de la physiopathologie des MICI.

#### 4.2 Modèles induits par manipulations génétiques

Ces modèles animaux de MICI ont été générés de façon fortuite car ils ont été créés pour l'étude de la fonction de ces gènes et une forte incidence de colite a été observée.

##### Les souris déficientes pour la chaîne $\alpha$ du TCR

Après trois à quatre mois de vie, les souris déficientes pour la chaîne  $\alpha$  du TCR (TCR $\alpha$ ) développent une diarrhée chronique, des prolapsus rectaux et un état de dépérissement (Table 4) (Mombaerts, Mizoguchi et al. 1993; Mizoguchi, Mizoguchi et al. 1996). Une unique population de LT TCR $\beta^+\alpha^-$  CD4 produit principalement de l'IL-4 et s'active face aux antigènes bactériens présents dans la lumière intestinale. Le traitement de ces souris par un anticorps bloquant l'IL-4 prévient l'apparition de lésions inflammatoires intestinales et induit un changement dans la polarisation de la réponse immune avec l'apparition de LT Th1 (Iijima, Takahashi et al. 1999). De plus, les souris déficientes pour le TCR $\alpha$  ainsi que pour l'IL-4 et l'IL-13 sont exemptes de lésions inflammatoires intestinales (Mizoguchi, Mizoguchi et al. 1999). Les souris déficientes pour le TCR $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$  développent une colite. L'ensemble de ces données suggèrent qu'une réponse immune de type 2 est associée avec l'inflammation intestinale dans ce modèle. De plus, étant donné que l'inflammation intestinale affecte seulement le côlon et le coecum, elle est proche de celle observée dans la RCH (Mizoguchi, Mizoguchi et al. 1996).

Model	Altered innate immune response	Excessive effector T-cell responses	Altered regulatory mechanisms	Bacterial flora driven	Known defects
Gαi2 deficient	✓		✓	Unknown	Defective epithelial barrier; defective regulatory B cells
Macrophage-PMN Stat-3 deficient	✓		✓	Probable	Increased response to LPS; resistant to IL-10 regulation
Bone marrow Stat-3 deficient	✓		✓	Probable	Increased response to LPS; impairment of innate immune function
IL-10 deficient	✓		✓	Yes	Lack Tr1 activity; lack TGFβ signaling
CD4 <sup>+</sup> , CD45RB <sup>hi</sup> transfer			✓	Yes	Decreased regulatory T cells
IL-2 deficient			✓	Yes	Decreased CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T cell
IL-2 receptor α deficient			✓	Probable	Decreased CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T cell
TCRα deficient			✓	Yes	Loss of a regulatory B cell
TGFβ1 deficient*	✓		✓	No	Decreased regulatory T cells
TGFβRII deficient*			✓	Unknown	Decreased regulatory T cells
Smad3 deficient*			✓	Unknown	Decreased regulatory T cells

*Extrait de Elson et al., Immunological Reviews, 2005 (Elson, Cong et al. 2005).*

**Table 4. Modèles animaux de MICI causés par un défaut de Treg.**

LSP : Lipopolysaccharide,

\* : inflammation multi-organe non limitée à l'intestin.

### Les souris déficientes pour l'IL-10

Les souris déficientes pour l'IL-10 présentent une anémie, un retard de croissance et une MICI chronique caractérisée par une infiltration transmurale de leucocytes. Dans ce modèle, le développement de l'inflammation résulte d'une dysfonction des LT CD4 (Table 4). En effet, le transfert de LT CD4 issus de la *lamina propria* inflammée de souris déficientes pour l'IL-10, chez des souris syngéniques immunodéficientes, provoque une colite (Davidson, Leach et al. 1996). L'administration d'anticorps bloquant l'IFN- $\gamma$  ou IL-12 prévient l'apparition de la MICI suggérant l'implication d'une réponse de type 1 (Berg, Davidson et al. 1996; Davidson, Hudak et al. 1998). Les souris déficientes conditionnellement pour *stat3* dans le compartiment myéloïde et les souris déficientes pour l'IL-10 développent une colite dont la physiopathologie est similaire (Takeda, Clausen et al. 1999). Cette étude suggère que les cellules du système immunitaire inné sont des cibles importantes de l'IL-10 dans l'intestin. De plus, l'IL-10 contribuerait à la maintenance de l'intégrité de la barrière intestinale (Shkoda, Ruiz et al. 2007).

### Les souris déficientes pour le TGF- $\beta$ 1 ou sa voie de signalisation

Le TGF- $\beta$  présente des effets pléiotropiques dans les mécanismes d'inflammation, de fibrose et d'immunosuppression selon sa concentration et sa localisation tissulaire. Les souris déficientes pour le TGF- $\beta$ 1 développent une inflammation affectant de multiples organes et meurent à cinq semaines d'âge (Diebold, Eis et al. 1995; Kulkarni, Ward et al. 1995). Un défaut des LT CD4 serait responsable du développement de ces manifestations (Table 4) (Diebold, Eis et al. 1995; Letterio, Geiser et al. 1996). En effet, les souris dont les LT CD4 expriment un dominant négatif du TGF- $\beta$ RII développent une colite avec un état de dépérissement et de la diarrhée (Gorelik and Flavell 2000).

#### 4.3 Le modèle de transfert cellulaire adoptif

Sur la base de l'expression de CD45RB chez la souris, les LT CD4 peuvent être divisés en deux sous-populations : les cellules exprimant fortement cette molécule qui sont majoritairement des cellules naïves et les cellules l'exprimant faiblement qui sont principalement des cellules mémoires et régulatrices. Le transfert de cellules T CD4 CD45RB<sup>high</sup> à des souris immunodéficientes syngéniques engendre le

développement d'une colite et un état de dépérissement (Table 4) (Powrie, Leach et al. 1993; Powrie, Correa-Oliveira et al. 1994). Le côlon des animaux ainsi transférés est épaissi, conséquence d'une hyperplasie de l'épithélium et de l'infiltration par des LT et macrophages de la *lamina propria* et de la sous-muqueuse. La réponse développée par les LT CD4 est de type 1 (Powrie, Correa-Oliveira et al. 1994; Leach, Bean et al. 1996; Mackay, Browning et al. 1998; Brimnes, Reimann et al. 2001). Par contre, le transfert de la contrepartie cellulaire, les LT CD4 CD45RB<sup>low</sup>, n'induit pas de pathologie. Le cotransfert des deux populations cellulaires protège les animaux hôtes du développement de la colite. Cette donnée suggère que la sous-population T CD4 CD45RB<sup>low</sup> contient des LT régulateurs. Ce modèle présente des caractéristiques des deux MICI chez l'Homme, la MC et la RCH. De façon intéressante, la molécule CD45RC chez le rat permet la distinction de deux sous-populations T CD4 présentant les mêmes caractéristiques fonctionnelles (Powrie and Mason 1990).

Une forte corrélation existe entre les gènes impliqués dans la physiopathologie de la colite induite par ce transfert cellulaire et les gènes de susceptibilité aux MICI chez l'Homme tels que l'*IL-10*, l'*IL-23R*, l'*IL-12B*, *STAT3* (Barrett, Hansoul et al. 2008; Franke, Balschun et al. 2008). Ainsi, ce modèle permet de tester l'implication de protéines du système immunitaire dans la physiopathologie des MICI. De plus, il est le meilleur pour disséquer les mécanismes effecteurs et régulateurs mis en jeu lors de colite et permettre une meilleure compréhension des rôles respectifs des Treg et des Tr1 dans le contrôle de l'inflammation intestinale (Strober, Fuss et al. 2002).

Cependant, une des limitations de ce modèle de transfert de cellules T CD4 naïfs est l'introduction de la prolifération homéostatique induite par l'immunodéficience de l'hôte. Cette variable favorise le développement d'auto-immunité (Coombes, Robinson et al. 2005).

#### 4.4 Les modèles animaux spontanés

La physiopathologie des MICI chez l'Homme est multifactorielle et très complexe. Les modèles animaux spontanés de MICI sont considérés comme les plus pertinents. Ils reproduisent plusieurs aspects de la physiopathologie des MICI chez l'Homme en comparaison avec les modèles induits. Les deux modèles décrits dans

ce paragraphe sont la conséquence de défauts du système immunitaire inné et adaptatif (Table 5).

#### Les souris SAMP/Yit et SAMP/YitFc

Ce modèle spontané d'inflammation intestinale partage de nombreuses caractéristiques avec la MC chez l'Homme. L'inflammation affecte en premier lieu l'iléon terminal (matsumoto gut 1998). Les analyses histologiques ont révélé la présence de lésions transmurales, la formation de granulomes et des altérations de la morphologie des cellules épithéliales (Kosiewicz, Nast et al. 2001). Les infiltrats inflammatoires sont composés de cellules mononuclées (LT, macrophages et plasmocytes) et de neutrophiles. Une altération de la barrière épithéliale (Vidrich, Buzan et al. 2005) et une réponse immune Th1 et Th2 (Bamias, Martin et al. 2005) seraient impliquées dans la physiopathologie de ce modèle. Ainsi, il est de choix pour l'étude des mécanismes physiopathologiques sous-jacents à la MC et pour la mise au point de traitements thérapeutiques.

#### Les souris C3H/HeJBir

Les souris C3H/HeJBir sont une sous-lignée de la lignée C3H/HeJ qui est très susceptible au développement de colite. Sous certaines conditions d'animalerie, ces souris présentent des signes d'inflammation intestinale de façon spontanée (Sundberg, Elson et al. 1994). Cette colite est focalisée, principalement localisée dans le caecum. Elle a disparu à trois mois d'âge. La réponse des cellules du système immunitaire inné suite à une stimulation via leur TLR est déficiente chez les souris C3H/HeJBir (Beckwith, Cong et al. 2005). D'autre part, les souris développent une réponse immune dépendante des LB et des Th1 contre les antigènes de la flore commensale. Leurs LT CD4 spécifiques d'antigènes entériques sont capables à eux-seuls de transférer la pathologie chez un hôte histocompatible et immunodéficient (Cong, Brandwein et al. 1998). Ces données furent les premières à démontrer formellement que des LT effecteurs spécifiques d'antigènes fécaux peuvent entraîner une MICI. Ce modèle a été très utilisé pour identifier les antigènes bactériens reconnus par les LT colitogéniques. Les flagellines bactériennes, tels que Cbir1 et FlaX, représentent 25% des épitopes immunodominants (Iodes JCI 2004).

Model	Altered innate immune response	Excessive effector T-cell response	Altered regulatory mechanisms	Bacterial flora driven	Known defects
Stat-4 transgenic		✓		Probable	Excessive T-cell responses to enteric bacteria
CD40L transgenic*		✓		Unknown	Increased activated T cells
TNF- $\alpha$ <sup>ARE*</sup>		✓		Unknown	Increased TNF- $\alpha$ production
A20 deficient*	✓	✓		Unknown	Increased response to LPS
C3H/HeJBir	✓	✓		Yes	Impaired innate responses to TLR ligands; increased bacterial reactive T cells
SAMP1/Yit	✓	✓		Yes	Epithelial cell defects; expanded B-cell population; increased activated T cells

Extrait de Elson et al., *Immunological Reviews*, 2005 (Elson, Cong et al. 2005).

**Table 5. Modèles animaux de MICI causés par une activation excessive des LT CD4 effecteurs.**

LSP : Lipopolysaccharide,

\* : inflammation multi-organe non limitée à l'intestin.

Ces modèles animaux de MICI ont été précieux pour définir certains mécanismes physiopathologiques de MICI tels que des altérations dans la fonction de barrière des cellules épithéliales intestinales et la régulation du système immunitaire inné et acquis (Elson, Cong et al. 2005). Cependant, ces modèles animaux sont soit aigus et se résolvent spontanément, soit chroniques et sans rémission, résultant éventuellement en la mort de l'animal. Le développement d'un modèle animal plus près de la physiopathologie des MICI humaines, reproduisant en particulier les phases de rémission et relapse typiques dans l'évolution clinique de la maladie chez l'Homme reste d'actualité.

## **Objectifs**

Une mutation récessive est survenue spontanément dans notre colonie de rats BN. Elle est responsable d'une lymphopénie T CD4 en périphérie. Cette mutation a été fixée permettant la génération d'une nouvelle lignée de rat appelée BN<sup>m</sup>, « m » pour muté.

Dans ce contexte, les objectifs de ma thèse ont consisté à:

- 1) étudier l'impact de la mutation sur le développement des LT et déterminer le(s) type(s) cellulaire(s) affecté(s). Pour cela, nous avons caractérisé la lymphopénie T par l'analyse de la fréquence et du nombre des sous-populations T CD4 et CD8, et des autres populations cellulaires du système immunitaire. Des expériences de chimères hématopoïétiques et de transferts intrathymiques de thymocytes DN nous ont permis d'évaluer l'origine cellulaire de cette lymphopénie.
- 2) analyser si la mutation influence la fonction des LT CD4 conventionnels et régulateurs. Pour cela, la prolifération et le profil de sécrétion de cytokines des LT CD4 conventionnels ont été analysés après une stimulation polyclonale en condition neutre. Les fonctions suppressives des LT CD4 régulateurs ont également été testées *in vitro* dans des expériences de coculture.
- 3) examiner les conséquences physiopathologiques de cette mutation. Pour cela, des études histopathologiques ont été réalisées sur divers organes et ont montré que la mutation est associée au développement spontanée de MICI. Afin de caractériser cette inflammation intestinale, différents paramètres ont été analysés sur une large cohorte de rats BN contrôles et BN<sup>m</sup>. Les mécanismes cellulaires impliqués dans la physiopathologie de cette MICI ont été étudiés par des expériences de transfert et de déplétion cellulaires.
- 4) identifier le ou les gène(s) responsable(s) de ces phénotypes par dissection génétique et études moléculaires.

# ***RESULTATS***

## ***Résumé de l'article***

### **Themis et susceptibilité aux maladies inflammatoires de l'intestin : analyse des mécanismes cellulaires impliqués**

La mutation spontanée des rats BN<sup>m</sup> résulte en une proportion diminuée de LT dans le sang. Dans un premier temps, l'analyse de la fréquence et du nombre absolu des LT CD4, des LT CD8, des LT $\gamma\delta$ , des LB, des NK et des macrophages a été effectuée en cytométrie de flux. Cette étude nous a permis de déterminer que seul le compartiment T CD4 est affecté. Des expériences de chimères hématopoïétiques et de transferts cellulaires intrathymiques de thymocytes DN ont permis de montrer que cette lymphopénie est intrinsèque au LT.

Cette mutation est associée au développement spontané de MICI. La caractérisation macroscopique de cette inflammation intestinale révèle la présence d'érythèmes et d'œdèmes associée à un raccourcissement de la longueur de l'intestin et à un épaississement de la paroi intestinale. Tous les segments du tractus intestinal sont affectés. L'analyse histologique révèle d'importants infiltrats inflammatoires composés de macrophages, de granulocytes et de quelques cellules T. L'inflammation intestinale est caractérisée par des concentrations élevées de cytokines telles que l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, l'IL-13 et le TNF- $\alpha$  et de chimiokines comme CCL2 et CCL3, dans les tissus lésés des rats BN<sup>m</sup>. Ces molécules pro-inflammatoires sont impliquées dans la physiopathologie des MICI en pathologie humaine. Ainsi, les rats BN<sup>m</sup> constituent un modèle de la maladie de Crohn chez l'Homme.

Afin de comprendre les mécanismes physiopathologiques sous-jacents à cette inflammation intestinale, l'impact de la mutation sur la fonction des LT CD4 conventionnels et régulateurs périphériques a été étudié. Suite à une stimulation polyclonale en condition neutre, les LT CD4 naïfs des rats BN et BN<sup>m</sup> présentent différents profils de production de cytokines. Les LT CD4 naïfs des rats BN<sup>m</sup> produisent des quantités élevées de cytokines de type 2 (IL-4, IL-5 et IL-13) et d'IL-17 associées à des niveaux moindres d'IFN- $\gamma$  par rapport au LT CD4 de rats BN contrôles. La déplétion des LT CD4 chez le rat BN<sup>m</sup> réduit la prévalence et la sévérité de la MICI, montrant l'implication de ces cellules dans le développement de la pathologie intestinale. Les fonctions suppressives des LT CD4 CD25<sup>bright</sup> issus de

rats BN et BN<sup>m</sup> ont également été testées dans des expériences de coculture *in vitro*. Ces expériences nous ont permis de montrer que les LT CD4 CD25<sup>bright</sup> périphériques et thymiques des rats BN<sup>m</sup> sont non fonctionnels. Afin de déterminer si ce défaut fonctionnel contribue au développement de la maladie intestinale chez le rat BN<sup>m</sup>, des transferts adoptifs de Treg de rats BN sauvages chez des rats BN<sup>m</sup> ont été effectués. Les Treg sauvages préviennent l'apparition de la MICI chez 92% des receveurs, suggérant que la mutation des rats BN<sup>m</sup> altère les fonctions suppressives des rats BN<sup>m</sup> et que ce défaut participe au développement de l'inflammation intestinale.

Enfin, une analyse de liaison complétée par une dissection génétique nous a permis de déterminer un locus de 1,5 Mb sur le chromosome 1, qui contrôle la lymphopénie chez le rat BN<sup>m</sup>. Des études de biologie moléculaire ont révélé une insertion de quatre paires de base dans le gène *Themis* responsable de son invalidation. Ainsi, Les rats BN<sup>m</sup> sont déficients pour *Themis*.

L'ensemble de ces résultats montre que *Themis* joue un rôle majeur dans la fonction des LT CD4 conventionnels et régulateurs et qu'il participe à l'homéostasie intestinale.

## Article

# A SPONTANEOUS MUTATION OF THE RAT THEMIS GENE LEADS TO IMPAIRED FUNCTION OF REGULATORY T CELLS LINKED TO INFLAMMATORY BOWEL DISEASE

By Marianne Chabod<sup>1,2,3</sup>, Christophe Pedros<sup>1,2,3</sup>, Lucille Lamouroux<sup>1,2,3</sup>, Céline Colacios<sup>1,2,3</sup>, Isabelle Bernard<sup>1,2,3</sup>, Dominique Lagrange<sup>1,2,3</sup>, Daniela Balz-Hara<sup>1,2,3</sup>, Jean-Francois Mosnier<sup>4</sup>, Christian Laboisse<sup>4</sup>, Nathalie Vergnolle<sup>1,2,3</sup>, Olivier Andreoletti<sup>5</sup>, Marie-Paule Roth<sup>1,2,3</sup>, Roland Liblau<sup>1,2,3</sup>, Gilbert J. Fournié<sup>1,2,3</sup>, Abdelhadi Saoudi<sup>1,2,3</sup>, and Anne S. Dejean<sup>1,2,3</sup>.

**Running Title:** Themis in immune and intestinal homeostasis

<sup>1</sup>UMR Inserm, U1043, Toulouse, F-31300, France

<sup>2</sup>UMR CNRS, U5282, Toulouse, F-31300, France

<sup>3</sup>Université de Toulouse, UPS, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan (CPTP), Toulouse, F-31300, France

<sup>4</sup>Université de Nantes, Faculté de Médecine, EA Biométadys, 44035 Nantes, France

<sup>5</sup>UMR INRA ENVT 1225, Interactions Hôtes Agents Pathogènes, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 31000 Toulouse, France.

**Correspondence:** Dr Abdelhadi Saoudi, UMR1043, CHU Purpan, BP 3028, 31024 Toulouse Cedex 3, France. Phone: 33-5-62744512, Fax: 33-5-62744558, E-mail: [abdelhadi.saoudi@inserm.fr](mailto:abdelhadi.saoudi@inserm.fr).

## ABSTRACT

Spontaneous or chemically induced germline mutations that lead to Mendelian phenotypes are powerful tools to discover new genes and their functions. Here, we report an autosomal recessive mutation that occurred spontaneously in a Brown-Norway (BN) rat colony and was identified as causing marked T cell lymphopenia. This mutation was stabilized in a new rat strain named BN<sup>m</sup> for “BN mutated”. In BN<sup>m</sup> rats, we found that the T cell lymphopenia originates in the thymus, is intrinsic to CD4 T lymphocytes and is associated with the development of an inflammatory bowel disease. Furthermore, we demonstrated that the suppressive activity of both peripheral and thymic CD4<sup>+</sup> CD25<sup>bright</sup> Tregs is defective in BN<sup>m</sup> rats. Complementation of mutant animals with BN Tregs decreases disease incidence and severity, thus suggesting that the impaired Treg function is involved in the development of inflammatory bowel disease in BN<sup>m</sup> rats. Moreover, the cytokine profile of effector CD4 T cells is skewed toward Th2 and Th17 phenotypes in BN<sup>m</sup> rats. Linkage analysis and genetic dissection of the CD4 T cell lymphopenia in rats issued from BN<sup>m</sup> x DA crosses allowed the localization of the mutation on chromosome 1 within a 1.5 megabase interval. Gene expression and sequencing studies identified a frameshift mutation caused by a four-nucleotide insertion in the *Themis* gene leading to its disruption. This result is the first to link *Themis* to the suppressive function of CD4 Tregs and to suggest that in *Themis*-deficient animals, defect of this function is involved in intestinal inflammation. Thus, this study highlights the importance of *Themis* as a new target gene that could participate in the pathogenesis of immune diseases characterized by chronic inflammation resulting from a defect in the Treg compartment.

## **AUTHOR SUMMARY**

Deciphering the genetic basis of human diseases and understanding the function of mammalian genes are among the main challenges for today's geneticists. In this regard, rodent models represent invaluable tools to identify new genes and to study their mechanisms of action in human diseases. Herein, we identified a spontaneous mutation responsible for a reduction of blood CD4 T lymphocyte number in a rat strain. The mutant rats showed a high incidence of inflammatory bowel disease, which was associated with skewed cytokine secretion by effector CD4 T cells towards Th2 and Th17 and with impairment of the suppressive activity of the regulatory CD4 T cells (Tregs). The contribution of Tregs was further evidenced by experiments showing that transfer of Tregs from normal BN rats to mutant animals prevented the occurrence of bowel lesions. By genetic mapping the lymphopenia, we identified a disruption of the *Themis* gene. This result is the first to link Themis to the suppressive function of CD4 Tregs and to suggest that in Themis-deficient animals, a defect of this function predisposes to intestinal inflammation. Thus, this new rat model highlights key roles of Themis both in regulating the immune system and in maintaining intestinal homeostasis.

## INTRODUCTION

Immune-mediated diseases are multifactorial disorders, resulting from complex interactions between multiple genes and the environment (Hunter 2005). Deciphering the genetic bases of these diseases is a difficult task. Genetic association studies in human have recently identified numerous risk loci associated with susceptibility to immune-mediated diseases (Xavier and Rioux 2008; Baranzini 2009; Sawcer, Hellenthal et al. 2011), but few causal genes have been unambiguously identified so far as being directly involved in a particular disease. In addition, identifying the exact mechanisms of action of these genes often remains a significant barrier to progress.

Mouse and rat models of human diseases are simplified systems in which environmental factors are under control and genetic heterogeneity is eliminated. They represent invaluable tools to identify new genes involved in human diseases. They also offer efficient systems for studying in-depth mechanisms of gene action. Two different and complementary approaches can be followed to investigate the function of a single gene and the pathological consequences of its dysfunction. First, the gene-driven approach can be used to investigate the consequences of the modification or invalidation of a known gene using genetically modified animals such as knock-out and knock-in models. Second, the phenotype-driven approach aims to elucidate the gene and mechanisms involved in a given phenotype identified either after a spontaneous mutation occurring in an animal colony (Davisson 2005), or generated by random mutagenesis with a mutagen such as N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) (Acevedo-Arozena, Wells et al. 2008).

Here, we report the identification of an autosomal recessive mutation responsible for T cell lymphopenia, which arose spontaneously in our Brown-Norway

(BN) rat colony, and was found to be associated with a high incidence of inflammatory bowel disease (IBD), skewed cytokine profile of effector T cells towards Th2/Th17 and inefficient natural regulatory CD4 T lymphocytes (Tregs). We thus sought to identify the mutated gene by positional cloning, and found a disruption of the *Themis* gene. Our study provides the first evidence for a role of Themis in CD4 T cell functions and in digestive tract homeostasis.

## RESULTS

### **BN<sup>m</sup> rats exhibit a defect in thymic CD4 T cell development.**

In the course of our ongoing studies on rat immunogenetics, we serendipitously observed that, within a litter of BN rats, ~1/4 of the offspring showed a marked reduction of the proportion of T cells in the peripheral blood. Intercrosses led us rapidly to conclude that a spontaneous autosomal recessive mutation was responsible for this lymphopenia (Figure 1A). This mutation, which leads to an unambiguous and fully penetrant phenotype, was isolated and stabilized to homozygosity in a new rat strain named BN<sup>m</sup> for “BN mutated”. Phenotypic analysis of cells from secondary lymphoid organs revealed that the proportion (Figure 1B) and absolute numbers (Figure 1C) of CD4 T cells were markedly reduced in spleen (Figure 1B-1C) and lymph nodes (LN) of BN<sup>m</sup> rats (Figure S1). Numbers of CD8 T cells, B cells, macrophages,  $\gamma\delta$  T cells and NK cells were not significantly affected (Figure 1C and data not shown). In the thymus, while no decrease was observed in double negative (DN), double positive (DP), or CD8 single positive (SP) thymocytes, the proportion (Figure 1D) and absolute numbers (Figure 1E) of CD4 SP cells of BN<sup>m</sup> rats were greatly reduced, showing that the CD4 T cell lymphopenia originates in the thymus. Results from bone marrow chimeras demonstrated that this CD4 T cell deficiency was intrinsic to hematopoietic cells and did not depend on the ability of thymic epithelial cells to support CD4 T cell differentiation (Figure 1F, Figure S2). Finally, by using intrathymic transfer of purified T cell precursors (DN thymocytes) from BN or BN<sup>m</sup> rats into (LEWxBN) F1 rats, we documented that this defect was intrinsic to T cells rather than being dependent on thymic environment (Figure 1G).

### **BN<sup>m</sup> rats develop inflammatory bowel disease.**

We looked for the presence of autoantibodies using sera from 12 week-old BN<sup>m</sup> (n=18) and BN rats (n=5). We found that sera from BN<sup>m</sup> exhibited autoantibodies that recognize gut (66%), kidney (50%), liver (50%) and lung (55%) tissues (Figure S3A). The antibodies recognized wall component(s) of arteriole and venule (liver, lung and kidney) and muscular layers in the intestine. In the kidney, a weak labeling was also observed in the glomerular mesangium. The nature of the labeled histological structures suggests that the autoantibodies are mainly raised against smooth muscles. These autoantibodies were undetectable in BN rats. We then examined organs from BN<sup>m</sup> and age-matched control BN rats and showed the presence of tissue inflammation affecting the gut of BN<sup>m</sup> rats. Indeed, macroscopic lesions were often observed in the intestinal tract from both male and female BN<sup>m</sup> rats (Figure 2A). Shortening of the intestine (Figure 2B) and thickening of the intestinal wall (Figure 2C) were associated with inflammatory features including oedema, erythema, and increased mucus secretion. The earliest intestinal lesions were detected in 7-week-old animals, and by 12 weeks of age, disease prevalence reached 50 percent (Figure S3B). Histological analyses revealed slight to severe multifocal infiltration of the intestine wall, involving preferentially the muscular layers and the submucosa (Figure 2D, Figure S3C), whereas the intestinal mucosa did not display any infiltration or ulcerative lesions. Lesions were scattered all along the intestine (Figure 2D). The infiltration was predominantly composed of polymorphonuclear cells and macrophages (CD68<sup>+</sup>) with few T cells (CD3<sup>+</sup>) and no B cells (B220<sup>+</sup>) (Figure 2E). In addition, granulomas composed mainly of macrophages and polymorphonuclear leucocytes were often observed (Figure 2D-2E). The infiltration of polymorphonuclear cells was confirmed by a significant increase in myeloperoxidase (MPO) activity in the duodenum, jejunum, ileum and colon samples

from BN<sup>m</sup> rats (Figure 2F). These inflammatory features were associated with increased levels of IL-6, TNF, IL-1 $\beta$ , IL-13, CCL2 and CCL3 in the intestinal tissues (Figure 2G). Transcript levels for IL-2 and IL-17 were also highly increased in the inflamed tissues from BN<sup>m</sup> rats (Figure 2H). To assess whether the CD4 T cell lymphopenia observed in BN<sup>m</sup> rats is sufficient to explain IBD development, wild type BN rats were thymectomized and treated with anti-CD4 depleting mAb. Using this protocol, we were able to induce a CD4 lymphopenia similar to that observed in BN<sup>m</sup> rats in term of number and phenotype of CD4 T cells (data not shown). However, lymphopenic BN rats did not develop clinical or histological manifestation of IBD (data not shown). These results suggest that the mutated gene is responsible for IBD occurrence via other mechanisms than simply induction of CD4 lymphopenia. Thus, BN<sup>m</sup> rats harbor mutation that predispose to inflammatory lesions of the whole intestine that share pathological features with human IBD.

**BN<sup>m</sup> rats exhibit spontaneous CD4 T cell activation and skewed cytokine production.**

As abnormal T cell activation is often associated with inflammatory diseases, we assessed the phenotype and functions of peripheral T cells in BN<sup>m</sup> rats. We observed an increased proportion of activated and memory-like CD4 T cells (OX40<sup>high</sup> CD62L<sup>low</sup> CD45RC<sup>low</sup> CD25<sup>high</sup>) in spleen (Figure 3A) and mesenteric lymph nodes (mLN) (Figure S4A). Moreover, CD4 T cells purified from BN<sup>m</sup> spleen (Figure 3B) and mLN (Figure S4B) exhibited an increased capacity to proliferate under low co-stimulatory conditions. At high doses of stimulation, CD4 T cells from BN and BN<sup>m</sup> rats proliferated equally well but BN<sup>m</sup> CD4 T cells produced higher amounts of IL-4, IL-5, IL-13, IL-10, IL-17, and lower amounts of IFN- $\gamma$  (Figure 3B and Figure S4B). To assess whether these phenotypes were the consequence of the

higher proportion of activated CD4 T cells in BN<sup>m</sup> rats, similar experiments were performed with purified naive CD62L<sup>+</sup> CD4 T cells. Under the same conditions of stimulation, although naive BN and BN<sup>m</sup> CD4 T cells proliferated equally well, they still differed in their cytokine production, particularly for IL-10, IL-17, and IFN- $\gamma$  (Figure 3C). Finally, we analyzed the contribution of CD4 T cells to IBD development in BN<sup>m</sup> rats and found that their depletion reduced both IBD incidence and severity (Figure S4C) indicating that CD4 T cells are involved in IBD development. Collectively, these data demonstrate that the mutation present in BN<sup>m</sup> rats influences CD4 T cell activation and differentiation into Th1/Th2/Th17 subsets and that CD4 T cells contribute to IBD development.

**The suppressive activity of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>bright</sup> regulatory T cells from BN<sup>m</sup> rats is defective.**

Immune-mediated inflammation of the gastrointestinal tract is commonly observed when natural Tregs, defined by the expression of Foxp3 and CD25, are dysregulated or deficient (Izcue, Coombes et al. 2009). We thus wondered whether the IBD developed spontaneously by BN<sup>m</sup> rats was the consequence of a quantitative and/or qualitative defect in the Tregs compartment. The absolute number of Tregs was indeed found to be reduced in the thymus, spleen and LNs from BN<sup>m</sup> compared to BN rats (Figure 4A). The proportion of CD4 Tregs in BN<sup>m</sup> thymus was decreased indicating that the mutated gene is also involved in thymic Foxp3<sup>+</sup> CD4 T cell development (Figure S5A). In contrast, this proportion was increased in spleen and mLNs (Figure S5A) suggesting that this quantitative defect of Tregs is unlikely responsible for IBD development. We therefore assessed the suppressive activity of Tregs in co-culture experiments using either thymic or peripheral CD25<sup>bright</sup> CD4<sup>+</sup> T cells (more than 85 % being Foxp3<sup>+</sup>). As shown in Figure 4B, peripheral as well as

thymic Tregs from BN<sup>m</sup> rats showed almost no suppressive activity, while Tregs from BN rats exerted a potent inhibition of the proliferation of CFSE-labeled effector CD4<sup>+</sup> T cells. Similar results were obtained using thymidine incorporation as a read-out of T cell proliferation (Figure S5B). Collectively, these data indicate that the mutation carried by BN<sup>m</sup> rats plays a crucial role in the development and function of Foxp3<sup>+</sup> Tregs.

To investigate the relationship between this defect in Tregs and the development of IBD, we assessed whether Tregs with normal suppressive functions could prevent the development of inflammatory bowel lesions in BN<sup>m</sup> rats. To this end, we performed adoptive transfer experiments of Tregs from BN rats into BN<sup>m</sup> rats. We found that transfer of 4.10<sup>6</sup> CD25<sup>bright</sup> CD4<sup>+</sup> T cells from BN rats into 4 week-old BN<sup>m</sup> rats significantly protected the recipients from intestinal inflammation (Figure 4C-4D). Indeed, while the prevalence of intestinal lesions in 12-week-old BN<sup>m</sup> rats was 43% (9/21), only 8% (1/11) BN<sup>m</sup> rats transferred with CD25<sup>bright</sup> CD4<sup>+</sup> T cells from BN rats showed macroscopic lesions (Figure 4C). Histological analyses confirmed this observation, showing lower scores of lesions in BN<sup>m</sup> rats transferred with BN Tregs, with a decreased cellular infiltration of the intestine wall and the absence of granuloma (Figure 4D). This prevention was associated with decreased amounts of TNF, IL-4, IL-13, IL-6 and CCL2 in intestinal tissues (Figure 4E). Altogether, these results led us to conclude that in BN<sup>m</sup> rat, the defect in Treg suppressive function contributes to the development of IBD.

### ***Themis* is disrupted in BN<sup>m</sup> rats**

To localize the gene responsible for CD4 T cell lymphopenia, 44 rats obtained from a (BN<sup>m</sup>xDA)xBN<sup>m</sup> backcross were genotyped using 98 microsatellite markers polymorphic between the parental strains and distributed across the genome. A

genome-wide scan was performed using R/qtl and permutations of the phenotypes to define genomewide LOD thresholds of 5% and 0.1% (termed here significant and highly significant, respectively). As shown on Figure 5A, a highly significant quantitative trait locus (QTL) controlling the percentage of CD4 T cells was found in a 8 cM interval of chromosome 1 (peak LOD score of 16.45;  $p < 0.0001$ ). This QTL accounts for 82% of the total variance of the trait. As shown on Figure 5B, when the 44 rats are separated according to their genotype at the microsatellite marker nearest to the QTL peak, D1Rat1, rats with the 'nd' genotype have, similarly to their F1 parents, high CD4 T cell percentages. In contrast, rats with the 'nn' genotype have low percentages in the range of those observed in their inbred backcross parents BN<sup>m</sup>. The trait distribution in the 44 rats is clearly discontinuous and falls into two equally populated classes that are separated by the genotype at the D1Rat1 marker. The percentage of CD4 T cells is therefore controlled by a mutant allele at a single locus in the 8-cM QTL region of chromosome 1. Further genotyping using 7 additional microsatellite markers allowed the localization of the gene on chromosome 1 within a ~10.3 Mb interval. To reduce this region further, 12 additional markers were used to genotype 379 rats obtained from (BN<sup>m</sup>xDA) x BN<sup>m</sup> or (BN<sup>m</sup>xDA) F2 crosses and, as shown on Figure 5C, only the genotypes at markers mapping to a small 1.5 Mb interval of the initial region between 16.27Mb (D1Cel39) and 17.75Mb (D1Cel10) were able to separate rats with CD4 T cell lymphopenia and rats with normal CD4 counts. According to RGD (Rat Genome Database: <http://rgd.mcw.edu/>) and Ensembl ([http://www.ensembl.org/Rattus\\_norvegicus/Info/Index](http://www.ensembl.org/Rattus_norvegicus/Info/Index)) databases, this region contains six genes (Figure 5C), including *Themis* and *Ptprk*, which have both been described as involved in T cell development (Kose, Sakai et al. 2007; Fu, Vallee et al. 2009; Johnson, Aravind et al. 2009; Lesourne, Uehara et al. 2009;

Patrick, Oda et al. 2009). Study of mRNA expression of these six genes in thymocytes from BN<sup>m</sup> rats by quantitative RT-PCR revealed a significant decrease only for *Themis* mRNA expression (Figure 5D). Sequencing of coding sequences revealed a frameshift mutation in the *Themis* gene of BN<sup>m</sup> rats, resulting from a four-nucleotide insertion, which introduces a premature stop codon (Figure 5E). By contrast, no polymorphism was found between the BN and BN<sup>m</sup> strains in the sequences coding for *Ptprk* (data not shown). Consistent with these findings, western blot analysis using Themis specific antibodies that recognize either the N- or C-terminal fragments of the protein revealed no detectable Themis expression in BN<sup>m</sup> thymocytes whereas it was detectable at the predicted size of 73 kDa in protein extracts from BN rats (Figure 5F). Together, these data strongly suggest that the CD4 T cell lymphopenia observed in BN<sup>m</sup> rats results from a disruption of the *Themis* gene and that the BN<sup>m</sup> rat thus represents a spontaneous Themis-knock-out rat model.

## DISCUSSION

In the present study, we serendipitously discovered a spontaneous mutation in the BN rat strain, which leads to lymphopenia and increased susceptibility to inflammatory bowel disease. We have mapped this mutation to a microinsertion of four nucleotides causing the disruption of the gene encoding the Themis protein. Themis (thymocyte-expressed molecule involved in selection), also known as Gasp (Grb2-associating protein), has been recently identified in mice as an essential component of the early TCR machinery (Brockmeyer, Paster et al. 2011) that plays an important role in positive selection during thymic T cell development (Fu, Vallee et al. 2009; Johnson, Aravind et al. 2009; Lesourne, Uehara et al. 2009; Patrick, Oda et al. 2009). Indeed, Themis deficient mice have considerably fewer thymic and peripheral CD4 and CD8 T cells but CD4 population is affected more severely than CD8 populations (Fu, Vallee et al. 2009; Johnson, Aravind et al. 2009; Lesourne, Uehara et al. 2009; Patrick, Oda et al. 2009). In our rat model, the consequence of the Themis deficiency was found to affect more specifically the CD4 T cell compartment. In the effector T cell compartment, the absence of Themis is associated with CD4 T cell activation, increased production of Th17-Th2 cytokines and reduction of IFN- $\gamma$  production. Concerning the Treg compartment, not only was the proportion and absolute numbers of thymic CD4 Tregs decreased in Themis-deficient rats, but the Themis-deficient CD4<sup>+</sup> CD25<sup>bright</sup> T cells also exhibited a defect in their suppressive activity. We found that this defect contributes to the spontaneous development of IBD in BN<sup>m</sup> rats since their complementation with BN Tregs decreases disease incidence and severity. Finally, the majority of diseased BN<sup>m</sup> rats (77%) harbors autoantibodies against intestinal tissues. Thus, our study highlights

the contribution of Themis to both the immune system and intestinal homeostasis.

BN<sup>m</sup> rats develop an inflammatory disease that affects preferentially the gut tissue and this might be related to the BN genetic background since we found that BN rats were highly sensitive to TNBS induced colitis (our unpublished data). Of note, in Themis-deficient mice, no pathological manifestations have been reported. The difference in species or the particular BN genetic background might explain this distinct susceptibility to IBD. This raises interesting questions regarding the basis for the similarities and differences between the roles of Themis in regulating the immune systems and the digestive track homeostasis in mouse versus rat. Among the rodent models of T cell immunodeficiency in which the development of an IBD has been reported, the Long-Evans Cinnamon (LEC) rat model is of particular interest. Similarly to BN<sup>m</sup> rats, an arrest in the maturation of thymocytes from CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> to CD4<sup>+</sup> SP was observed in LEC rats (Agui, Oka et al. 1990). While two groups initially attributed this defect to the invalidation of the *Ptprk* gene (Asano, Tsubomatsu et al. 2007; Kose, Sakai et al. 2007), a subsequent report suggested that, in LEC rats, immunodeficiency results from a combined deletion of both *Ptprk* and *Themis* genes (Iwata, Sasaki et al. 2010). LEC rats also developed IBD but the disease is different from the IBD developed by BN<sup>m</sup> rats. Indeed, inflammatory lesions in LEC rats are restricted to the cecum and colon while inflammation affects the whole intestine in BN<sup>m</sup> rats. Moreover, the disease in LEC rats is associated with an increased secretion of Th1 cytokines while it is associated with a Th2/Th17 cytokine imbalance in BN<sup>m</sup> rats. Finally, LEC rats, but not BN<sup>m</sup> rats, also developed Wilson disease. These differences between LEC and BN<sup>m</sup> rats can be attributed to difference in genetic backgrounds or more likely to a complex interplay between *Ptprk* and *Themis* in LEC rats. The present study clearly establishes that *Themis* impacts on Treg

suppressive function, independently of *Ptprk*, and that this effect is involved in the development of IBD lesions.

Our results document that Themis acts as a key player in the suppressive function of Tregs at an early stage of thymic development, independently of lymphopenia and inflammation. Indeed, the defect in Tregs in BN<sup>m</sup> rats is present in CD4 SP thymocytes and is observed in the periphery of 6-week-old animals, at a time when inflammatory bowel lesions have not yet developed. The impaired function of Tregs observed in BN<sup>m</sup> rats probably contributes to the pathophysiology of IBD since complementation of BN<sup>m</sup> rat with wild type Tregs inhibited disease development. Finally, analysis of the expression of CTLA-4, GITR, IL10R, TGFβR and Foxp3 by quantitative RT-PCR did not reveal any difference between Tregs from BN and BN<sup>m</sup> rats (data not shown) indicating that defective expression of these molecules is not the cause of impaired Treg functions. The impact of Themis on T cell thymic selection, and on mature T cell functions likely results from its role in proximal signaling downstream of the TCR. Indeed, after TCR triggering, Themis is phosphorylated on tyrosine residues within seconds in both mouse and human T cells (Brockmeyer, Paster et al. 2011). This phosphorylation depends on LAT, Lck and SLP-76 (Brockmeyer, Paster et al. 2011) and allows Themis to act as an adaptor protein that binds to LAT, Grb2 and PLC-γ. Consistent with our data, mice deficient for Themis partners such as PLC-γ or LAT also develop immune-mediated diseases that are associated with a defect in the suppressive functions of CD4 Tregs (Sommers, Lee et al. 2005; Koonpaew, Shen et al. 2006; Fu, Chen et al. 2010). Moreover, despite normal Foxp3 expression, Themis, LAT or PLC-γ deficient CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells were ineffective in controlling the proliferation of effector cells (Koonpaew, Shen et al. 2006; Chuck, Zhu et al. 2010; Fu, Chen et al. 2010).

Together these data suggest that the Themis/LAT/PLC- $\gamma$  signaling hub is mandatory for the suppressive functions of Foxp3<sup>+</sup> CD4 T cells.

In humans, the etiology of IBD is still unknown. The consensus hypothesis is that, in genetically predisposed individuals, both environmental factors such as the luminal content and endogenous factors (defects in barrier, vascular or neuronal functions) trigger an uncontrolled inflammatory response (Cho 2008). The main forms of IBD are Crohn's disease and ulcerative colitis, which differ mostly by the region of the gut where inflammation progresses and the depth of inflammatory damage. While ulcerative colitis progresses from the rectum towards the colon, presenting only superficial (mucosal) damage, Crohn's disease can affect all parts of the digestive tract and is characterized by transmural damage and inflammatory cell infiltration (Abraham and Cho 2009). Themis-deficient BN rats display several lesion characteristics shared with Crohn's disease. Inflammation in BN<sup>m</sup> rats involves the entire intestinal tract (from the duodenum to the distal colon) and appears patchy all along the digestive tract. Inflammatory cells infiltrates were found in deep layers of the intestine in BN<sup>m</sup> rats (submucosa and muscle layers) and the granulomas observed were very similar to those seen in Crohn's disease (Podolsky 2002; Marks, Harbord et al. 2006). In contrast to Crohn's disease, however, IBD in Themis-deficient rats does not show superficial mucosa damage, diarrhea or bleeding.

To date, the genomic region bearing *Themis* has not been identified as a susceptibility locus in genome-wide association studies performed in patients suffering from IBD (Barrett, Hansoul et al. 2008; Franke, McGovern et al. 2010). Such an association, however, has been found in patients suffering from celiac disease, another multi-factorial immune-mediated disease of the intestinal tract (Dubois, Trynka et al. 2010). Both diseases share common physiopathological features such

as an initial increase in intestinal permeability and the T helper pattern of the immune response (Festen, Szperl et al. 2009). Accordingly, the two diseases can co-occur within families or individual patients and the prevalence of IBD is increased in patients suffering from celiac disease (Tursi, Giorgetti et al. 2005; Casella, D'Inca et al. 2010). Recently, a meta-analysis of genome-wide association data from celiac disease and Crohn's disease has identified several risk loci shared by both diseases (Festen, Goyette et al. 2011), thus adding further support for common pathophysiological pathways and to the possible involvement of *THEMIS* in human IBD. Nowadays, it is estimated that the identified genes associated with IBD represent only a fraction of the genetic risk (Xavier and Rioux 2008). Many susceptibility genes still remain to be discovered. Gene identification in humans is hampered by several factors including variable penetrance, low relative risk associated to a single disease allele, epistasis, genetic heterogeneity of human populations and variability of environmental factors that interact with genetic factors (Lettre and Rioux 2008). Thus, animal models of IBD, which develop under stable and controlled laboratory conditions, represent a very useful tool to study the pathogenesis of IBD by identifying the genes involved and deciphering their mechanisms of action. We propose that *Themis*, with regard to its role on CD4 T cell functions and thus on immune system homeostasis, should now be considered henceforth as a candidate gene for IBD susceptibility, as well as for other immune mediated diseases where a dysfunction of Tregs is documented or suspected. The rat model we describe will probably help to understand how Themis directs Treg function, which is indeed an important issue given the pivotal role of Tregs in maintaining immunological tolerance.

In conclusion, our study highlights the importance of spontaneous mutations in developing new animal models of human genetic disorders, which are invaluable tools for hunting new genes and analyzing their functions. Herein, we describe a rat model of spontaneous IBD that shares many features with Crohn's disease. We found a disruption of the gene encoding Themis, which leads to impaired regulatory T cell function, thus favoring IBD development. While the role of Themis in thymic positive selection had been previously established, our study provides the first evidence for a role of Themis in homeostasis of the digestive tract through an effect on the suppressive function of natural CD4 Tregs. We thus believe that Themis dysfunction could also participate in the pathogenesis of other diseases characterized by chronic inflammation resulting from a defect in the Treg compartment.

## MATERIALS AND METHODS

**Animals.** Brown-Norway (BN), Lewis (LEW) and Dark-Agouti (DA) rats were obtained from Janvier Laboratories (Le Genest-Saint-Isle, France) and bred and maintained under specific pathogen-free conditions in our facility, in accordance with European guidelines. The mutation responsible for CD4 T cell lymphopenia arose spontaneously in our colony of BN rats after brother and sister mating. Lymphopenic rats were intercrossed to create the new strain, homozygous for the recessive mutation, called BN<sup>m</sup>. This study was carried out in accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health. The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments (Licence number: 31259).

### **Antibodies, flow cytometry and isolation of leukocyte subpopulations.**

Cell suspensions were prepared from thymus, spleen, mLN or BM. The mAbs used were as follows: OX6 (anti-rat MCH class II), OX8 (anti-rat CD8 $\alpha$ ), OX27 (anti-rat RT1-A<sup>c,n</sup>), OX33 (anti-rat CD45RA), OX39 (anti-rat CD25), B5 (anti-rat RT1-A<sup>a,b,l</sup>), V65 (anti-rat TCR $\gamma\delta$ ), 3.2.3 (anti-rat NKR-P1), ED1 (anti-rat CD68), W3/25 (anti-rat CD4), R73 (anti-rat TCR $\alpha\beta$ ) and 341 (anti-rat CD8 $\beta$ ). The mAbs used for flow cytometry were either prepared in our own laboratory or purchased from Biolegend, Abd Serotech, BD Biosciences and eBioscience. For isolation of CD4 T cells, cell suspension prepared from spleen and LN were incubated with a mixture of the following mAbs: OX6, OX33, 3.2.3, V65 and OX8 and were negatively selected using anti-mouse IgG magnetic microbeads (Dyna, Oslo, Norway). For Treg purification, negatively selected CD4 T cells were stained with 341-FITC (anti-rat CD8a), R73-APC (anti-rat TCR $\alpha\beta$ ), W3/25-PB (anti-rat CD4), and OX39-PE (anti-rat CD25) and

electronically sorted using a Facs Aria II-Sorp (BD Bioscience). The purity of the sorted cells was checked and found to be higher than 98%.

**Radiation bone marrow chimeras.** (LEWxBN) F1 recipient male rats were subjected to 8.5 Gy total body irradiation ( $^{137}\text{Cs}$  source) 1 day before bone marrow transplantation from BN or BN<sup>m</sup> rats. Recipients were sacrificed 16 weeks after transfer. The extent of hematopoietic cell replacement by donor cells was analyzed using RT1-A haplotype-specific mAbs and was consistently up to 96%.

**Intrathymic transfer of DN thymocytes.** (LEWxBN) F1 recipient male rats were subjected to 2.5 Gy total body irradiation ( $^{137}\text{Cs}$  source) 1 day before intrathymic DN cell transplantation. DN cells were purified from the thymus by negative selection using anti-CD4 (W3/25) and CD8 (OX8) mAbs and anti-mouse IgG magnetic microbeads (Dyna, Oslo, Norway). Recipients were killed two weeks after transfer, and thymus was analyzed for the origin of immune cells, using RT1-A haplotype-specific mAbs.

**Linkage analysis and fine mapping.** For the initial genome screen, the percentage of CD4 T cells was assessed in 44 rats obtained from a (BN<sup>m</sup>xDA) x BN<sup>m</sup> backcross. These rats were genotyped for 98 polymorphic microsatellite markers spread across the genome at 20-30 cM intervals as already described (Cavaillès, Sergent et al. 2006). The R/qtl program (Broman, Wu et al. 2003) was used for mapping loci controlling the phenotypic trait (QTLs) and genomewide thresholds of 5% and 0.1% significance were derived from 10,000 permutations of shuffled phenotypes. Further genotyping using 7 additional microsatellite markers allowed the localization of the gene on chromosome 1 within a ~10.3 Mb interval. Then, genetic dissection of the region harboring the mutated gene was conducted in (BN<sup>m</sup>xDA) x BN<sup>m</sup> backcrosses and (BN<sup>m</sup>xDA) F2 hybrid rats. For this purpose, a genetic map with

a high density of markers was constructed. Among the 379 rats that were genotyped and phenotyped for CD4 lymphopenia, 28 rats showed recombination within the ~10.3 Mb and were further genotyped using 12 additional microsatellite markers, allowing the localization of the mutated gene within a ~1.5 Mb interval. The sequences of the forward and reverse primers of the new markers used for the fine mapping of the genetic defect and designed *in silico* are the following:

D1Cel39: F-CCACAGTGTTTGAGTGAAAGGCCT;  
R-CATGATTGCTGTGCTGTGTGTGTG;  
D1Cel5 : F-CAAATTAGATACAATCCACTTGGG;  
R-TTCAGTAACCTGTATGAATGCTTA;  
D1Cel24 : F-TGCTCACGAGTCTATCTCCCAGGT;  
R-GGGCAGCTCTTGAGATTCAGGTG;  
D1Cel10: F-AGCACCTGCATTCACAATGACACA;  
R-GCTTTTCAGCACTAGCCTTCCCTT

The physical map of the interval was extracted from the rat genome V3.4 assembly at the rat genome database (<http://rgd.mcw.edu/>).

**Quantification of mRNAs by RT-PCR.** Total RNA was prepared using the RNeasy kit (Qiagen). cDNA generated by SuperScript III (Invitrogen) was analyzed using primers for the indicated genes. Real-time PCR was performed using SYBR green. Results were normalized to Atp5b expression levels. The primers used were as follows:

IL-2: F-AAGCAGGCCACAGAATTGAAAC;  
R-GCTGCAGAGCTCCGAGTTCAT  
IL-17: F-AGCCGCAATGAGGACCCT;  
R-ATGTGGTGGTCCAACCTCCC

Ahi1: F-AGAGCGAGCCCATTCTTCTT;  
R-CTGTAGCGCTTCAACATTTCA

Aldh8: F-GATAGCCAAGCCCAGCGA;  
R-CCTGGTGGCACACCTGCT

Hbs1l: F-GAGAGCATGGCCTTTTGGTC;  
R-GTTGCCAATTTACCTGGTCCA

Myb: F-CCCCAAATATTCTTACGAGCTCTG;  
R-GTACGGTAAAGGCTTTGAGAACG

Ptprk: F-AGAAGCCTGCTTATGTGGAGA;  
R-TCAAAATATGCAGCTTTAAATTCG

Themis: F-TTCGAGCTGCCCATGAAT;  
R-TCCATTGTCAGGTATGGAGTTTT

Atp5b: F-CTATGACCATCTCCCGGAACA;  
R-CAGCTTGTCAGCCTTTGCC

**Western blot.** Cells were harvested in lysis buffer containing a cocktail of protease and phosphatase inhibitors (Complete Mini, EDTA-free; Roche). Proteins were separated on 10% NuPAGE midi gels (Invitrogen) and blotted onto nitrocellulose membranes. Membranes were probed with anti-Themis rabbit polyclonal antibody that recognize the C-terminal portion of mouse Themis (kindly provided by Paul E Love) or with a monoclonal antibody that recognize the N-terminal portion of human Themis (Sigma) and then probed with  $\beta$ -actin mAb antibody (clone AC-15, Sigma), before incubation with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Amersham). Signals were revealed with SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate (Pierce).

**Sequencing.** Sequencing of *Themis* and *Ptprk* coding regions was performed according to data available on genomic databases. Total RNA was extracted (RNeasy minikit, Qiagen), and reverse transcribed (SuperScript III first-strand synthesis kit, Invitrogen). Sequencing reactions were carried out with the BigDye Terminator version 3.1 (Applied Biosystems) and recorded on ABI 3130XL. Sequences were analyzed with Vector NTI software (InforMax).

**Proliferative response, cytokine assays and Treg suppression assays.** For cytokine production assays, total CD4 T cells or naive CD62L<sup>+</sup> CD4 T cells (10<sup>5</sup>/well) were purified and stimulated with plate-bound anti-TCR (R73, 1 µg/ml) and soluble anti-CD28 (JJ319, 0.01 to 0.2 µg/ml) in 96-well flat-bottom plates for 48 hours in complete RPMI (Invitrogen). Cytokine production was examined in the cell supernatants by Luminex multiplex kit (Millipore). For Treg suppression assays, CD4<sup>+</sup> CD25<sup>bright</sup> were sorted using a FACS Aria II-Sorp (BD Bioscience). Co-culture experiments were performed using naive Lewis CD4 T cells (10<sup>5</sup>/well) stained with CFSE (Peprotech) as effector cells. These cells were stimulated with irradiated syngeneic APC (0.5x10<sup>5</sup>/well; T cell-depleted splenocytes) and plate-bound anti-CD3 mAb (G4.18; 0.5 µg/ml) in the presence of 0.5x10<sup>5</sup> Tregs purified from the spleen or thymus. CFSE dilution was estimated by flow cytometry after 60 hours of culture. Proliferation was also analyzed by [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation during the last 18 hours of culture.

**Transfer of wild type CD25<sup>bright</sup> CD4<sup>+</sup> T cells.** Four week-old BN<sup>m</sup> rats were transferred with PBS (control) or 4.10<sup>6</sup> of FACS-sorted CD25<sup>bright</sup> CD4<sup>+</sup> T cells purified from the spleen and LN of BN rats. 8 weeks after transfer, BN<sup>m</sup> were sacrificed and intestinal inflammation was assessed as described below. Samples of duodenum were collected to perform the microscopic analysis and the dosage of cytokine concentrations.

**Histology and immuno-histochemistry.** Skin, liver, pancreas, lung, heart, brain, testis, thyroid, the entire gastrointestinal tract, aorta, spleen, thymus and LN were dissected and fixed in 4% paraformaldehyde before paraffin embedding and processing for conventional hematoxylin-eosin staining. Selected panels of serial sections were processed for immuno-histochemical labeling with anti-CD3 (polyclonal rabbit serum, IR503, Dako), B220 (OX33 hybridoma supernatant) and CD68 (ED1 hybridoma supernatant) antibodies. Two pathologists evaluated the intestinal lesions independently using Wallace's score.

**Autoantibodies detection.** For the detection of autoantibodies directed against gut, liver, lung or kidney, tissues isolated from SCID/Beige BALB/c mice were snap frozen in liquid nitrogen and 3-5µm sections were cut using a cryomicrotome. Sections were fixed in acetone at -20°C for 20min and stored at -80°C. Sera diluted in PBS 0.1% BSA were applied at the chosen dilution (1/200) for 60 min at room temperature. After rinsing twice in PBS, slides were incubated for 30 min with a goat anti-rat immunoglobulin G Alexa Fluor 488-antibody (Jackson ImmunoResearch). Slides were then washed twice in PBS before mounting in anti-fading medium and direct observation with immunofluorescence microscopy. The intensity of immunofluorescent staining was blindly evaluated by O.A.

**Quantification of myeloperoxidase activity and cytokine levels in intestinal tissues.** MPO activity was measured as an index of granulocyte infiltration. Briefly, tissue samples were homogenized in a solution of 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide and supernatants were added to O-dianisidine dihydrochloride solution supplemented with 1% hydrogen peroxide. Optical density readings were taken at 450 nm. For cytokine analysis, intestinal samples were homogenized with Precellys beads (Ozyme) in 250 µL of cell lysis

buffer (Cell Signaling Technology) containing a cocktail of protease and phosphatase inhibitors (Complete Mini, EDTA-free; Roche). Supernatants were assessed for cytokines by Luminex multiplex kit (Millipore) and for protein levels using Bradford Reagent (Bio-Rad).

**Statistical analysis.** Results were expressed as means  $\pm$  s.e.m. Comparisons between groups were done by the unpaired Student's *t test* using Prism software. Fisher's exact test was used to analyze the prevalence and macroscopic scores in BN<sup>m</sup> rats having received or not normal regulatory T cell from BN rats. Results were considered statistically significant when the p value was  $\leq 0.05$ .

ns: not significant; \*:  $p \leq 0.05$ ; \*\*:  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0.001$ .

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We would like to thank Renaud Lesourne and Paul E. Love for providing us the Themis-specific antibody, Daniel Dunia, Etienne Joly, Lennart Mars and Philippe Druet for their critical comments on the manuscript. We would also like to thank the flow cytometry core facility (CPTP) and the animal house staff members and the histopathology core facility for their technical assistance (UMS 06).

## **FIGURE LEGENDS**

### **Figure 1. BN<sup>m</sup> rats exhibit a T cell autonomous lymphopenia restricted to CD4**

#### **T cells**

(A) Percentage of TCR $\alpha\beta$  positive cells in PBMC from BN (n=15, black bars), BN<sup>m</sup> (n=9, white bars) and (BNxBN<sup>m</sup>) F1 (n=5, grey bars) rats. (B) CD4 and CD8 expression in BN and BN<sup>m</sup> spleen T cells; numbers indicate the cell percentages in the outlined area. (C) Absolute numbers of BN (n=4) and BN<sup>m</sup> (n=9) T cells, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, and B cells in spleen. Data in B and C are representative of five independent experiments. (D) CD4 and CD8 expression in BN and BN<sup>m</sup> thymocytes; numbers indicate cell percentages in the outlined area. (E) Absolute numbers of BN (n=5) and BN<sup>m</sup> (n=5) in thymocyte subsets (DN: double negative; DP: double positive; SP: simple positive). Data in D and E are representative of six independent experiments. (F) Absolute numbers of lymphocytes in spleen of lethally irradiated (LEWxBN) F1 rats reconstituted with BN (n=6) or BN<sup>m</sup> (n=8) T cell-depleted bone marrow cells. Data are representative of three independent experiments. (G) Absolute numbers of donor CD4 SP and CD8 SP cells in thymus of sub-lethally irradiated (LEWxBN) F1 rats 15 days after intrathymic injection of DN thymocytes from BN (n=4) and BN<sup>m</sup> (n=4) rats. (BN: black columns, BN<sup>m</sup>: white columns).

### **Figure 2. BN<sup>m</sup> rats develop inflammatory bowel disease**

(A) Small intestine and colon from 12-week-old BN and BN<sup>m</sup> rats. (B, C) Length of small intestine and colon (B) and thickness of the duodenum, jejunum, ileum and colon (C) of BN (n=10) and BN<sup>m</sup> rats with macroscopic signs of intestinal lesions (n=7). (D) Hematoxylin-eosin staining of duodenum, jejunum and colon from 8 to 10

week-old BN and BN<sup>m</sup> rats. Images are representative of microscopic lesions observed in all affected BN<sup>m</sup> rats (original magnification: 100X). Stars indicate granulomas; arrows point to infiltrations and double head arrows indicate the thickness of the intestinal wall. (E) CD68, CD3 and B220 immunoperoxidase staining on sections of jejunum from 8 week-old BN<sup>m</sup> rats. Positive staining results in a brown reaction product. HE: hematoxylin-eosin staining showing the presence of polymorphonuclear leucocytes (original magnification: 400X). (F) Myeloperoxidase (MPO) activity in the duodenum, jejunum, ileum and colon tissue samples from BN (n=30) and BN<sup>m</sup> rats with macroscopic lesions (n=21). (G) Cytokine and chemokine protein expression in duodenum from BN (n=7) and BN<sup>m</sup> rats with macroscopic lesions (n=7). (H) Relative mRNA expression of IL-2 and IL-17A in duodenum from BN (n=4) and BN<sup>m</sup> rats exhibiting intestinal macroscopic lesions (n=7). (BN: black columns, BN<sup>m</sup>: white columns).

**Figure 3. BN<sup>m</sup> rats exhibit spontaneous T cell activation and skewed cytokine production.**

(A) Proportions of OX40<sup>high</sup>, CD62L<sup>low</sup>, CD45RC<sup>low</sup> and CD25<sup>high</sup> among CD4 T cells from spleen of BN (n=4) and BN<sup>m</sup> (n=8) rats. (B) Proliferation was assessed by [<sup>3</sup>H]thymidine uptake in total CD4 T cells isolated from BN (n=4) and BN<sup>m</sup> (n=4) spleen and stimulated for 48 hours with anti-TCR mAb and increasing concentrations of anti-CD28 mAb (left panel). Cytokine production by CD4 T cells stimulated with anti-TCR mAb and 0.2µg/ml of anti-CD28 mAb for 48 hours (right panels). (C) Proliferation (left panel) and cytokine production (right panels) by naïve CD62L<sup>+</sup> CD4 T cells isolated from BN (n=4) and BN<sup>m</sup> (n=4) spleen and stimulated as described above. Data are representative of three independent experiments. (BN: black columns, BN<sup>m</sup>: white columns).

**Figure 4. Impaired suppressive function of BN<sup>m</sup> Tregs is involved in the development of intestinal lesions**

(A) Absolute numbers of Foxp3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells in thymus, spleen and mLN from BN (n=7) and BN<sup>m</sup> (n=13) rats. Data are representative of three independent experiments. (B) Suppressive activity of thymic CD25<sup>bright</sup> CD4<sup>+</sup> SP cells (top panel) and peripheral CD25<sup>bright</sup> CD4<sup>+</sup> T cells (bottom panel) from BN or BN<sup>m</sup> rats was assessed in co-culture experiments with CFSE-labeled naive LEW CD4 T cells as effector cells. Proliferation was assessed by CFSE dilution (percentages indicate the proportion of CFSE<sup>low</sup> cells). Data are representative of three independent experiments. (C, D) Disease frequency (C) and duodenum microscopic scores (D) in 12 week-old BN<sup>m</sup> rats injected with PBS (white column or symbols; n=21) or with 4.10<sup>6</sup> BN CD25<sup>bright</sup> CD4<sup>+</sup> T cells (grey columns or symbols; n=12) at 4 weeks of age. (E) Cytokine protein expression in duodenum from control BN<sup>m</sup> rats with microscopic intestinal scores (white columns; n=8) and from BN<sup>m</sup> rats transferred with CD25<sup>bright</sup> CD4<sup>+</sup> T cells (grey columns; n=12).

**Figure 5. BN<sup>m</sup> rats carry a disrupted *Themis* gene**

(A) Genome scan for loci controlling the percentage of CD4 T cells in the blood of 44 (BN<sup>m</sup>xDA)xBN<sup>m</sup> rats. Horizontal lines represent genome-wide significance thresholds of 5% (significant) and 0.1% (highly significant) as determined by permutation tests. (B) Percentage of CD4 T cells in 44 (BN<sup>m</sup>xDA)xBN<sup>m</sup> backcross rats classified according to their genotypes at the microsatellite marker of chromosome 1 the nearest to the QTL. In each group, horizontal bars represent the mean values. nn: homozygous BN (n=23); nd: heterozygous BN-DA (n=21). (C) Fine mapping of the

BN<sup>m</sup> mutation in 28 (BN<sup>m</sup>xDA) F2 or (BN<sup>m</sup>xDA)xBN<sup>m</sup> backcross rats, among which 16 showed normal proportion of CD4 T lymphocytes (Unaffected) and 12 showed CD4 T cell lymphopenia (Affected). The position of each microsatellite marker on chromosome 1 is indicated in megabases (Mb). White: homozygous BN<sup>m</sup>; black: heterozygous BN<sup>m</sup>/DA. Rec: number of rats characterized by a given recombination. The physical map of the critical 1.5 Mb interval containing 6 genes is shown underneath. (D) Relative mRNA expression of the 6 genes in BN<sup>m</sup> (n=4) and BN (n=4) thymocytes. Data are representative of two independent experiments. (E) Electrophoregram, nucleic acid sequences and corresponding amino acids of the BN and BN<sup>m</sup> Themis gene in the region surrounding the 4 nucleotide insertion corresponding to the BN<sup>m</sup> mutation (boxed). (F) Immunoblot analysis of Themis and  $\beta$ -actin in thymocytes from BN, BN<sup>m</sup>, LEW and DA rats, C57BL/6 mice and in human PBMC using anti-Themis antibodies specific either for the mouse C-terminal (left panel) or the human N-terminal (right panel) portion of the protein.

## SUPPORTING INFORMATION LEGENDS

### **Figure S1. BN<sup>m</sup> rats show a lymphopenia restricted to CD4 T cells**

Absolute numbers of total, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, and B cells in submandibular lymph nodes from BN (black columns; n=4) and BN<sup>m</sup> (white columns; n=4) rats. Data are representative of four independent experiments.

### **Figure S2. BN<sup>m</sup> rat thymic epithelium is able to support CD4 SP cells differentiation**

Irradiated BN or BN<sup>m</sup> recipients were reconstituted i.v. with  $8 \cdot 10^7$  T cell-depleted bone marrow cells originating from (LEW x BN) F1 rats. Recipients were sacrificed 16 weeks after transfer. Absolute numbers of lymphocytes in spleen of lethally irradiated BN (black columns; n=4) and BN<sup>m</sup> (white columns; n=4) rats reconstituted with (LEWxBN) F1 rats T cell-depleted bone marrow cells. Data are representative of three independent experiments.

### **Figure S3. BN<sup>m</sup> rats spontaneously develop features of inflammatory bowel disease**

(A) Autoantibodies against SCID/Beige BALB/c mouse colon, ileum, lung, kidney and liver tissues detected after staining with sera (dilution 1/200) from BN<sup>m</sup> (top) and BN (bottom) rats and goat anti-rat immunoglobulin G Alexa Fluor 488-antibody (ml: muscular layer, LP: Lamina propria, L: lumen, v: venule, a: arteriole, g: glomerulus).  
(B) Prevalence of histological lesions of the disease in BN (black squares) and BN<sup>m</sup> (open circles) rats according to age. 5-7 weeks of age: 13 BN, 21 BN<sup>m</sup>; 8-10 weeks of age: 28 BN, 49 BN<sup>m</sup>; 11-12 weeks of age: 25 BN, 23 BN<sup>m</sup>; 34 weeks of age: 6 BN, 6

BN<sup>m</sup> (C) Duodenum, jejunum, ileum and colon microscopic scores of 8-12 week-old BN (black squares, n=55) and BN<sup>m</sup> rats (open circles, n = 72).

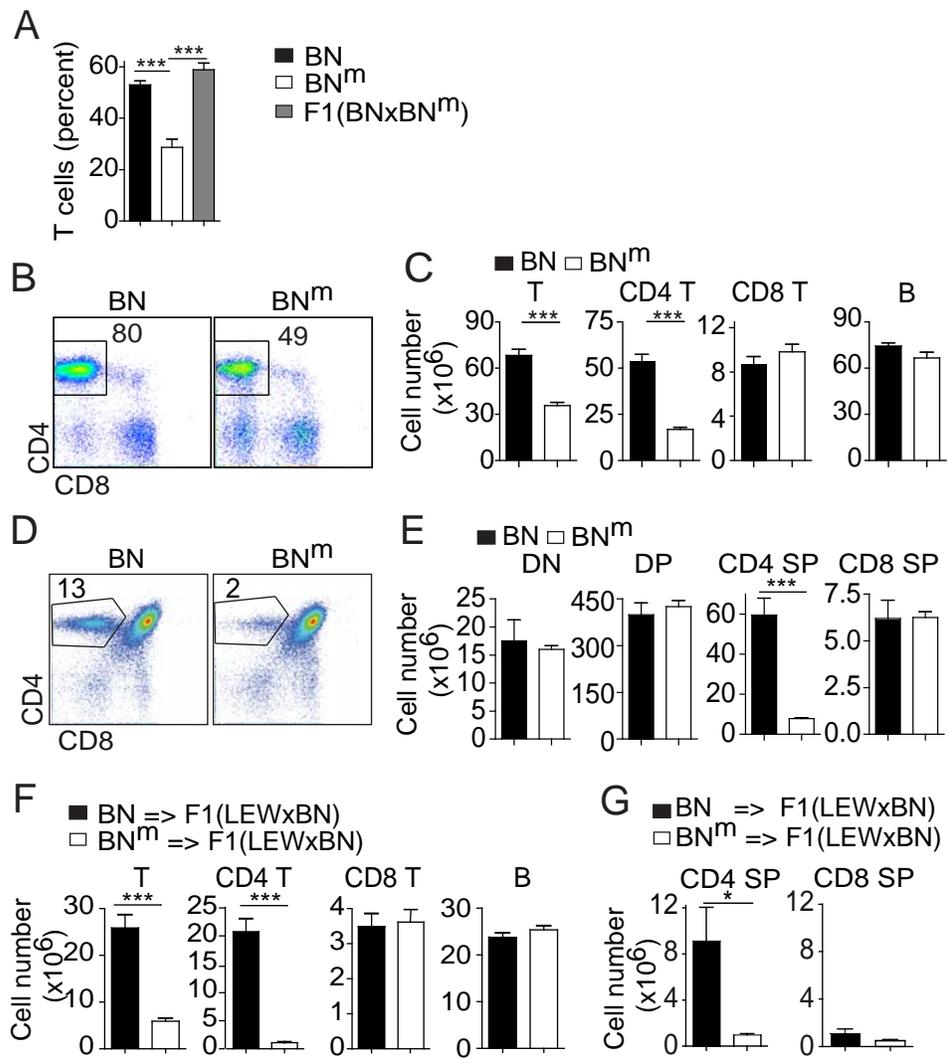
**Figure S4. BN<sup>m</sup> rats exhibit spontaneous T cell activation and skewed cytokine production.**

(A) Proportions of OX40<sup>high</sup>, CD62L<sup>low</sup>, CD45RC<sup>low</sup> and CD25<sup>high</sup> among CD4 T cells from mLN of BN (n=4) and BN<sup>m</sup> (n=8) rats. (B) Proliferation was assessed by [<sup>3</sup>H]thymidine uptake in total CD4 T cells isolated from BN (n=4) and BN<sup>m</sup> (n=4) mLN and stimulated for 48 hours with anti-TCR mAb and increasing concentrations of anti-CD28 mAb (left panel). Cytokine production by CD4 T cells stimulated with anti-TCR mAb and 0.2µg/ml of anti-CD28 mAb for 48 hours (right panels). (C) Four-week old BN<sup>m</sup> rats were injected with OX38, an anti-CD4 depleting mAb (300µg per 100g of rat), 3 times a week (grey columns, n=10) or PBS (white, columns n=12). The proportion of CD4 T cells in PBMC was tested by flow cytometry three weeks after the first anti-CD4 injection (left panel). IBD development tested 8 weeks after the first anti-CD4 injection by analyzing the prevalence, the length of small intestine and the macroscopic and microscopic scores of the duodenum (right panels).

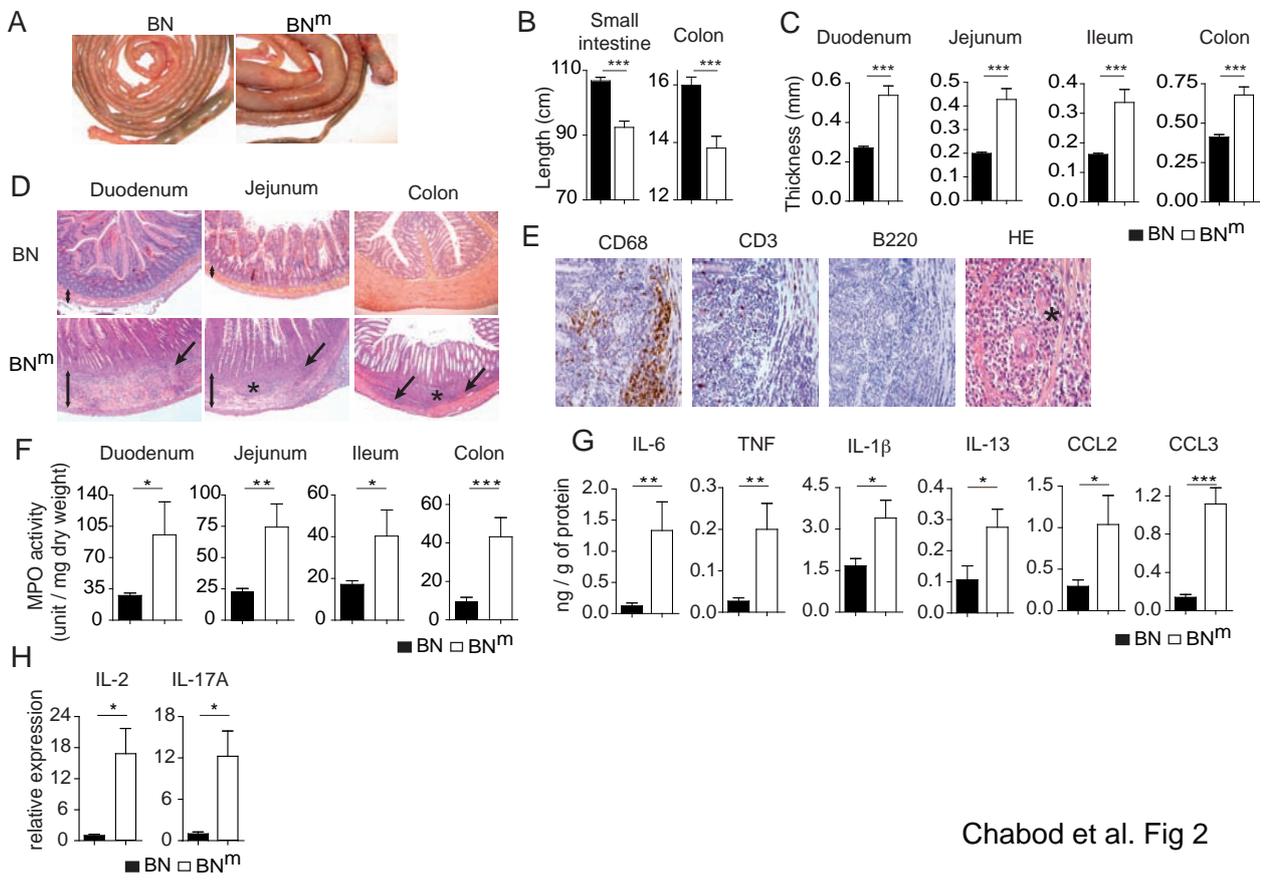
**Figure S5. The suppressive activity of BN<sup>m</sup> CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Tregs is severely impaired**

(A) Percentage of Foxp3<sup>+</sup> CD4 SP in thymus, spleen and mLN from BN (n=7) and BN<sup>m</sup> (n=13) rats. Data are representative of three independent experiments. (B) Naive purified BN CD4 T cells were stimulated with irradiated syngeneic APC and coated anti-CD3 in presence of decreased numbers of FACS-sorted CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Tregs and cultured in 96-well round-bottom plates for 48 hours. Proliferation was analyzed by [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation the last 18 hours. The data represent the

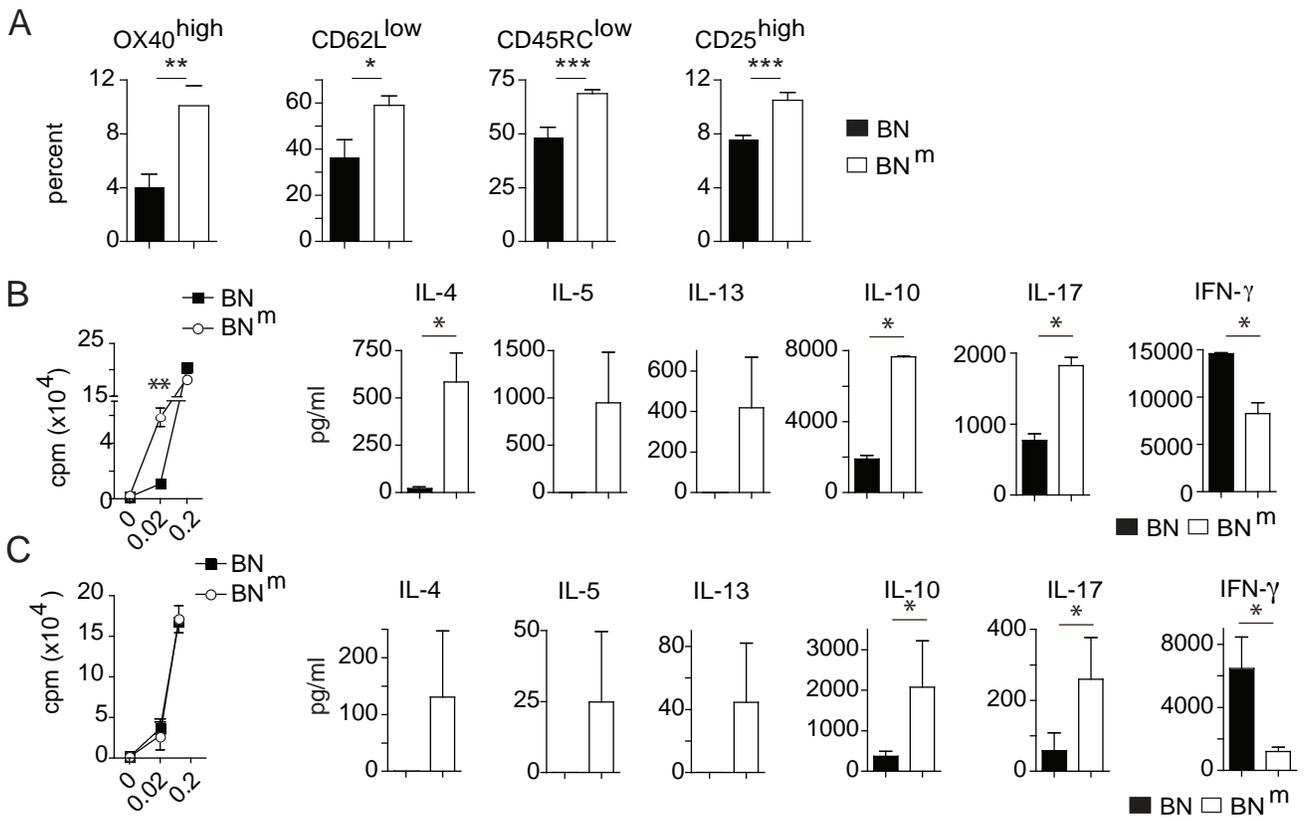
suppressive activity of CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells from BN (black squares) and BN<sup>m</sup> rats (open circles) in co-culture experiments using BN naive CD4 T cells alone as effectors. Data are representative of three independent experiments.



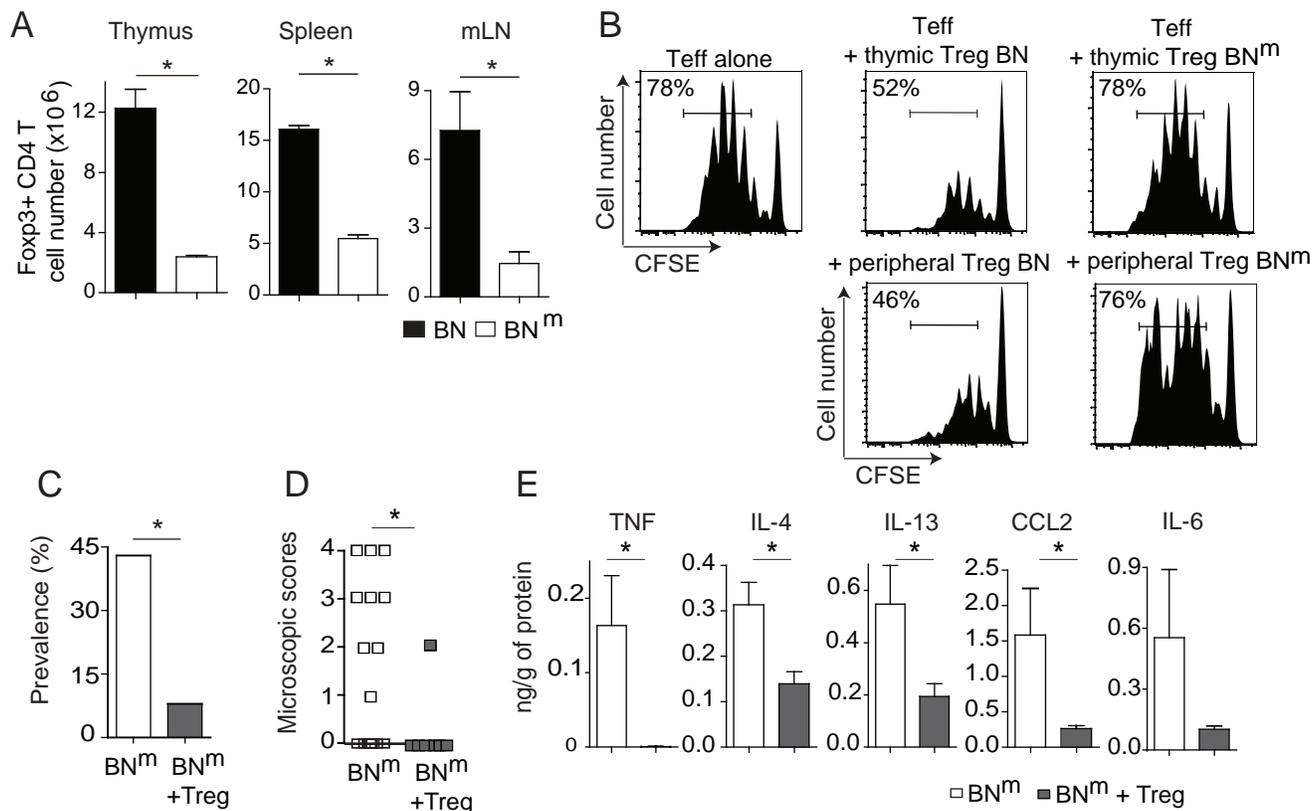
Chabod et al. Fig 1



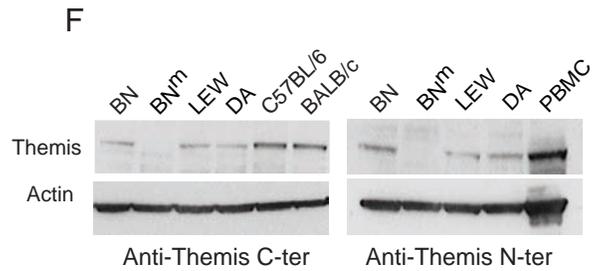
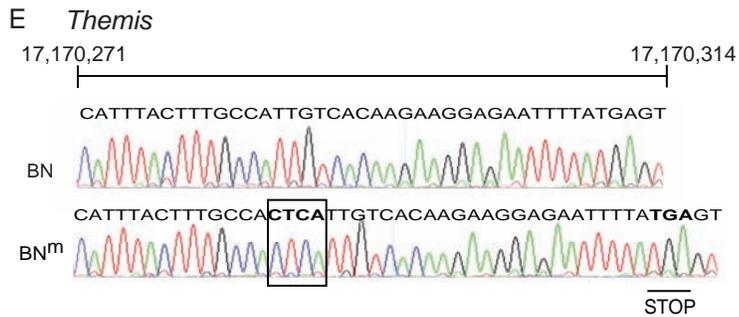
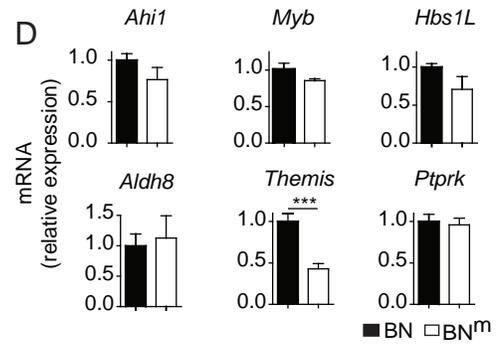
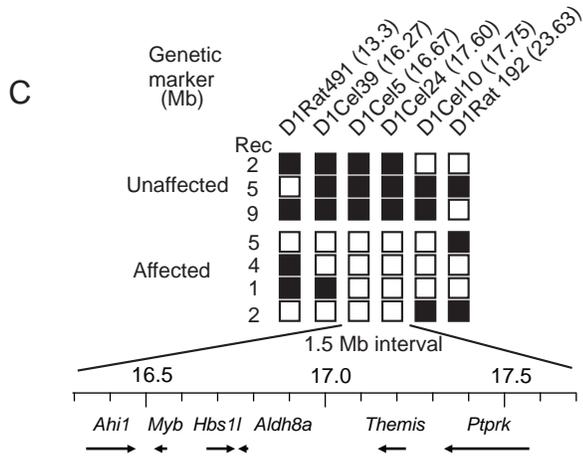
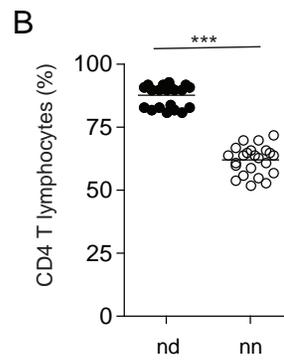
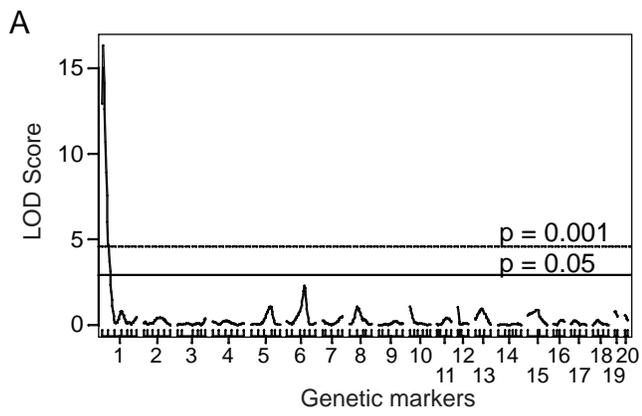
Chabod et al. Fig 2



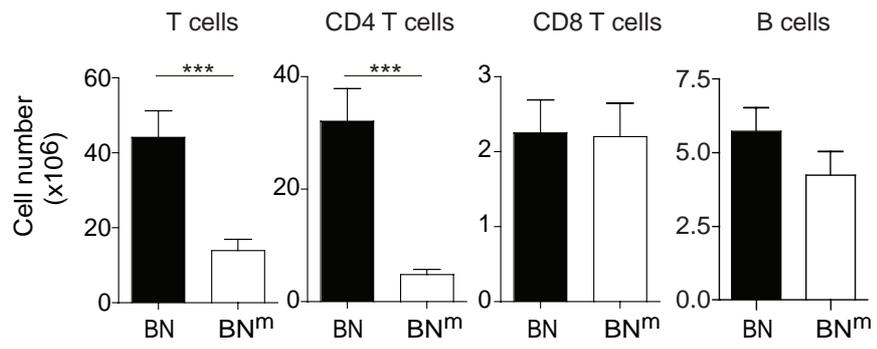
Chabod et al. Fig 3



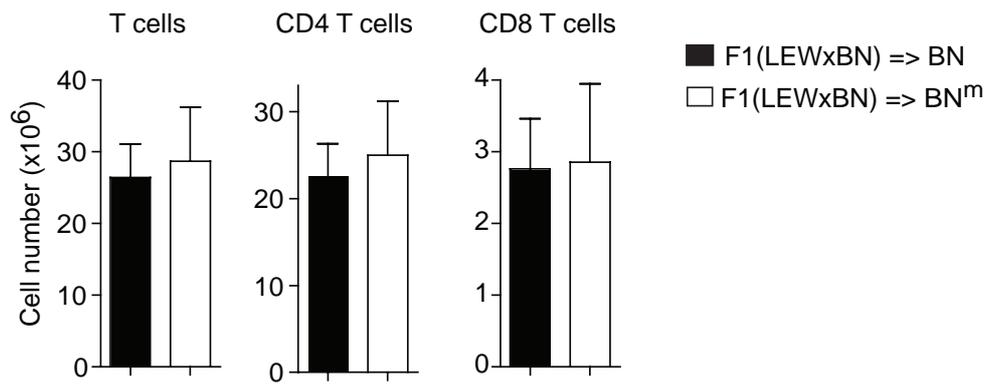
Chabod et al. Fig 4



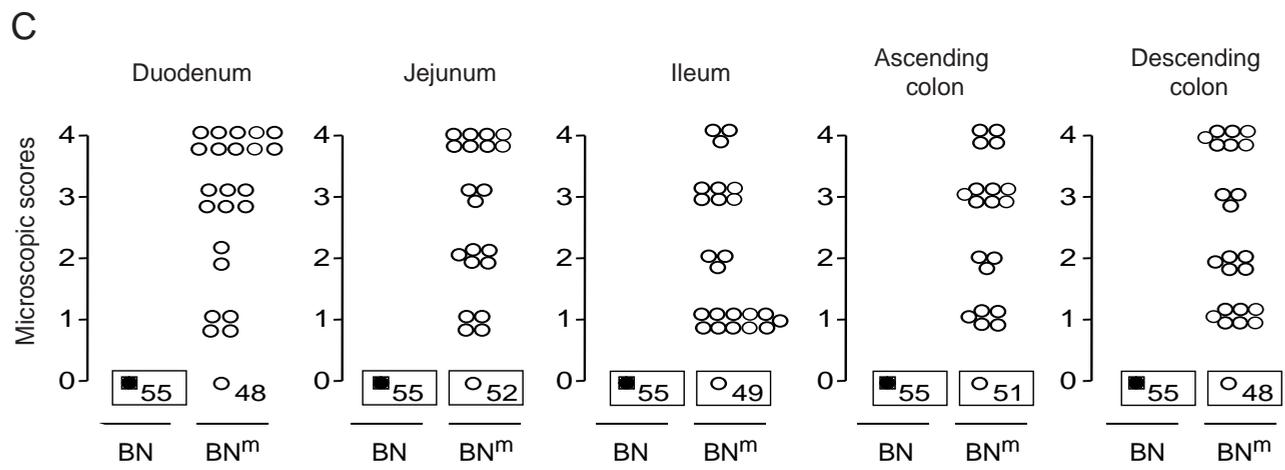
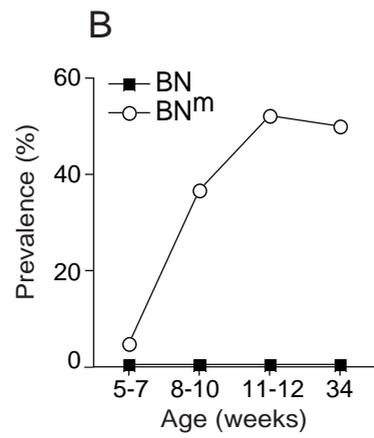
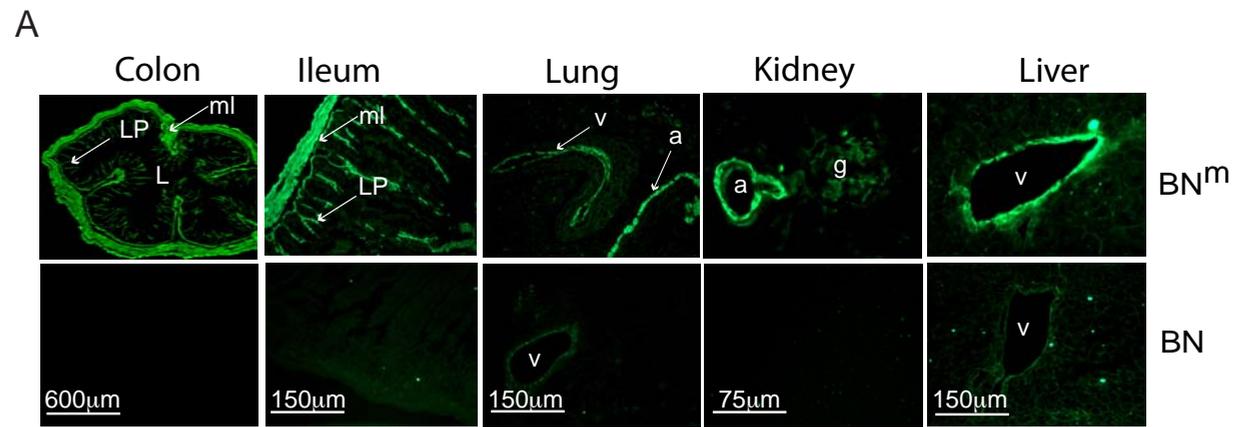
Chabod et al. Fig 5

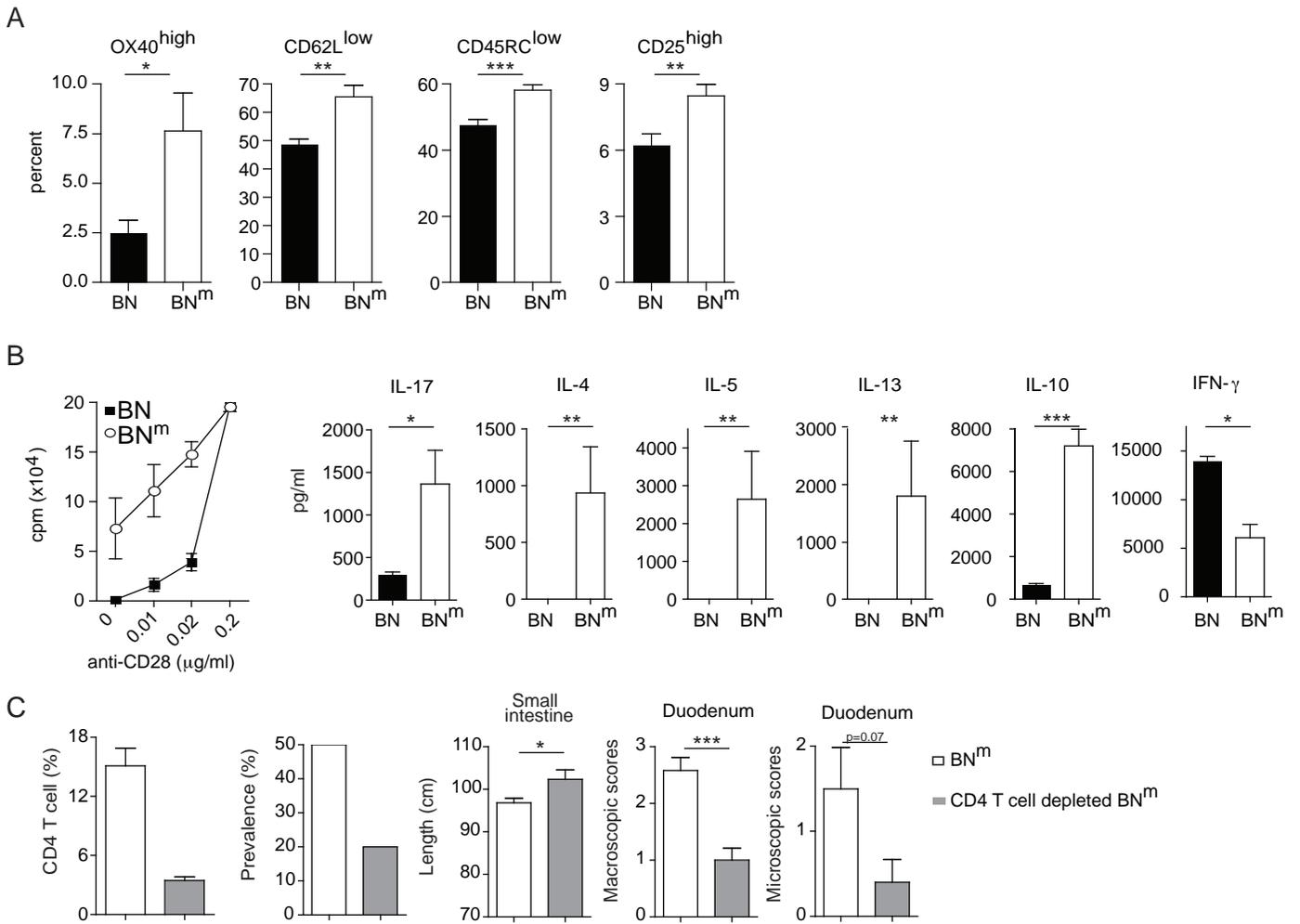


Chabod et al. suppl Fig 1

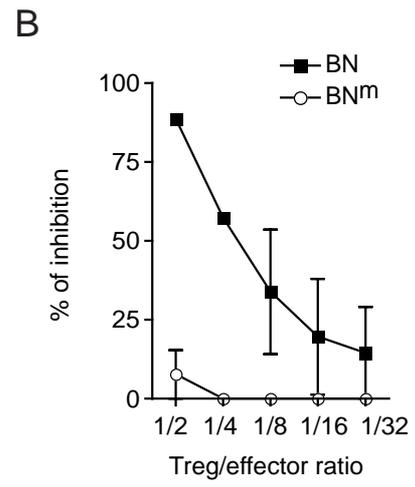
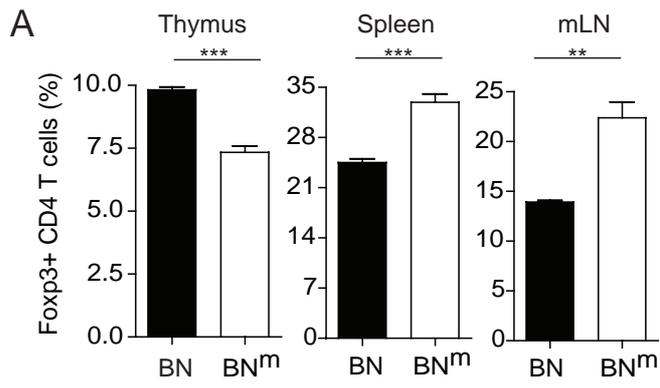


Chabod et al. suppl Fig 2





Chabod et al. supp Fig 4



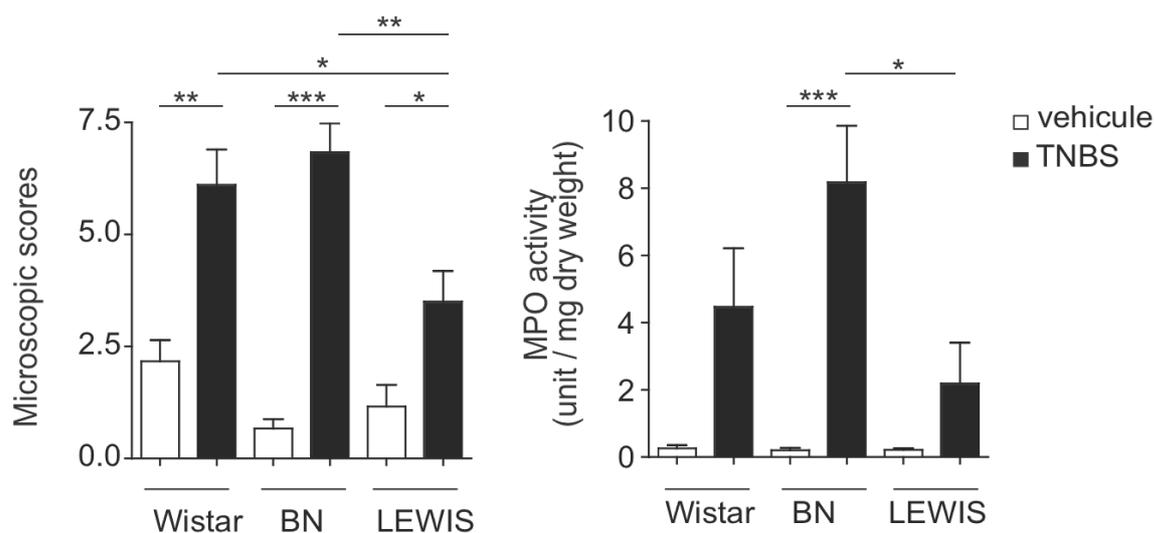
Chabod et al. suppl Fig 5

## Résultats supplémentaires

Afin de répondre aux questions posées par les rapporteurs de Plos Genetics, nous avons effectué des expériences qui, pour des raisons de synthèse et de clarté, ne figurent pas dans la version finale de l'article. Ces expériences ont cependant permis d'enrichir de mieux discuter nos résultats et je souhaite vous les présenter ici.

### 1) Les rats de fond génétique BN sont-ils particulièrement susceptibles au développement de MICI ?

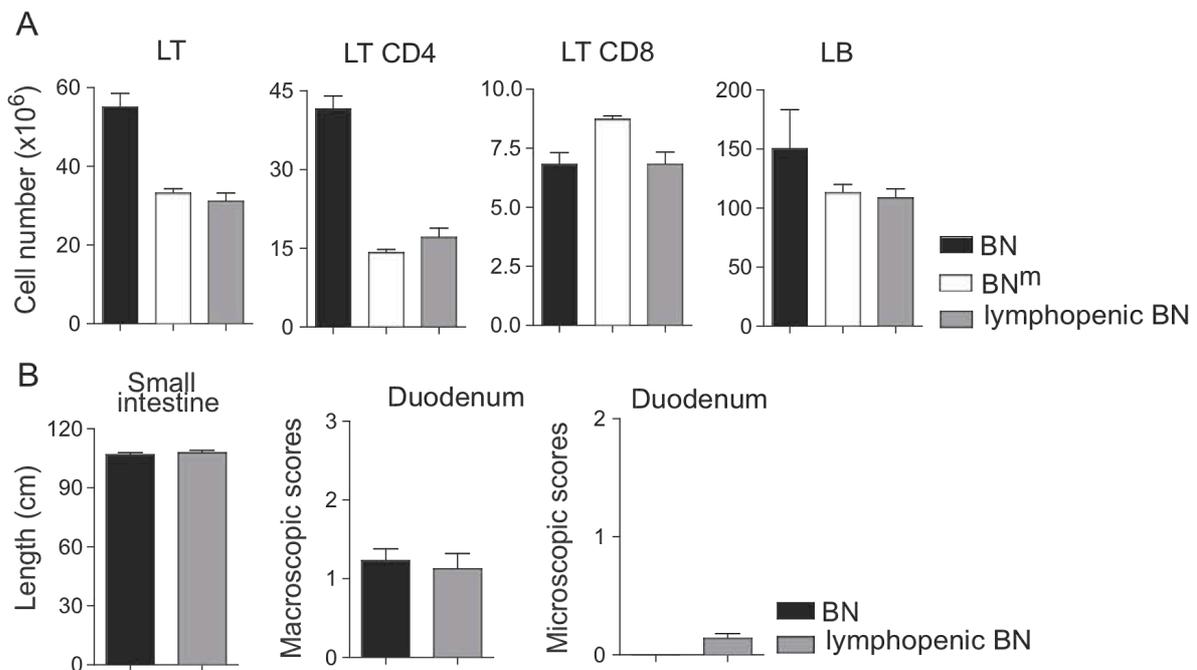
Pour répondre à cette question, une colite a été induite par administration de TNBS à des rats BN, Lewis et Wistar. Brièvement, une suspension de TNBS (Sigma) a été préparée dans 50% (v/v) de PBS et d'éthanol pour obtenir une concentration finale de 100mg/mL. 30 mg de cette préparation de TNBS furent injectés intra-rectalement au jour 0 (n=10). Les rats contrôles ont reçu du PBS (n=6). La sévérité de la colite est évaluée au niveau du côlon par l'analyse des scores microscopiques (panel de gauche) et l'analyse de l'activité myéloperoxidase (MPO) dans les tissus (panel de droite). Les rats Lewis ont été inclus dans ce protocole car leurs réponses immunitaires sont diamétralement opposées à celles des rats BN et les rats Wistar sont une souche décrite dans la littérature comme sensible à ce type de colite induite chimiquement.



Les rats BN et Wistar développent une colite dont la sévérité est similaire alors que les rats Lewis sont moins sensibles. Ces résultats suggèrent que les rats BN présentent une susceptibilité augmentée à développer une MICI.

## 2) Quelle est l'influence de la lymphopénie sur le développement de MICI chez les rats BN<sup>m</sup> ?

Afin de répondre à cette question, nous avons induit une lymphopénie chez des 11 rats BN. Pour cela, les rats ont été thymectomisés et les LT CD4 de ces rats ont été partiellement éliminés suite à deux injections d'anticorps anti-CD4 déplétant (OX38, 0,8 mg/rat/injection).

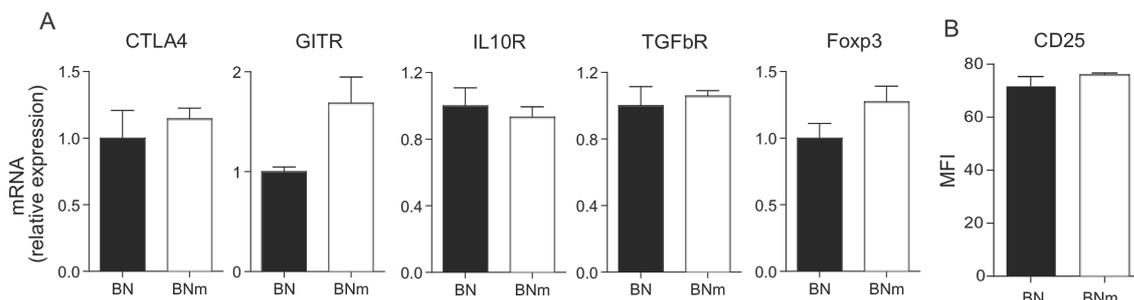


Les rats BN rendus lymphopéniques présentent un phénotype immunologique similaire aux rats BN<sup>m</sup> (n=12) que se soit au niveau de la fréquence, du nombre absolu ou de l'état d'activation des LT CD4 (Figure A). Cependant, ces rats sont exempts de lésions inflammatoires intestinales (Figure B). Ces données démontrent que la lymphopénie seule est insuffisante pour le développement de MICI et que la déficience en Themis contribue au développement de cette pathologie.

### 3) Le défaut fonctionnel observé des Treg BN<sup>m</sup> est-il corrélé à une diminution de l'expression des molécules essentielles aux fonctions suppressives et/ou à la survie des Treg ?

L'expression des molécules telles que Foxp3, CD25, CTLA-4, GITR par les Treg est nécessaire pour l'exercice de leurs fonctions suppressives. L'expression des récepteurs à l'IL-10 (IL-10R) et au TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ R) par les Treg sont requis pour leur survie.

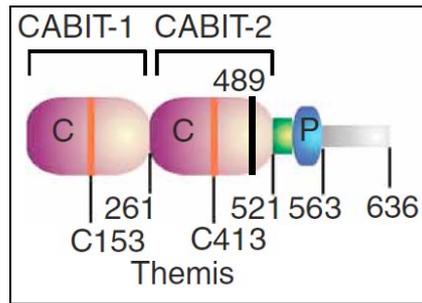
L'expression de CTLA-4, GITR, IL-10R, TGF- $\beta$ R et Foxp3 par les Treg CD4 CD25<sup>bright</sup> périphériques de rat BN (n=4) et BN<sup>m</sup> (n=4) a été analysée par RT-PCR (SYBER green). L'expression des résultats est normalisée par rapport à l'expression du gène de ménage *Atp5b*, puis rapportée à l'expression des rats BN contrôles. Le niveau d'expression de CD25 a été analysé en cytométrie de flux. Une fenêtre sur les LT CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> Foxp3<sup>+</sup> permet de déterminer la moyenne d'intensité de fluorescence de la molécule CD25.



Cette étude ne nous a pas permis de mettre en évidence des différences significatives entre les Treg BN et BN<sup>m</sup>. Des études moléculaires supplémentaires seront nécessaires pour identifier les mécanismes moléculaires impliqués.

***DISCUSSION GENERALE ET  
PERSPECTIVES***

Une mutation spontanée récessive est apparue chez la souche de rat BN dans notre animalerie. Elle résulte en une lymphopénie T sévère. Cette mutation a été fixée et une nouvelle lignée de rat a ainsi été créée : les rats BN<sup>m</sup>, « m » pour mutés. La lymphopénie des rats BN<sup>m</sup> est restreinte au compartiment T CD4. Le nombre absolu des autres populations cellulaires du système immunitaire (LT CD8, LB, LT $\gamma\delta$ , macrophages et cellules NK) n'est pas affecté. Cette lymphopénie prend origine dans le thymus et est intrinsèque aux cellules T et est associée au développement spontané de MICI. L'inflammation intestinale des rats BN<sup>m</sup> présente des caractéristiques communes avec la physiopathologie de la maladie de Crohn. L'analyse de l'impact de cette mutation sur la fonction des LT conventionnels a été effectuée. Suite à une stimulation polyclonale *in vitro*, l'analyse du profil cytokinique des LT CD4 conventionnels des rats BN<sup>m</sup> révèle une différenciation biaisée en cellules Th2 et Th17 associée à un défaut de production d'IFN- $\gamma$ . De plus, les Treg CD4<sup>+</sup> CD25<sup>bright</sup> thymiques et périphériques des rats BN<sup>m</sup> sont non fonctionnels *in vitro*. Le transfert de Treg issus de rats BN sauvages réduit l'incidence et la sévérité de la pathologie des rats BN<sup>m</sup>. Ce résultat suggère que le défaut fonctionnel de Treg contribue à l'apparition de la MICI. Grâce à une analyse de liaison suivie d'une dissection génétique, la mutation responsable de la lymphopénie T CD4 du rat BN<sup>m</sup> a été localisée sur le chromosome 1 dans un interval de 1,5 Mb. Ce locus contient six gènes. Des analyses d'expression génique et de séquençage ont mis en évidence une insertion de quatre paires de base dans le gène *Themis*. Cette mutation provoque un décalage du cadre de lecture et l'apparition prématurée d'un codon STOP. Elle résulte en l'absence d'expression de la protéine Themis. Ainsi, le rat BN<sup>m</sup> est déficient pour Themis. L'ensemble de ces résultats révèle pour la première fois qu'une déficience en Themis favorise le développement spontané de MICI, phénotype associé à un défaut de fonction des Treg ainsi qu'à un biais de différenciation des Tconv. Par conséquent, Themis doit désormais être considéré comme un gène candidat de susceptibilité aux désordres inflammatoires chroniques, en particulier lorsqu'un défaut de la population Treg contribue à leur physiopathologie.



*Extrait de Johnson et al., Nature Immunology, 2009 (Johnson, Aravind et al. 2009).*

**Figure 31. Structure de la protéine Themis.**

La protéine Themis est constituée de 641 acides aminés. Sa structure serait la suivante (de gauche à droite) : deux domaines globulaires (en rose), une séquence de localisation nucléaire (en vert) et une séquence riche en proline près de la partie C-terminale (en bleu).

## Modèles animaux de déficience pour Themis

Le gène *Themis* (*thymocyte-expressed molecule involved in selection*), également appelé *Gasp* (*Grb2-associating protein*), a été découvert en 2009 chez la souris par cinq équipes indépendantes (Fu, Vallee et al. 2009; Johnson, Aravind et al. 2009; Kakugawa, Yasuda et al. 2009; Lesourne, Uehara et al. 2009; Patrick, Oda et al. 2009). Il se localise sur le chromosome 10 chez la souris et sur le chromosome 6 chez l'Homme. L'expression de Themis est restreinte au thymus et aux organes lymphoïdes secondaires. Dans le thymus, les cellules DN et DP l'expriment fortement alors que son expression par les  $LT\alpha\beta$  et  $LT\gamma\delta$  au niveau des organes lymphoïdes secondaires est faible. La protéine Themis est requise pour le développement thymique des LT CD4 et CD8. En effet, les souris déficientes pour Themis présentent une lymphopénie T CD4 et CD8, le compartiment T CD4 étant plus sévèrement affecté que le compartiment T CD8 (Fu, Vallee et al. 2009; Johnson, Aravind et al. 2009; Kakugawa, Yasuda et al. 2009; Lesourne, Uehara et al. 2009; Patrick, Oda et al. 2009). Grâce à des modèles de souris transgéniques pour un TCR, les différentes équipes ont montré que Themis joue un rôle essentiel lors de la sélection positive des thymocytes DP mais est inutile pour le choix du lignage CD4/CD8 (Fu, Vallee et al. 2009; Johnson, Aravind et al. 2009; Lesourne, Uehara et al. 2009). La protéine Themis compte 636 acides aminés chez la souris et de 641 acides aminés chez l'Homme. Elle serait constituée de deux domaines globulaires, d'une séquence de localisation nucléaire et d'une séquence riche en proline dans la partie C-terminale (Figure 31) (Johnson, Aravind et al. 2009). Les domaines globulaires ne présentent aucune homologie notable avec les autres domaines déjà décrits chez les mammifères mais leurs séquences codantes sont retrouvées dans le génome d'autres lignées de métazoaires. Ces domaines contiennent une cystéine qui pourrait être impliquée dans une fonction catalytique encore inconnue. En effet, l'absence de domaine catalytique suggère que Themis jouerait un rôle de protéine adaptatrice. Themis est principalement localisé dans le cytoplasme (Fu, Vallee et al. 2009; Lesourne, Uehara et al. 2009) mais il a également été détecté au niveau du noyau (Lesourne, Uehara et al. 2009). L'équipe du Dr. Love a montré que la séquence de localisation nucléaire est nécessaire pour l'importation de Themis dans le noyau (Lesourne, Uehara et al. 2009). Cependant, la répartition cytoplasmique versus

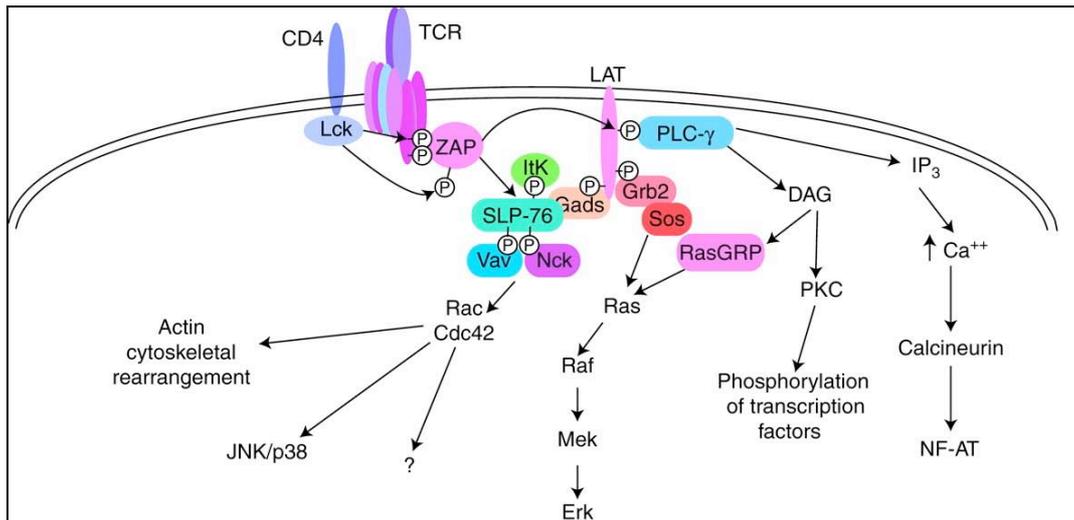
nucléaire de Themis est inchangée suite à une stimulation par le TCR ce qui soulève des questions concernant l'importance de cette localisation nucléaire.

De façon intéressante, les rats Long Evans Cinnamon ou LEC présentent une lymphopénie T restreinte au compartiment CD4. Elle prend origine dans le thymus (Aguí, Oka et al. 1990). La mutation spontanée des rats LEC est une délétion importante du chromosome 1, affectant les gènes *Themis* et *Ptprk* (*protein tyrosine phosphatase, receptor type, K*) (Iwata, Sasaki et al. 2010). Le défaut de sélection thymique serait la conséquence d'une invalidation simultanée des gènes contigus *Themis* et *Ptprk*.

Une mutation spontanée est survenue dans notre colonie de rats BN. La première analyse génétique visant à localiser la mutation responsable de la lymphopénie T CD4 chez le rat BN<sup>m</sup> a été effectuée sur 44 rats (BN<sup>m</sup>xDA)xBN<sup>m</sup>. Un locus de contrôle de 8 Mb a été identifié sur le chromosome 1. Il est certainement responsable de la totalité du phénotype puisque le LOD score est très élevé (16.45) et très significatif ( $P < 0,0001$ ), et que le locus compte pour 82% du phénotype observé. Grâce à une dissection génétique, cette région de contrôle a été réduite à 1,5 Mb. Elle contient six gènes : *Ahi1*, *Myb*, *Hbs1L*, *Aldh8*, *Themis* et *Ptprk*. L'analyse de leur expression génique par RT-PCR a révélé que seule l'expression de *Themis* est significativement diminuée chez les rats BN<sup>m</sup> par rapport aux rats contrôles BN. De plus, l'analyse de l'expression protéique par Western-blot révèle l'absence de l'expression de *Themis* dans les extraits thymiques issus de rats BN<sup>m</sup>. Le seul autre gène candidat du locus est *Ptprk*. En 2007, sa déficience chez les rats LEC a été décrite comme responsable d'une lymphopénie T CD4 (Asano, Tsubomatsu et al. 2007; Kose, Sakai et al. 2007). Puis en 2010, le phénotype de ces rats a été attribué à une délétion partielle de deux gènes : *Themis* et *Ptprk* (Iwata, Sasaki et al. 2010). Le séquençage des exons du gène *Ptprk* chez les rats BN<sup>m</sup> a été effectué et aucune mutation n'a été trouvée. Enfin, le phénotype des souris déficientes pour *Themis* et des rats BN<sup>m</sup> est très similaire. Ainsi, l'ensemble de ces données montre que les rats BN<sup>m</sup> sont déficients pour la protéine *Themis*.

## **Impact de Themis dans la signalisation par le TCR des lymphocytes T CD4**

L'activation d'un LT naïf nécessite l'engagement du TCR associé à des signaux de costimulation. Il s'en suit une complexe cascade de phosphorylations de diverses molécules intracellulaires, aboutissant à l'activation de la cellule T (prolifération, acquisition des fonctions effectrices) (Smith-Garvin, Koretzky et al. 2009). La première étape dans la signalisation intracellulaire du TCR après son engagement est l'activation des protéines tyrosines kinases appartenant à la famille Src (sarcoma) telles que Lck et Fyn. Elle aboutit à la phosphorylation des domaines ITAMs (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) des molécules CD3  $\gamma\epsilon$ ,  $\delta\epsilon$  et  $\zeta\zeta$ . La kinase ZAP-70 (70 kD-associated protein  $\zeta$ ) est alors recrutée. Après sa propre phosphorylation par Lck, elle initie une cascade de phosphorylations. Les cibles les plus importantes de ZAP-70 sont la protéine adaptatrice transmembranaire LAT (linker for activation of T cells) et la protéine adaptatrice cytosolique SLP-76 (SH2 domain-containing leukocyte protein of 76 kilodaltons) (Zhang, Sloan-Lancaster et al. 1998). Ces deux protéines adaptatrices constituent une base spatio-temporelle indispensable pour la connexion entre les multiples voies de signalisation. LAT, après phosphorylation de ses tyrosines, peut fixer PLC $\gamma$ 1 (phospholipase C $\gamma$ 1), Pi3k (phosphatidylinositol 3' kinase), Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2) et Gads (GRB2-related adaptor protein 2) (Sommers, Samelson et al. 2004). SLP-76 est alors recruté auprès de LAT phosphorylé via leur partenaire mutuel Gads (Liu, Fang et al. 1999). Il peut alors fixer différentes molécules telles que Vav1, Lck, Itk (IL2-inducible T-cell kinase) et PLC $\gamma$ 1. La formation de ces complexes de signalisation est moins linéaire que le schéma décrit ci-dessus. Par exemple, PLC $\gamma$ 1 peut directement se lier à SLP-76, LAT et Vav1 aussi bien qu'à sa kinase activatrice Itk. Ces nombreuses interactions seraient requises pour stabiliser PLC $\gamma$ 1 dans une conformation optimale pour son activité (Beach, Gonen et al. 2007). PLC $\gamma$ 1, activée suite à sa phosphorylation, hydrolyse à la membrane plasmique le lipide PIP $_2$  (phospho-inositol-(4,5)-2phosphate), aboutissant à la production de seconds messagers tels que l'IP3 (inositol-tri-phosphate) et le DAG (di-acyl-glycérol). Ces deux messagers sont essentiels pour la fonction des LT en permettant l'activation de la voie des kinases MAP, de la voie calcique et de la PKC- $\theta$  (protein kinase C- $\theta$ ). Finalement, ces différentes voies de signalisation vont aboutir à



Extrait de Love et al., *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2010 (Love and Hayes 2010).

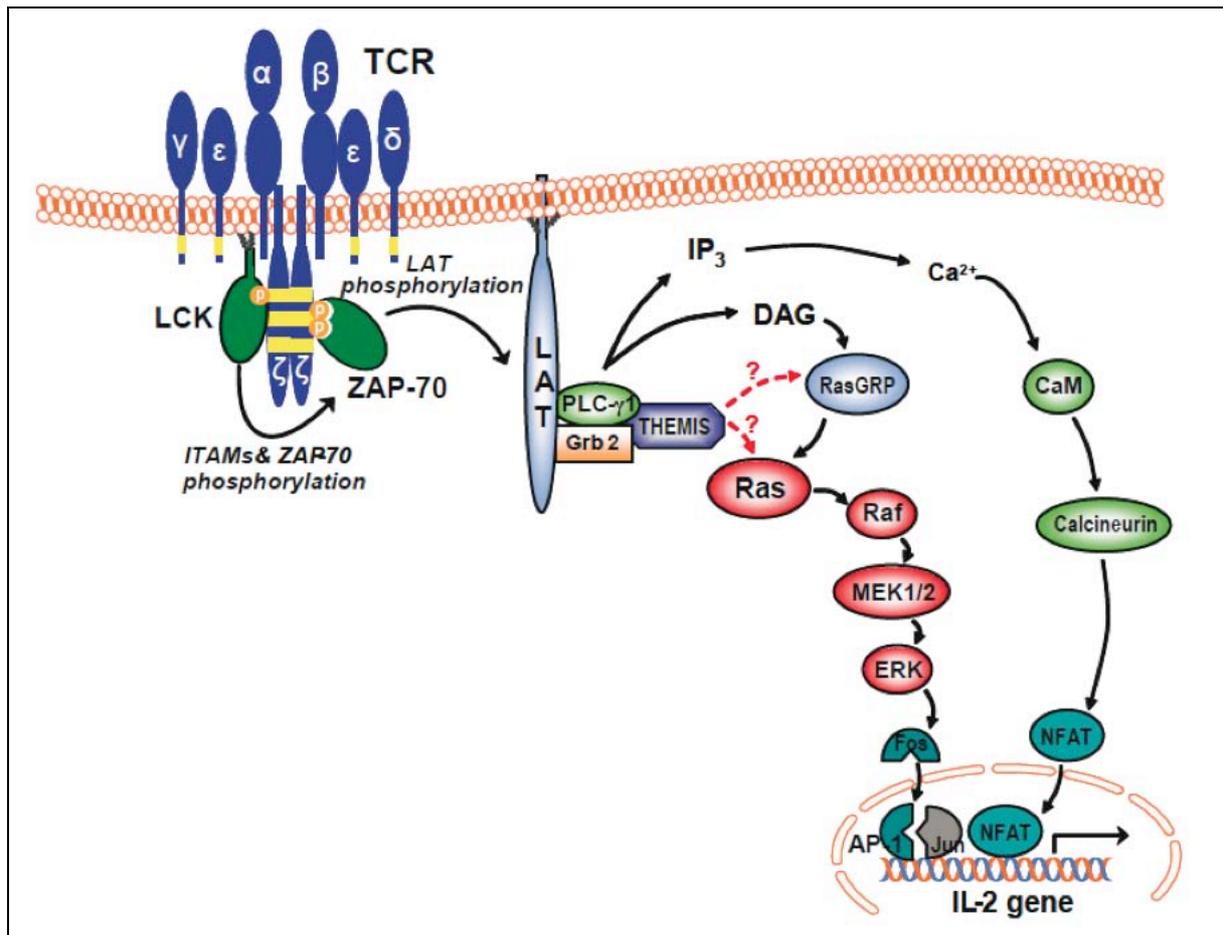
**Figure 32. Voie de signalisation proximale du TCR.**

L'engagement du TCR résulte en la phosphorylation activatrice de la kinase Lck. Lck activée phosphoryle des résidus ITAMs des chaînes CD3. Une autre tyrosine kinase ZAP-70 est alors spécifiquement recrutée à ces motifs biphosphorylés et phosphoryle à son tour par Lck. Ces deux kinases phosphorylent alors les molécules nécessaires à l'activation de la voie de Ras, de la voie calcique et/ou du réarrangement du cytosquelette d'actine. Toutes ces voies de signalisation mènent à l'activation de facteurs de transcription, permettant principalement l'expression de cytokines.

l'activation de différents facteurs de transcription comme NFAT, NK- $\kappa$ B et AP-1. Ils sont responsables de l'expression de nombreux gènes indispensables à la fonction des cellules T, en particulier des gènes codant pour des cytokines telles que l'IL-2. Il est intéressant de noter que les molécules participant à la signalisation intracellulaire du TCR exprimés par les thymocytes et les LT matures sont similaires (Yamasaki, Ishikawa et al. 2006; Wang, Xiong et al. 2010). Cependant, ce schéma complexe de transduction du signal du TCR semble incomplet (Figure 32). En effet, en 2009, Themis a été découvert comme une nouvelle protéine participant à la signalisation proximale du TCR.

En 2009, les premiers travaux décrivant Themis montrent que cette protéine est indispensable à la sélection thymique des LT (Fu, Vallee et al. 2009; Johnson, Aravind et al. 2009; Kakugawa, Yasuda et al. 2009; Lesourne, Uehara et al. 2009; Patrick, Oda et al. 2009). Cependant, au niveau moléculaire, sa fonction fut seulement suggérée. Themis jouerait un rôle dans la transduction d'un signal indépendant du TCR (Johnson, Aravind et al. 2009) ou dans la signalisation du TCR mais uniquement lors de la sélection positive des thymocytes (Patrick, Oda et al. 2009). Au contraire, les équipes du Dr Gascoigne et du Dr Love mettent en évidence des défauts de signalisation par le TCR dans les cellules T déficientes pour Themis, suggérant un rôle pour Themis dans la signalisation du TCR (Fu, Vallee et al. 2009; Lesourne, Uehara et al. 2009). En 2010, le groupe des Dr Acuto et Dr Salek a clairement démontré l'implication de Themis dans la signalisation proximale par le TCR (Brockmeyer, Paster et al. 2010). De façon constitutive, il interagit avec Grb2, protéine adaptatrice pléiotropique, et PLC $\gamma$ 1. Après une stimulation par le TCR, Themis est rapidement et transitoirement phosphorylé sur une tyrosine, de façon dépendante de LAT, Lck et SLP-76. Cette phosphorylation, probablement nécessaire à sa fonction, est requise pour son interaction avec LAT et Itk. Un défaut d'expression de Themis entraîne de légères mais très reproductibles diminutions de la phosphorylation de ERK (extracellular signal-regulated kinase), de l'activation de la voie NFAT/AP1 et du flux calcique, résultant en un défaut d'expression d'IL-2 (Fu, Vallee et al. 2009; Brockmeyer, Paster et al. 2010). Par contre, l'activation des voies de signalisation NF- $\kappa$ B, p38 et JNK (c-Jun N-terminal kinase) serait normale. Après engagement du TCR, le profil de phosphorylations des tyrosines des protéines

appartenant à la signalisation proximale du TCR telles que ZAP-70, PLC $\gamma$ 1 ou Itk, est similaire dans les LT compétents et déficients pour Themis (Fu, Vallee et al. 2009; Brockmeyer, Paster et al. 2010). L'ensemble de ces données suggère fortement que suite à son recrutement auprès de LAT via son interaction constitutive avec Grb2, Themis favorise l'activation de la PLC $\gamma$ 1 ou la production de DAG (dystrophin-associated glycoprotein 1). L'activation de la voie ERK est plus sensible à l'intensité du signal délivré par le TCR que la voie calcique. Ceci explique le défaut reproductible d'activation de la voie ERK et les résultats contradictoires concernant l'activation de la voie calcique. Ainsi, Themis serait impliqué dans le développement thymique des LT en tant que molécule amplificatrice de la voie finement régulée de Ras (Figure 33). Ces résultats ont été obtenus à partir de thymocytes et LT périphériques murins mais également en utilisant des lignées cellulaires humaines et des cellules mononuclées issues du sang périphérique humain (Fu, Vallee et al. 2009; Brockmeyer, Paster et al. 2010). Ces résultats suggèrent fortement que Themis présente des fonctions très similaires chez la souris et l'Homme. La divergence des résultats concernant la phosphorylation d'ERK et le flux calcique s'expliquerait probablement par les différents protocoles de stimulation du TCR et le type cellulaire utilisé. En effet, en l'absence de Themis, le défaut de signalisation par le TCR est subtil et peut être contourné par une stimulation trop forte. En effet, le défaut d'activation du complexe NFAT/AP1 et du flux calcique n'est observé qu'avec de faibles doses d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28.



Extrait de Brockmeyer et al., *The Journal of Biological Chemistry*, 2010 (Brockmeyer, Paster et al. 2010).

**Figure 33 : Themis, un nouvel acteur de la signalisation proximale du TCR.**

La protéine Themis fait partie de la signalisation proximale du TCR. Elle est constitutivement liée à Grb2, molécule adaptatrice pléiotropique. Suite à l'engagement du TCR, la phosphorylation rapide de Themis sur une tyrosine est dépendante des kinases LAT, Lck et/ou SLP-76. Cette phosphorylation lui permet d'interagir avec LAT, PLC $\gamma$ 1 et Itk. La fonction de Themis serait de maintenir le signal aboutissant à l'activation de Ras. Cette molécule activée phosphoryle les protéines ERK ce qui résulte en la transcription de gènes de cytokines, tels que l'IL-2, au niveau du noyau.

## **Impact de Themis sur le développement des lymphocytes T conventionnels**

Les souris déficientes pour Themis présentent une proportion et un nombre absolu de thymocytes CD4 et CD8 SP très diminués, le compartiment T CD4 étant plus sévèrement affecté que le compartiment T CD8. Chez les rats BN<sup>m</sup>, seule la sélection thymique des LT CD4 est affectée. Ces différences entre les résultats obtenus chez la souris et le rat BN<sup>m</sup> peuvent s'expliquer soit par la différence d'espèce, soit par le fond génétique BN lui-même. Mon équipe de recherche a montré que les rats BN présentent une proportion et un nombre absolu faibles de LT CD8. Ce défaut de la population T CD8 a été attribué à l'haplotype de leur molécule de CMH de classe I (Damoiseaux, Cautain et al. 1999). Ainsi, compte tenu du faible nombre absolu de LT CD8 chez le rat BN, une légère diminution de ce paramètre est plus difficile à mettre en évidence. Cependant, les rats LEC présentent le même défaut de sélection thymique restreint aux LT CD4 et ceci, dans un fond génétique différent. Ainsi, l'hypothèse la plus probable est que le phénotype découlant d'une déficience en Themis diffère selon l'espèce.

Le rôle de Themis dans la transduction du signal reçu par le TCR expliquerait le défaut de génération des LT CD4. Les thymocytes déficients pour Themis stimulés via leurs TCR sont incapables d'augmenter l'expression des marqueurs d'activation tels que CD5, CD69, IL-7R (Lesourne, Uehara et al. 2009) et présentent des défauts de phosphorylation d'ERK et de flux calcique (Fu, Vallee et al. 2009). De plus, les cellules CD4 SP déficientes pour Themis présentent un défaut d'expression de GATA-3 et Th-POK, facteurs de transcription requis pour la différenciation en thymocytes CD4 SP (Lesourne, Uehara et al. 2009). Une très forte stimulation par le TCR permet de rétablir l'expression de ces facteurs nucléaires et la fréquence des thymocytes CD4 SP. Cependant, l'expression transgénique de GATA-3 et Th-POK est insuffisante pour restaurer la maturation des thymocytes CD4 SP chez les souris déficientes pour Themis. Ces données indiquent que Themis est en amont ou agit indépendamment de ces facteurs de transcription. L'ensemble de ces résultats suggère fortement que le signal transmis par le TCR des thymocytes déficients pour Themis est court et/ou de faible intensité. Le modèle actuel de choix du lignage CD4/CD8 propose que la sélection des LT CD4 requière une signalisation intense et/ou soutenue par le TCR, au contraire des LT CD8. En accord avec ce modèle,

l'expression de Themis est particulièrement requise pour la sélection thymique des LT CD4. Ainsi, l'ensemble de ces données montre l'importance de la protéine Themis dans le développement thymique des LT.

## **Impact de Themis sur le développement des lymphocytes T régulateurs**

Chez les animaux déficients pour Themis, le nombre absolu et la fréquence de Treg sont réduits (Ishimaru, Yamada et al. 2008; Johnson, Aravind et al. 2009; Lesourne, Uehara et al. 2009). Cette donnée indique que l'expression de Themis est requise pour la différenciation thymique des Treg. De plus, la déficience en Themis affecterait la sélection des Treg de façon plus marquée que la génération de Tconv. Plusieurs hypothèses peuvent être émises quant à ce défaut de génération thymique des Treg.

En premier lieu, un défaut d'expression de Foxp3, facteur de transcription indispensable au développement des Treg, a été soupçonné. Mais, il a été exclu puisque son expression est similaire entre les thymocytes CD4 SP des rats contrôles BN et BN<sup>m</sup> (résultats non montrés). Cependant, comme décrit dans l'introduction, l'expression d'autres molécules, telles que CD25, CD28, CTLA4, TGF- $\beta$ R, en plus de Foxp3, est indispensable à leur différenciation. En périphérie, nous avons montré que l'expression de CD25, CTLA4, TGF- $\beta$ R est comparable entre les rats contrôles BN et BN<sup>m</sup> mais cela n'exclut pas un défaut d'expression au niveau du thymus. Il serait donc intéressant d'analyser leur expression par les thymocytes CD4 SP Foxp3<sup>+</sup>.

La production d'IL-2, cytokine importante pour le développement des Treg (Kramer, Schimpl et al. 1995; Fontenot, Rasmussen et al. 2005; Burchill, Yang et al. 2007; Soper, Kasprovicz et al. 2007), est diminuée chez les LT déficients pour Themis (Brockmeyer, Paster et al. 2010). Ce phénotype pourrait contribuer au défaut de sélection thymique des Treg.

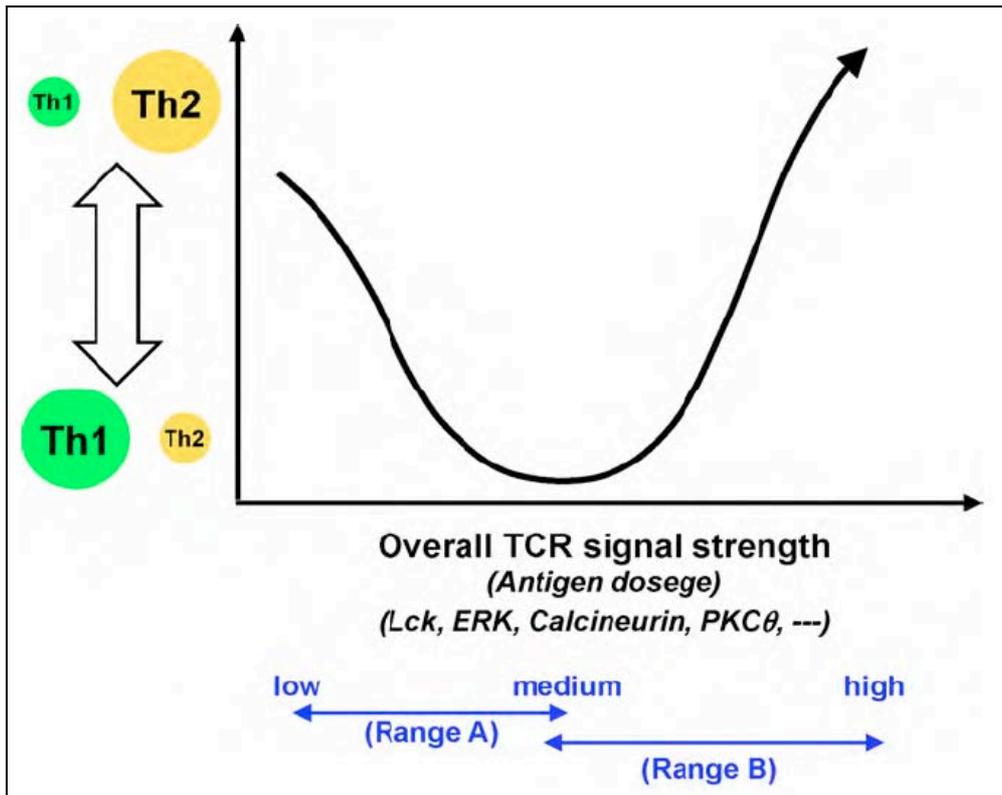
Enfin, une signalisation intense et soutenue par le TCR est requise pour la différenciation des Treg au niveau du thymus. Or, la fonction de Themis est de soutenir et/ou amplifier cette signalisation. Un défaut de Themis serait associé à une signalisation faible par le TCR responsable du défaut de sélection des Treg. En

accord avec cette hypothèse, les souris déficientes pour des protéines partenaires de Themis, telles que LAT (Koonpaew, Shen et al. 2006) et PLC $\gamma$ 1 (Fu, Chen et al. 2010), présentent un défaut de génération thymique des Treg.

### **Impact de Themis sur la fonction des lymphocytes T CD4 conventionnels**

Dans notre modèle, suite à une stimulation polyclonale en condition neutre in vitro, les LT CD4 périphériques de rats BN et BN<sup>m</sup> présentent des différences dans leur profil de prolifération et de sécrétion de cytokines. Les LT CD4 des rats BN<sup>m</sup> prolifèrent plus et produisent d'importantes quantités de cytokines de type 2 (IL-4, IL-5 et IL-13), d'IL-17 et immunorégulatrices (IL-10). Ces sécrétions sont associées à un défaut de sécrétion d'IFN- $\gamma$ . Une importante proportion des LT CD4 des rats BN<sup>m</sup> est hyperactivée (OX40<sup>high</sup> CD62L<sup>low</sup> CD45RC<sup>high</sup> CD25<sup>+</sup>) bien que les rats utilisés soient âgés de six semaines et, par conséquent, exempts de lésions inflammatoires intestinales. Afin de déterminer si les phénotypes observés sont dus à l'augmentation de la proportion de LT CD4 activés, les mêmes expériences ont été réalisées avec des LT CD4 naïfs CD62L<sup>+</sup> périphériques de rats BN et BN<sup>m</sup>. Ces cellules naïves présentent des capacités similaires à proliférer mais les différences dans leur profil de production de cytokines sont conservées. Les LT CD4 naïfs des rats BN<sup>m</sup> se différencient préférentiellement en LT Th2 et Th17 et présentent également une sécrétion moindre d'IFN- $\gamma$ .

Ces résultats peuvent s'expliquer par le rôle de Themis dans la voie de signalisation par le TCR. En effet, la polarisation des LT CD4 naïfs en cellules effectrices Th1/Th2 est dictée par le milieu cytokinique environnant mais également par l'intensité du signal transmis via leur TCR. Un signal d'intensité faible ou très élevée favoriserait une différenciation des LT en cellules Th2 alors qu'un signal d'intensité intermédiaire entraînerait une polarisation des LT CD4 en LT Th1 (Figure 34) (Nakayama and Yamashita 2010). Ce modèle est soutenu par différents travaux utilisant des populations T CD4, par l'expression transgénique du TCR $\alpha\beta$  présentant un répertoire restreint (Constant, Pfeiffer et al. 1995; Yamane, Zhu et al. 2005). Un autre travail a démontré que parmi le répertoire de LT CD4 restreint seulement par l'expression de la chaîne  $\beta$  du TCR, les cellules T qui expriment un TCR de faible



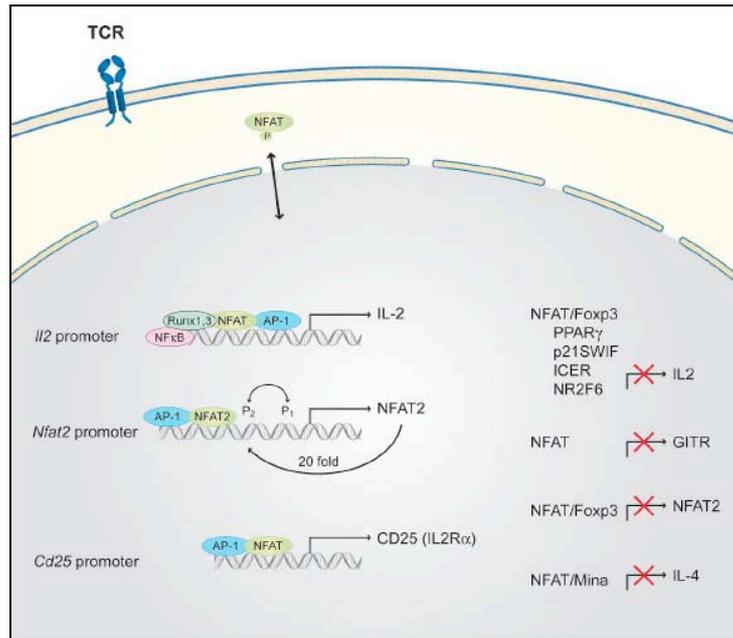
Extrait de Nakayama et al., *Seminars in Immunology*, 2010 (Nakayama and Yamashita 2010).

**Figure 34 : Modèle biphasique de différenciation en LT Th2.**

D'après ce modèle, une signalisation très forte ou faible par le TCR favorise la différenciation des LT CD4 naïfs en cellules Th2. Un signal d'intensité intermédiaire permet la génération de LT Th1.

affinité se différencient préférentiellement en LT Th2 à condition qu'elles soient stimulées en l'absence de compétition avec les LT de forte affinité (Milner, Fazilleau et al. 2010). En accord avec ce modèle, une forte dose d'antigènes conduit à la différenciation de LT CD4 producteurs d'INF- $\gamma$  tandis qu'une plus faible ou une quantité très élevée de ligands favorise l'expression de GATA-3 et d'IL-4 par les LT CD4 activés (Burstein and Abbas 1993; Hosken, Shibuya et al. 1995; Yamane, Zhu et al. 2005). De façon similaire aux LT Th1, les LT Th17 seraient générés suite à une interaction forte de leur TCR avec leur ligand (Gomez-Rodriguez, Sahu et al. 2009).

Par ailleurs, la signalisation intracellulaire induite par l'engagement du TCR est différente au sein des cellules se différenciant en LT Th1 ou Th2. Des modèles murins déficients pour des molécules impliquées dans la signalisation proximale du TCR telles que LAT (Aguado, Richelme et al. 2002; Mingueneau, Roncagalli et al. 2009) ou PLC $\gamma$ 1 (Fu, Chen et al. 2010) présentent respectivement une polarisation des LT CD4 en Th2 et un défaut de différenciation des LT CD4 en Th1. De plus, un signal faible transmis par le TCR est insuffisant pour induire une augmentation de la phosphorylation des protéines ERK, requise pour l'inhibition de la transcription de GATA-3 (Yamane, Zhu et al. 2005). Les protéines NFAT seraient impliquées dans une boucle de rétrocontrôle négatif de l'expression de l'IL-4 (Figure 35) (Ansel, Djuretic et al. 2006). Par exemple, la liaison directe de NFAT et Mina résulte en la répression de l'expression du gène de l'IL-4 (Okamoto, Van Stry et al. 2009). En l'absence d'expression de NFAT1 et NFAT4, les LT CD4 naïfs stimulés in vitro en condition neutre et de façon polyclonale sécrètent d'importantes quantités d'IL-4 (Rengarajan, Tang et al. 2002). En plus d'une diminution de la phosphorylation d'ERK et du flux calcique, les réponses Th2 ont également été associées avec une activation réduite des facteurs nucléaires c-Jun et NF- $\kappa$ B (Jun, Wilson et al. 2003). Ainsi, un défaut de signalisation par le TCR influence la polarisation des LT CD4 naïfs en LT effecteurs.



Extrait de Hermann-Kleiter et al., *Blood*, 2010 (Hermann-Kleiter and Baier 2010).

**Figure 35 : Représentation schématique des partenaires de NFAT et de leur rôle.**

NFAT associé à AP-1, NF-κB et Runx1/3 initie la transcription du gène de l'IL-2. Il est également requis pour l'expression de CD25. En revanche, son association avec Foxp3 inhibe la production d'IL-2. Il participe également à la régulation négative de l'expression de GITR. Enfin, en coopération avec le facteur de transcription Mina, il inhibe la transcription de l'IL-4.

L'ensemble de ces résultats est en accord avec le biais de polarisation en cellules Th2 par les LT CD4 déficients pour Themis. En effet, une déficience en Themis résulte en une faible signalisation par le TCR responsable d'un défaut de phosphorylation d'ERK, d'une réduction du flux calcique et d'une diminution de l'activation du couple NFAT/AP1 (Fu, Vallee et al. 2009; Brockmeyer, Paster et al. 2010). Les défauts fonctionnels des Tconv déficients pour Themis sont similaires aux défauts de différenciation des LT CD4 des souris déficientes pour LAT ou PLC $\gamma$ 1, molécules impliquées dans la signalisation proximale du TCR au même titre que Themis. Le défaut de sécrétion d'IFN- $\gamma$  peut favoriser ce biais de différenciation (Mosmann and Coffman 1989; Paul and Seder 1994).

Par ailleurs, la lymphopénie secondaire à la déficience en Themis peut être un facteur favorisant une polarisation en cellules Th2 (Milner, Ward et al. 2007). Des pathologies secondaires à une lymphopénie dans des modèles animaux et chez l'Homme ont été associées à des désordres de type 2 (Milner, Ward et al. 2007; Ozcan, Notarangelo et al. 2008). La génération d'animaux conditionnellement déficients pour Themis dans les LT périphériques permettrait d'éliminer ce paramètre et d'étudier seulement l'impact d'une déficience en Themis sur la polarisation des LT CD4 naïfs. Un moyen alternatif serait d'abolir l'expression de Themis au moyen de shRNA dans des LT CD4 naïfs. Leur stimulation *in vitro* en condition polyclonale et neutre déterminera si l'absence de Themis est le facteur responsable de ce biais de différenciation. Par ailleurs, mon équipe a montré que le fond génétique des rats BN est particulier en terme de polarisation de la réponse immune. En effet, après une stimulation polyclonale, les LT CD4 de ces rats présentent une capacité accrue à produire des cytokines de type 2 (Subra, Cautain et al. 2001). Cette différenciation préférentielle en cellules Th2 des LT CD4 de fond génétique BN pourrait contribuer au biais de polarisation des LT CD4 naïfs des rats BN<sup>m</sup>. Afin de tester cette hypothèse, la mutation des rats BN<sup>m</sup> a été introduite dans le fond génétique Lewis, fond génétique pro-Th1 (Subra, Cautain et al. 2001). Les mêmes analyses vont être effectuées et permettront de déterminer l'impact de la déficience en Themis et l'influence du fond génétique sur ce biais de différenciation en LT Th2.

En revanche, les données bibliographiques sur le rôle de la signalisation par le TCR lors de la différenciation en cellules Th17 ne permettent pas d'expliquer les résultats obtenus chez les rats BN<sup>m</sup>. En effet, une signalisation soutenue par le TCR, l'activation de NFAT et un important flux calcique sont requis pour l'expression de

l'IL-17A (Gomez-Rodriguez, Sahu et al. 2009). Cependant, elle peut être expliquée par la capacité réduite des LT déficients pour Themis à produire de l'IL-2, cytokine connue pour inhiber la différenciation en cellules Th17 en présence de TGF- $\beta$  (Laurence, Tato et al. 2007) et/ou par le défaut de sécrétion d'IFN- $\gamma$ , cytokine antagoniste de la voie de différenciation Th17 (Harrington, Hatton et al. 2005; Park, Li et al. 2005).

Les mécanismes sous-jacents au défaut de sécrétion d'IFN- $\gamma$  sont l'objet d'études en cours. Des expériences de différenciation in vitro à partir de LT CD4 naïfs issus de rats BN et BN<sup>m</sup> ont permis d'exclure l'incapacité des cellules T CD4 de rats BN<sup>m</sup> à se différencier en LT Th1 in vitro en réponse à l'IL-12. De plus, nous avons montré que les thymocytes CD4 SP déficients pour Themis présentent ce défaut de production d'IFN- $\gamma$ . Cette donnée suggère que Themis a un impact direct sur la synthèse d'IFN- $\gamma$ .

Dans le modèle des rats LEC, suite à une stimulation polyclonale, les LT issus de la rate prolifèrent moins et produisent des quantités moindres d'IL-2, d'IL-4 et d'IL-10 (Ishimaru, Yamada et al. 2008). Au contraire, les LT issus des mLN se divisent plus et produisent d'importantes quantités de cytokines de type 1 (IL-2 et IFN- $\gamma$ ) associées à des niveaux faibles d'IL-10. La prolifération plus importante des cellules T mésentériques peut être expliquée par une pré-activation due à la présence d'inflammation au niveau des intestins des rats LEC. De plus, leur mode de stimulation in vitro est fort (0,5  $\mu$ g/mL d'anticorps anti-CD3 et 5  $\mu$ g/mL d'anticorps anti-CD28). Ces deux biais expérimentaux pourraient expliquer la différenciation des LT issus des mLN en cellules Th1. Un signal soutenu et intense suffirait à contourner l'absence de Themis. Enfin, l'inactivation simultanée des gènes Themis et Ptpk et/ou le fond génétique peuvent également expliquer ces différences.

Chez la souris, les résultats concernant la capacité des LT périphériques à proliférer et la sécréter des cytokines sont contradictoires. Des travaux montrent une même aptitude à proliférer (Johnson, Aravind et al. 2009; Lesourne, Uehara et al. 2009; Patrick, Oda et al. 2009) et produire de l'IL-2 (Patrick, Oda et al. 2009). Mais, l'équipe de Cornall et Schwartz met en évidence une capacité diminuée des LT CD4 à proliférer (Fu, Vallee et al. 2009). Enfin, l'utilisation de lignées de LT allogéniques dérivées de LT périphériques de souris compétentes et déficientes pour Themis révèle une sécrétion d'IL-4 similaire (Patrick, Oda et al. 2009). Ainsi, les différents

modèles murins de déficience en Themis (souris et rats LEC et BN<sup>m</sup>) présentent des différences importantes concernant la polarisation des LT CD4. Elles peuvent s'expliquer par les protocoles expérimentaux utilisés (population cellulaires analysées et mode de stimulation).

## **Impact de Themis sur la fonction des lymphocytes T CD4 régulateurs**

Un défaut fonctionnel considérable des Treg issus des rats BN<sup>m</sup> a été mis en évidence *in vitro* dans des expériences de coculture de Tconv avec des Treg. En effet, lorsque le rapport est d'une cellule effectrice pour une cellule régulatrice sauvage, la prolifération est fortement contrôlée par les Treg compétents pour Themis. Par contre, si la cellule Treg est déficiente pour Themis, aucune suppression de prolifération n'est observée. Ces expériences ont été réalisées sur des rats de six semaines ce qui permet d'exclure un impact de l'inflammation intestinale développée par les rats BN<sup>m</sup> sur la dysfonction des Treg. La signalisation par le TCR est nécessaire pour l'exercice des fonctions suppressives des Treg. Au niveau moléculaire, il est clairement établi que Foxp3 est un facteur de transcription indispensable à la fonction des Treg, en régulant directement son expression et celle de diverses protéines telles que CD25, CTLA-4, GITR, ZAP-70, IL-2, miR-155 (Marson, Kretschmer et al. 2007; Zheng, Josefowicz et al. 2007). Le niveau d'expression de Foxp3 par les Treg des rats BN et BN<sup>m</sup> est comparable révélant que l'expression de Themis, en plus de celle de Foxp3, est requise pour l'exercice des fonctions suppressives des Treg. Etant donné le rôle de Themis dans la signalisation proximale du TCR, nous pouvons soupçonner qu'un faible signal par le TCR, suffisant pour l'expression de Foxp3, est limitant pour l'expression d'autres molécules indispensables à la fonction des Treg. L'expression de molécules membranaires indispensables à leurs fonctions telles que CD25, CTLA-4, GITR, IL-10R et TGF-βR à la surface des Treg de rats BN et BN<sup>m</sup> a été analysée. Aucune différence n'a été mise en évidence. Mais, cette étude non exhaustive doit être complétée par l'analyse de l'expression d'autres protéines comme Helios (Getnet, Grosso et al. 2010), IL-35 (Collison, Workman et al. 2007), OX40 (Valzasina, Guiducci et al. 2005; Griseri, Asquith et al. 2010), ICOS (Herman, Freeman et al. 2004). Pour exercer sa fonction

au niveau du noyau cellulaire, Foxp3 interagit avec diverses molécules telles que les facteurs de transcription NFAT, AML1 (acute myeloid leukemia)/Runx1, ROR $\gamma$ t, Eos (eosinophils) et des facteurs de remodelage de la chromatine incluant BRG1, TIP49a (TBP-interacting protein 49a), TIP49b, Ku70, des dé-acétylases (HDAC) et acétyl transférase (HAT) d'histones (Li and Greene 2007). Par conséquent, Themis étant nécessaire à l'activation de NFAT, son absence pourrait déréguler la transcription de gènes dépendante de l'interaction de Foxp3 et NFAT (Figure 35). Enfin, la localisation nucléaire de Themis (Lesourne, Uehara et al. 2009) suggère qu'il pourrait coopérer avec Foxp3 pour réguler la transcription des gènes importants pour la fonction des Treg. En effet, le complexe NFAT/AP1/Foxp3 est directement requis pour l'activation de la transcription du gène de l'IL-2 et les LT CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> issus de souris déficientes pour Themis présentent un défaut de production d'IL-2 *in vitro* (Brockmeyer, Paster et al. 2010). Une autre possibilité est l'incapacité du complexe moléculaire NFAT/AP1/Foxp3 à déplacer Runx1 constitutivement lié au promoteur de l'IL-2 (Ono, Yaguchi et al. 2007). L'absence d'interaction entre Runx1 et Foxp3 entraîne un défaut de suppression de l'expression d'IL-2 par les Treg et une atténuation de leurs fonctions suppressives. De plus, une déficience pour Runx1 ou Cbfb $\beta$  (protéine nécessaire à la fonction des molécules Runx) spécifique aux Treg compromet leurs capacités régulatrices et résulte en l'apparition de désordres autoimmuns chez la souris (Kitoh, Ono et al. 2009). En revanche, l'expression par les Treg de CD25 et CTLA-4, également dépendante du complexe NFAT/AP1/Foxp3, est comparable entre les rats contrôles BN et BN<sup>m</sup>. Enfin, un flux calcique intense est nécessaire pour l'exercice des fonctions suppressives des Treg (Oh-Hora, Yamashita et al. 2008). Le défaut de flux calcique reporté dans les LT déficients pour Themis peut également expliquer la diminution des capacités suppressives des Treg (Fu, Chen et al. 2010). Ainsi, la signalisation par le TCR dépendante de Themis est requise pour la fonctionnalité des Treg. En accord avec nos résultats, d'autres modèles animaux de déficience en molécules impliquées dans la signalisation proximale du TCR et interagissant avec Themis, telles que LAT (Chuck, Zhu et al. 2010) et PLC $\gamma$ 1 (Fu, Chen et al. 2010), présentent également un défaut fonctionnel de Treg *in vitro*. Le défaut fonctionnel des Treg déficients pour LAT est associé à des défauts de production d'IL-10 et de TGF- $\beta$ , de flux calcique, de phosphorylation d'ERK et une diminution d'expression de CTLA-4. Chez les souris déficientes pour

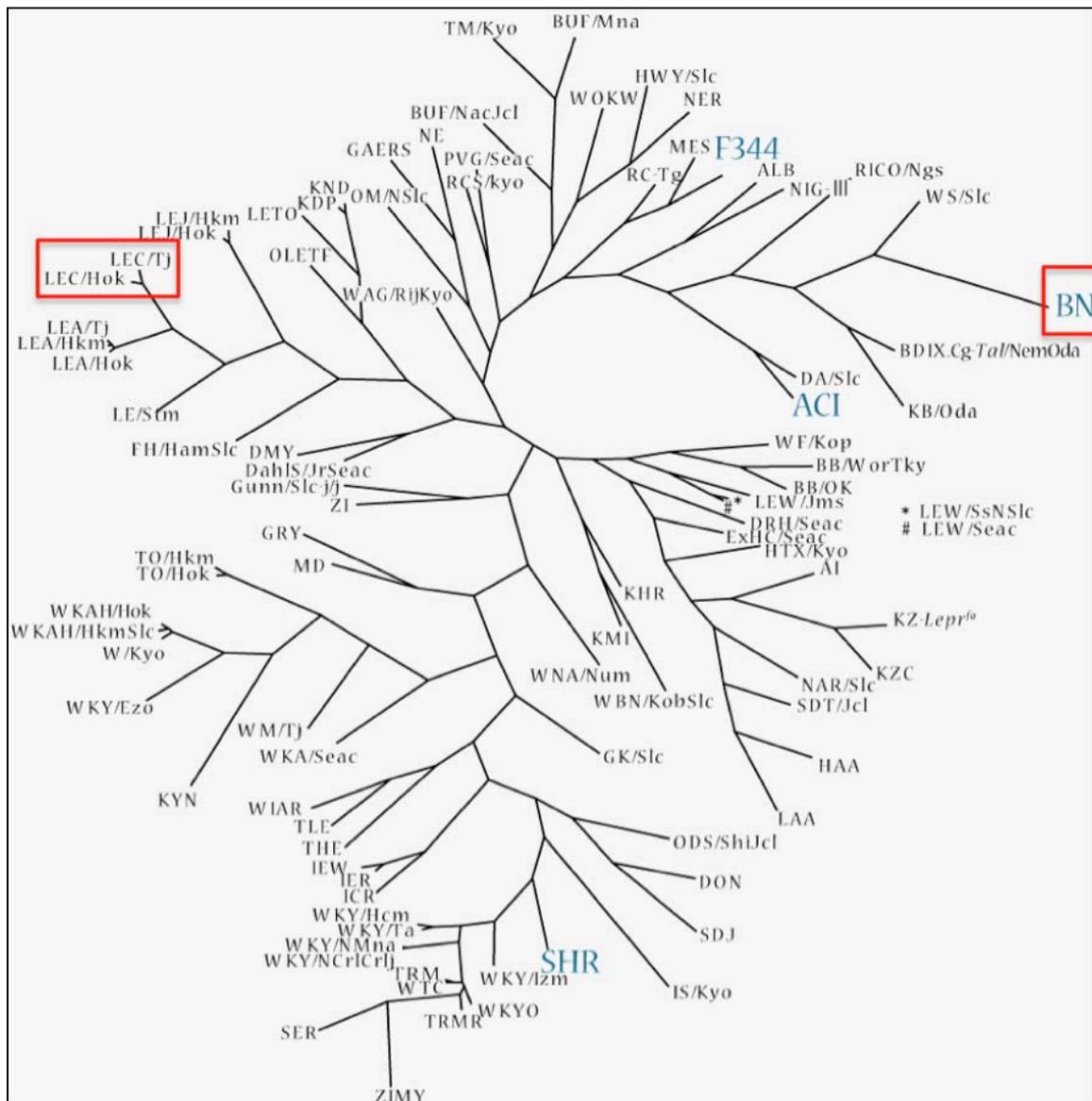
PLC $\gamma$ 1, les défauts de flux calcique, de phosphorylation d'ERK et de l'activation des voies AP-1, NFAT et NF- $\kappa$ B contribuerait à la réduction des fonctions suppressives des Treg.

De façon intéressante, ce phénotype de défaut de fonction des Treg n'a pas été reporté chez la souris et il est moins drastique chez les rats LEC. Ce défaut majeur chez les rats BN<sup>m</sup> est peut être renforcé par le fond génétique BN. En effet, mon équipe de recherche a récemment publié l'effet d'une mutation dans le gène *Vav1* sur le développement des Treg (Colacios, Casemayou et al. 2011). Le polymorphisme observé a pour conséquence une activité constitutive de la protéine associée à une augmentation de la proportion et du nombre absolu de Treg thymiques et périphériques chez le rat BN. Mais leurs fonctions suppressives *in vitro* sont normales. Cependant, compte tenu de l'importance de *Vav1* dans la signalisation par le TCR et l'activation des LT, un déficit en *Themis* associée à une hyperactivation de *Vav1* pourrait contribuer au défaut fonctionnel des Treg des rats BN<sup>m</sup>. Afin de tester cette hypothèse, des rats de fond génétique Lewis portant les mutations au niveau du gène *Themis* ou, des gènes *Themis* et *Vav1* sont en cours de génération. La comparaison des capacités régulatrices des Treg de ces rats permettra de déterminer si leur perte de fonction est la conséquence d'un effet cumulé de la déficience en *Themis* et du polymorphisme de *Vav1*.

Afin de définir les mécanismes moléculaires affectés par l'absence de *Themis* et indispensables aux fonctions suppressives des Treg, des expériences plus poussées de biologie moléculaire et de protéomique sont nécessaires. Il serait intéressant d'analyser le signalosome de *Themis* à l'aide de souris exprimant la protéine *Themis* fusionnée avec une étiquette. *Themis* serait isolé avant et après une stimulation par leur TCR des cellules T Foxp3<sup>-</sup> et Foxp3<sup>+</sup>. Les protéines liées à *Themis* seraient identifiées par spectrométrie de masse. Ces expériences, en plus de donner des informations sur la fonction de *Themis*, permettraient une meilleure compréhension de la signalisation intracellulaire par le TCR dans les LT CD4 effecteurs et régulateurs.

## **Themis et pathologies inflammatoires et auto-immunes**

La déficience en Themis conférerait une susceptibilité au développement d'inflammation intestinale. Les rats BN<sup>m</sup>, comme les rats LEC, développent spontanément une MICI dont les caractéristiques physiopathologiques sont distinctes. Une colite affecte les rats LEC dès l'âge de 4 semaines (Ishimaru, Yamada et al. 2008). L'incidence est de 100% lorsqu'ils atteignent 8 semaines d'âge. Le poids des rats LEC est significativement réduit par rapport à celui des rats contrôles. Les lésions inflammatoires affectent seulement le cæcum et le colon. L'étude histologique du côlon de ces animaux révèle une hyperplasie de la muqueuse, la formation d'ulcère et l'infiltration de cellules mononuclées. La majorité des cellules infiltrantes sont des LT CD4 et de macrophages. Au niveau des mLN, le nombre total de cellules, et en particulier celui des LT CD4, sont très augmentés chez les rats LEC par rapport aux rats contrôles. La physiopathologie de cette colite a été associée à une activation des LT CD4 en cellules Th1. En effet, les LT issus des mLN stimulés de façon polyclonale se différencient en LT Th1, producteurs d'IFN- $\gamma$  et l'injection d'anticorps neutralisant cette cytokine supprime les lésions inflammatoires intestinales. Ces données suggèrent que les causes de la colite affectant les rats LEC sont une activation des LT CD4 en cellules Th1 et un défaut des Treg à contrôler cette différenciation. Dans notre modèle, l'incidence atteint 50% chez les rats BN<sup>m</sup> âgés de 12 semaines. L'ensemble de l'intestin présente des lésions macroscopiques et microscopiques. Elles se caractérisent par une infiltration importante de granulocytes, de macrophages et de quelques cellules T. La formation de granulomes a aussi été observée mais contrairement aux rats LEC, l'absence d'ulcère a été notée. Ces lésions tissulaires affectent principalement la musculuse et sous-muqueuse de la paroi intestinale, la muqueuse étant intacte tandis que la muqueuse des rats LEC est sévèrement endommagée. Le développement de cette MICI est associé à un biais dans la polarisation des LT CD4 effecteur en cellules Th2 et Th17 issus des mLN, une importante concentration de cytokines pro-inflammatoires au niveau des tissus intestinaux lésés (TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL-6, IL-13, IL-17, CCL2 et CCL3) ainsi qu'à un défaut des capacité suppressives des LT CD4<sup>+</sup> CD25<sup>bright</sup> *in vitro*.



Extrait de <http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/nbr/phylo.aspx>

**Figure 36 : Arbre phylogénétique de 132 souches de rats de laboratoire.**

Les rats BN et LEC sont phylogénétiquement très éloignés.

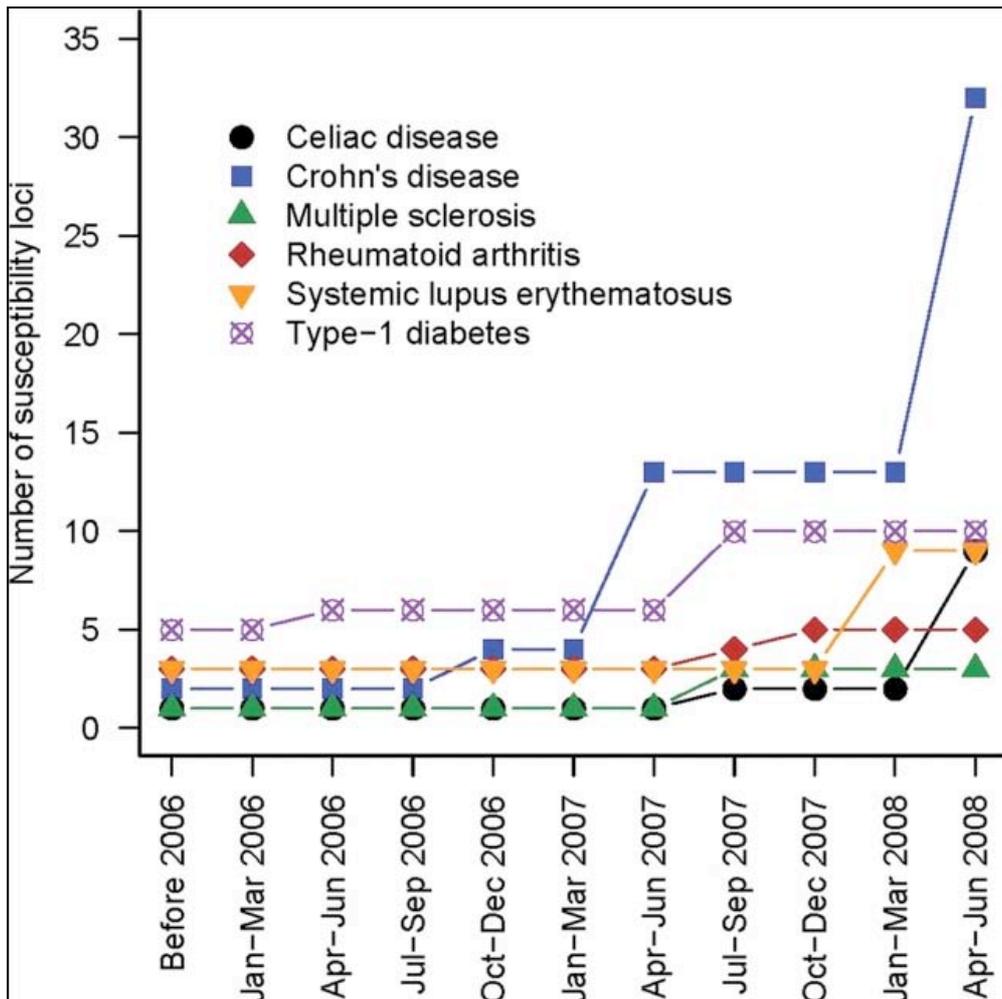
Ces divergences dans la physiopathologie des MICI des modèles les rats LEC et BN<sup>m</sup> peuvent être dues au fond génétique des rats, étant donnée leur importante différence phylogénétique (Figure 36) (Thomas, Chen et al. 2003). En effet, par exemple, le rat BN exprime une protéine Vav1 hyperactive. Vav1 seul n'est pas responsable de l'inflammation puisque les rats BN sont sains. Par contre, la déficience en Themis associée à ce variant de Vav1 peuvent augmenter la susceptibilité à développer une MICI. Pour tester cette hypothèse, des rats de fond génétique Lewis portant les mutations au niveau du gène Themis ou des gènes Themis et Vav1 sont en cours de génération.

Par ailleurs, les rats LEC présentent une importante délétion au niveau du chromosome 1 affectant le gène *Themis* et *Ptprk* (Iwata, Sasaki et al. 2010). L'expression de *Ptprk* est normale chez les rats BN<sup>m</sup> et le développement de MICI, comme la lymphopénie T CD4, sont des phénotypes observée depuis plus de cinq génération de rats BN<sup>m</sup>, suggérant un lien étroit entre l'inactivation de Themis et la susceptibilité à développer une MICI. Ainsi, une déficience en Themis est suffisante pour augmenter la probabilité à développer une MICI.

Les rats BN<sup>m</sup> développent spontanément une MICI associée à une lymphopénie T CD4. La lymphopénie est un facteur favorisant le développement d'auto-immunité et d'inflammation (Gleeson, Toh et al. 1996; King, Ilic et al. 2004). Cependant, des rats BN rendus lymphopéniques par thymectomie et déplétion de LT CD4 et dont le phénotype immunologique (fréquence, nombre absolu et activation des LT CD4) est similaire aux rats BN<sup>m</sup>, sont exempts de lésions inflammatoires intestinales. Ces données montrent que la lymphopénie seule est insuffisante pour le développement de MICI. Ainsi, la déficience en Themis contribue au développement de cette maladie. Une étude du groupe de Khoruts montre que la lymphopénie peut affecter le répertoire des LT en absence de Treg (Winstead, Reilly et al. 2010). Etant donné le défaut fonctionnel de Treg dans les modèles de rat déficients en Themis, il serait intéressant d'analyser le répertoire des LT CD4. Il pourrait être enrichi en LT autoréactifs. Le mécanisme physiopathologique pourrait être le suivant : un défaut d'expression de Themis résulterait en une hyperactivation des LT CD4 effecteurs, une altération de leur répertoire du TCR et un biais de leur polarisation associés à un défaut fonctionnel des Treg. L'homéostasie intestinale étant complexe et finement régulée, une déficience en Themis responsable de ces phénotypes aurait pour conséquence le développement d'une inflammation intestinale.

Une déficience en Themis confère une susceptibilité à développer une MICI. L'absence de Themis responsable d'un défaut fonctionnel des Treg associé à un biais de différenciation des Tconv en Th2 et Th17 affecterait l'homéostasie du système immunitaire intestinale. En accord avec notre modèle, les souris déficientes pour les partenaires de Themis dans la signalisation du TCR comme LAT (Genton, Wang et al. 2006) et PLC $\gamma$ 1 (Fu, Chen et al. 2010) développent des manifestations auto-immunes associées à des dysfonctions des populations Treg et Tconv. Les souris déficientes pour PLC $\gamma$ 1 sont atteintes d'une production excessive d'auto-anticorps d'isotypes E et G1 associée à une néphrite. Les souris déficientes pour PLC $\gamma$ 1 présentent d'importantes lésions affectant divers organes (organes lymphoïdes secondaires, thymus, foie, poumons, peau, oreilles et rectum). Des auto-anticorps ont été détectés dans le sérum de ces animaux. Ainsi, Themis et ses partenaires, via leur impact sur les fonctions suppressives des Treg et la différenciation des Tconv, sont requis pour prévenir l'apparition de manifestations inflammatoires ou auto-immunes.

Les rats BN<sup>m</sup> développent spontanément une MICI dont les caractéristiques physiopathologiques sont similaires à celles de la maladie de Crohn chez l'Homme. En effet, l'ensemble de l'intestin présente des lésions macroscopiques (oedèmes, érythèmes, hypersécrétion de mucus) et microscopiques (infiltration de granulocytes et macrophages, formation de granulomes) principalement observées au niveau de la musculature et sous-muqueuse de la paroi intestinale. Les cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL1- $\beta$ , l'IL-2, l'IL-6, l'IL-17 et CCL2 sont également détectées dans les biopsies intestinales des patients atteints de MICI, en particulier de la MC (Reimund, Wittersheim et al. 1996; Sartor 2006; Abraham and Cho 2009; Strober, Zhang et al. 2010; Strober and Fuss 2011). En revanche, les symptômes cliniques tels que la perte de poids, la diarrhée ou la présence de sang dans les fèces sont absents chez les rats BN<sup>m</sup>. Ainsi, le rat BN<sup>m</sup> représente un modèle spontané de MICI à considérer comme un modèle de choix pour disséquer les mécanismes physiopathologiques sous-jacents à la MC et pour la mise au point de traitements curatifs.

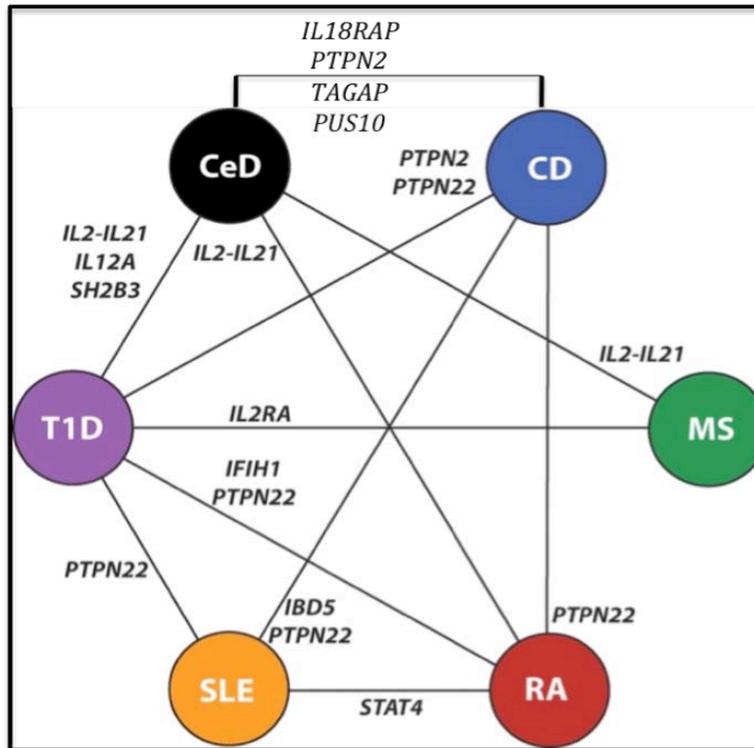


Extrait de Lettre, *Human Molecular Genetics*, 2008 (Lettre and Rioux 2008).

**Figure 37 : Importance des GWAS pour la découverte de région de susceptibilité à des pathologies auto-immunes.**

Les GWAS ont permis l'identification de nombreux loci de susceptibilité à des désordres auto-immuns.

Chez l'Homme, les études d'association génomique (GWAS) permettent d'identifier les variations génétiques responsables de pathologies. Le principe de ces travaux est de comparer les génomes d'individus sains et atteints de la pathologie considérée grâce à des SNP. Ainsi, la forte représentation de variants alléliques au sein de la population affectée suggère fortement leur implication dans la susceptibilité à développer ce désordre. Par exemple, des polymorphismes dans les gènes codant pour les CMH de classe II ont été identifiés comme des facteurs de susceptibilité à diverses pathologies auto-immunes telles que la SEP, le diabète de type 1, la MC, la CeD (Fernando, Stevens et al. 2008). Dans ce cas, l' « odd ratio » mesure la force d'une association entre un polymorphisme dans un gène et le développement d'une pathologie. L'interprétation simplifiée de ce paramètre est la suivante : si le variant allélique n'est pas lié à la maladie, l'odd ratio est proche de 1 (soit une probabilité de 0.5). Si la variation génétique est positivement liée à la maladie, sa valeur est supérieure à 1. Ce polymorphisme est alors considéré comme un facteur de risque. Enfin, si l'expression du SNP est liée négativement à la maladie, sa valeur est inférieure à 1. Cette variation allélique présente alors un effet protecteur. L'association observée peut être le résultat de différents processus : cause véritable, pur hasard, résultat d'un biais, résultat d'un facteur confondant. Ce type d'étude nécessite donc d'être effectué sur des cohortes d'individus assez homogènes (genre, âge, mode de vie...), permettant de minimiser l'intervention des facteurs environnementaux. La même analyse doit ensuite être confirmée avec d'autres cohortes dont les facteurs environnementaux sont différents. Ces dernières années, la multiplication de ce type d'analyse a permis l'identification de nombreux loci de susceptibilité à différentes pathologies (Figure 37). Il est intéressant de noter que des régions génomiques peuvent être communes entre deux ou plusieurs désordres (Figure 38) (Franke, Balschun et al. 2008; Lettre and Rioux 2008; Smyth, Plagnol et al. 2008). Toutefois, ces régions conférant une probabilité plus élevée à développer une pathologie contiennent souvent de nombreux gènes. L'identification du gène causal est donc un défi difficile à relever en pathologie humaine. En effet, chez l'Homme, le développement de désordres auto-immuns est le résultat de divers facteurs génétiques et environnementaux. Par conséquent, l'hétérogénéité génétique importante des populations humaines en plus de la variabilité considérable des facteurs environnementaux représente un obstacle pour comprendre la physiopathologie. Dans ce contexte, les modèles animaux constituent des systèmes



Adapté de Lettre, *Human Molecular Genetics*, 2008 (Lettre and Rioux 2008) et Festen, *Plos Genetics*, 2011 (Festen, Goyette et al. 2011).

**Figure 38 : Un locus ou un gène prédispose à plusieurs désordres auto-immuns.**

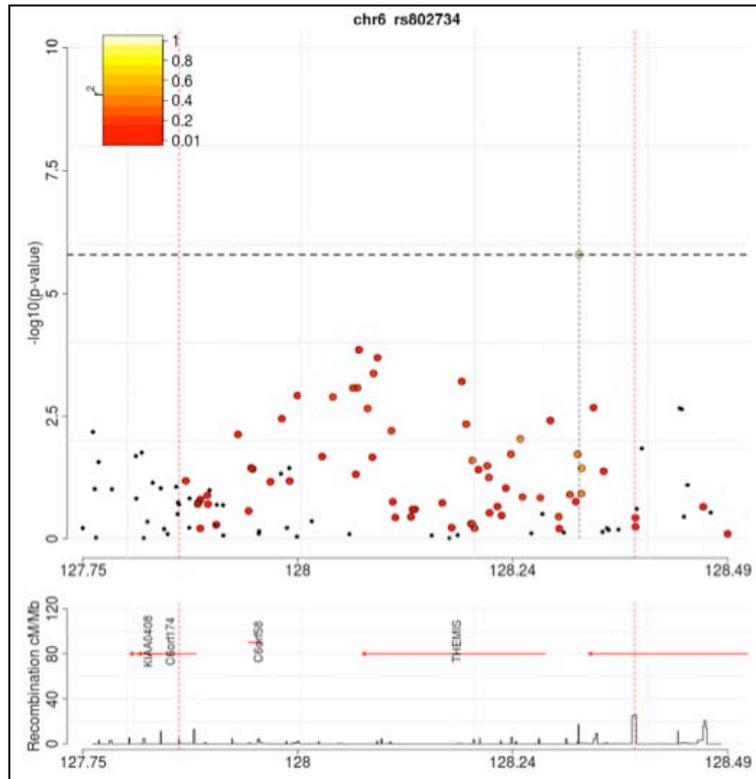
Ce réseau suggère l'existence de mécanismes physiopathologiques communs entre ces maladies auto-immunes dont les symptômes cliniques sont très différents.

- CD : la maladie de Crohn
- CeD : la maladie Cœliaque
- MS : la sclérose en plaques
- RA : l'arthrite rhumatoïde
- SLE : le lupus systémique érythémateux
- T1D : le diabète de type 1

permettant le contrôle des facteurs environnementaux et l'élimination de l'hétérogénéité génétique. Ainsi, l'identification des gènes impliqués dans l'apparition de la pathologie auto-immune et la compréhension des mécanismes d'action sous-jacents à la physiopathologie du désordre sont facilitées.

De récents GWAS ont permis d'identifier de nouveaux loci de susceptibilité à des désordres inflammatoires causés par une déficience du système immunitaire, comme la CeD (Dubois, Trynka et al. 2010) et la Sclérose en Plaques (SEP) (Sawcer, Hellenthal et al. 2011) (Figure 39). Ces locus de susceptibilité contiennent plusieurs gènes. De façon intéressante, un polymorphisme dans la région contenant Themis confère une susceptibilité à développer ces désordres inflammatoires de façon très significative ( $P_{value}$  combinée :  $2,62 \times 10^{-14}$  pour la CeD et  $5,5 \times 10^{-9}$  pour la SEP). L'odd ratio est de 1,17 pour la CeD et de 1,1 pour la SEP. Dans chaque de ces régions, Themis est le gène candidat. Compte tenu des différents travaux effectués sur cette protéine dans les modèles animaux, l'implication de Themis dans la physiopathologie de désordres inflammatoires est attendue. En effet, son rôle dans la biologie des LT CD4 effecteurs et régulateurs, en agissant dans la signalisation du TCR, sous-entend que toute altération de sa fonction peut avoir des conséquences dramatiques sur l'homéostasie des LT et de l'organisme en général.

Certains gènes de susceptibilité à la MC confèrent également un risque supérieur à développer la CeD (Festen, Goyette et al. 2011). De plus, une très significative association entre l'IL23R et le développement de MICI (Duerr, Taylor et al. 2006), du psoriasis (Cargill, Schrodi et al. 2007), de la spondylarthrite ankylosante (Burton, Clayton et al. 2007) indiquent que les MICI partagent des associations génétiques avec certaines autres pathologies inflammatoires chroniques. Ainsi, l'impact du polymorphisme de Themis dans le développement de la MC et de ces autres pathologies inflammatoires chroniques doit être étudié.



Extrait de Sawcer, *Nature*, 2011 {Sawcer, 2011 #2651}.

**Figure 39 : Un polymorphisme dans une locus contenant Themis confère une susceptibilité à la SEP.**

*Graphique supérieur* : En abscisse, la significativité de chaque SNP testé pour cette région ; en ordonnée, la position sur le chromosome en mégabases (Mb).

*Graphique inférieur* : Localisation des gènes contenus dans cette région.

Le SNP rs802734, représenté par une ligne en pointillé vertical, est significativement associé avec le développement de la SEP chez l'Homme. La région contient plusieurs gènes. Mais, compte tenu de la fonction de Themis dans le système immunitaire, il est le gène candidat. Il est intéressant de noter qu'il favorise également l'apparition de la CeD.

En conclusion, notre étude associe une déficience en Themis au développement spontané d'une MICI chez le rat BN. L'apparition de cette inflammation intestinale est fortement liée à un défaut fonctionnel des Treg, associé à une hyperactivation et à un biais de polarisation des Tconv. De plus, le transfert adoptif de Treg compétents pour Themis ou la déplétion des LT CD4 chez les rats BN<sup>m</sup> protège les animaux de l'apparition de lésions intestinales. La physiopathologie de la MICI développée par les rats BN<sup>m</sup> et de la MC chez l'Homme partage de nombreuses caractéristiques. Ainsi, il serait intéressant de déterminer si Themis est associé au développement de la MC chez l'Homme, et d'étudier si les mécanismes physiopathologiques mis en évidence dans notre modèle sont les mêmes chez les patients atteints de la MC. De plus, le rat BN<sup>m</sup>, qui développe spontanément une MICI, constituerait un modèle animal de choix pour la mise au point de traitements curatifs pour la MC.

## ***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

- Abraham, C. and J. H. Cho (2009). "Inflammatory bowel disease." N Engl J Med **361**(21): 2066-2078.
- Abreu, M. T. (2010). "Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function." Nat Rev Immunol **10**(2): 131-144.
- Acevedo-Arozena, A., S. Wells, et al. (2008). "ENU mutagenesis, a way forward to understand gene function." Annu Rev Genomics Hum Genet **9**: 49-69.
- Afkarian, M., J. R. Sedy, et al. (2002). "T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells." Nat Immunol **3**(6): 549-557.
- Aguado, E., S. Richelme, et al. (2002). "Induction of T helper type 2 immunity by a point mutation in the LAT adaptor." Science **296**(5575): 2036-2040.
- Agui, T., M. Oka, et al. (1990). "Maturational arrest from CD4+8+ to CD4+8- thymocytes in a mutant strain (LEC) of rat." J Exp Med **172**(6): 1615-1624.
- Ahonen, P. (1985). "Autoimmune polyendocrinopathy--candidosis--ectodermal dystrophy (APECED): autosomal recessive inheritance." Clin Genet **27**(6): 535-542.
- Ahonen, P., A. Miettinen, et al. (1987). "Adrenal and steroidal cell antibodies in patients with autoimmune polyglandular disease type I and risk of adrenocortical and ovarian failure." J Clin Endocrinol Metab **64**(3): 494-500.
- Akiyama, T., S. Maeda, et al. (2005). "Dependence of self-tolerance on TRAF6-directed development of thymic stroma." Science **308**(5719): 248-251.
- Alex, P., N. C. Zachos, et al. (2009). "Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis." Inflamm Bowel Dis **15**(3): 341-352.
- Aliahmad, P. and J. Kaye (2008). "Development of all CD4 T lineages requires nuclear factor TOX." J Exp Med **205**(1): 245-256.
- Allen, C. D., T. Okada, et al. (2007). "Germinal-center organization and cellular dynamics." Immunity **27**(2): 190-202.
- Almeida, A. R., B. Zaragoza, et al. (2006). "Indexation as a novel mechanism of lymphocyte homeostasis: the number of CD4+CD25+ regulatory T cells is indexed to the number of IL-2-producing cells." J Immunol **177**(1): 192-200.
- Aluvihare, V. R., M. Kallikourdis, et al. (2004). "Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus." Nat Immunol **5**(3): 266-271.
- Anderson, M. S., E. S. Venanzi, et al. (2005). "The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance." Immunity **23**(2): 227-239.
- Anderson, M. S., E. S. Venanzi, et al. (2002). "Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein." Science **298**(5597): 1395-1401.
- Andoh, A., Z. Zhang, et al. (2005). "Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts." Gastroenterology **129**(3): 969-984.
- Annacker, O., J. L. Coombes, et al. (2005). "Essential role for CD103 in the T cell-mediated regulation of experimental colitis." J Exp Med **202**(8): 1051-1061.
- Annunziato, F., L. Cosmi, et al. (2007). "Phenotypic and functional features of human Th17 cells." J Exp Med **204**(8): 1849-1861.
- Ansel, K. M., I. Djuretic, et al. (2006). "Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility." Annu Rev Immunol **24**: 607-656.
- Apostolou, I., A. Sarukhan, et al. (2002). "Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen." Nat Immunol **3**(8): 756-763.

- Aranda, R., B. C. Sydora, et al. (1997). "Analysis of intestinal lymphocytes in mouse colitis mediated by transfer of CD4+, CD45RBhigh T cells to SCID recipients." J Immunol **158**(7): 3464-3473.
- Ardavin, C., L. Wu, et al. (1993). "Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population." Nature **362**(6422): 761-763.
- Asano, A., K. Tsubomatsu, et al. (2007). "A deletion mutation of the protein tyrosine phosphatase kappa (Ptpkr) gene is responsible for T-helper immunodeficiency (thid) in the LEC rat." Mamm Genome **18**(11): 779-786.
- Asano, M., M. Toda, et al. (1996). "Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation." J Exp Med **184**(2): 387-396.
- Asseman, C., S. Mauze, et al. (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.
- Atarashi, K., J. Nishimura, et al. (2008). "ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation." Nature **455**(7214): 808-812.
- Azuma, T., T. Takahashi, et al. (2003). "Human CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress NKT cell functions." Cancer Res **63**(15): 4516-4520.
- Azzam, H. S., J. B. DeJarnette, et al. (2001). "Fine tuning of TCR signaling by CD5." J Immunol **166**(9): 5464-5472.
- Backhed, F., R. E. Ley, et al. (2005). "Host-bacterial mutualism in the human intestine." Science **307**(5717): 1915-1920.
- Baecher-Allan, C., J. A. Brown, et al. (2001). "CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood." J Immunol **167**(3): 1245-1253.
- Baldwin, T. A., M. M. Sandau, et al. (2005). "The timing of TCR alpha expression critically influences T cell development and selection." J Exp Med **202**(1): 111-121.
- Ball, H. J., H. J. Yuasa, et al. (2009). "Indoleamine 2,3-dioxygenase-2; a new enzyme in the kynurenine pathway." Int J Biochem Cell Biol **41**(3): 467-471.
- Bamias, G., C. Martin, et al. (2005). "Proinflammatory effects of TH2 cytokines in a murine model of chronic small intestinal inflammation." Gastroenterology **128**(3): 654-666.
- Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." Nature **392**(6673): 245-252.
- Baranzini, S. E. (2009). "The genetics of autoimmune diseases: a networked perspective." Curr Opin Immunol **21**(6): 596-605.
- Barnes, M. J., P. Krebs, et al. (2009). "Commitment to the regulatory T cell lineage requires CARMA1 in the thymus but not in the periphery." PLoS Biol **7**(3): e51.
- Barnes, M. J. and F. Powrie (2009). "Regulatory T cells reinforce intestinal homeostasis." Immunity **31**(3): 401-411.
- Barrett, J. C., S. Hansoul, et al. (2008). "Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease." Nat Genet **40**(8): 955-962.
- Barthlott, T., H. Kohler, et al. (1997). "Asynchronous coreceptor downregulation after positive thymic selection: prolonged maintenance of the double positive state in CD8 lineage differentiation due to sustained biosynthesis of the CD4 coreceptor." J Exp Med **185**(2): 357-362.
- Baumgart, D. C. and W. J. Sandborn (2007). "Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies." Lancet **369**(9573): 1641-1657.

- Bauquet, A. T., H. Jin, et al. (2009). "The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and TH-17 cells." *Nat Immunol* **10**(2): 167-175.
- Bautista, J. L., C. W. Lio, et al. (2009). "Intraclonal competition limits the fate determination of regulatory T cells in the thymus." *Nat Immunol* **10**(6): 610-617.
- Bayer, A. L., J. Y. Lee, et al. (2008). "A function for IL-7R for CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells." *J Immunol* **181**(1): 225-234.
- Beach, D., R. Gonen, et al. (2007). "Dual role of SLP-76 in mediating T cell receptor-induced activation of phospholipase C-gamma1." *J Biol Chem* **282**(5): 2937-2946.
- Beckwith, J., Y. Cong, et al. (2005). "Cdcs1, a major colitogenic locus in mice, regulates innate and adaptive immune response to enteric bacterial antigens." *Gastroenterology* **129**(5): 1473-1484.
- Belkaid, Y. (2007). "Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity." *Nat Rev Immunol* **7**(11): 875-888.
- Belkaid, Y., C. A. Piccirillo, et al. (2002). "CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity." *Nature* **420**(6915): 502-507.
- Beltran, C. J., E. Candia, et al. (2009). "Peripheral cytokine profile in Chilean patients with Crohn's disease and ulcerative colitis." *Eur Cytokine Netw* **20**(1): 33-38.
- Bendelac, A., M. N. Rivera, et al. (1997). "Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function." *Annu Rev Immunol* **15**: 535-562.
- Bennett, C. L., J. Christie, et al. (2001). "The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3." *Nat Genet* **27**(1): 20-21.
- Bensinger, S. J., A. Bandeira, et al. (2001). "Major histocompatibility complex class II-positive cortical epithelium mediates the selection of CD4(+)25(+) immunoregulatory T cells." *J Exp Med* **194**(4): 427-438.
- Benson, M. J., K. Pino-Lagos, et al. (2007). "All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation." *J Exp Med* **204**(8): 1765-1774.
- Berg, D. J., N. Davidson, et al. (1996). "Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses." *J Clin Invest* **98**(4): 1010-1020.
- Bettelli, E., Y. Carrier, et al. (2006). "Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells." *Nature* **441**(7090): 235-238.
- Betz, B. C., K. L. Jordan-Williams, et al. (2010). "Batf coordinates multiple aspects of B and T cell function required for normal antibody responses." *J Exp Med* **207**(5): 933-942.
- Bevan, M. J. (1977). "In a radiation chimaera, host H-2 antigens determine immune responsiveness of donor cytotoxic cells." *Nature* **269**(5627): 417-418.
- Bhandoola, A., H. von Boehmer, et al. (2007). "Commitment and developmental potential of extrathymic and intrathymic T cell precursors: plenty to choose from." *Immunity* **26**(6): 678-689.
- Bienvenu, B., B. Martin, et al. (2005). "Peripheral CD8+CD25+ T lymphocytes from MHC class II-deficient mice exhibit regulatory activity." *J Immunol* **175**(1): 246-253.
- Binder, V. (1998). "Genetic epidemiology in inflammatory bowel disease." *Dig Dis* **16**(6): 351-355.

- Boehm, T., S. Scheu, et al. (2003). "Thymic medullary epithelial cell differentiation, thymocyte emigration, and the control of autoimmunity require lympho-epithelial cross talk via LTbetaR." J Exp Med **198**(5): 757-769.
- Boirivant, M., I. J. Fuss, et al. (1998). "Oxazolone colitis: A murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4." J Exp Med **188**(10): 1929-1939.
- Boivin, G. P., I. Ormsby, et al. (1997). "Germ-free and barrier-raised TGF beta 1-deficient mice have similar inflammatory lesions." Transgenic Res **6**(3): 197-202.
- Bollyky, P. L., B. A. Falk, et al. (2009). "Intact extracellular matrix and the maintenance of immune tolerance: high molecular weight hyaluronan promotes persistence of induced CD4+CD25+ regulatory T cells." J Leukoc Biol **86**(3): 567-572.
- Bonasio, R., M. L. Scimone, et al. (2006). "Clonal deletion of thymocytes by circulating dendritic cells homing to the thymus." Nat Immunol **7**(10): 1092-1100.
- Borgulya, P., H. Kishi, et al. (1992). "Exclusion and inclusion of alpha and beta T cell receptor alleles." Cell **69**(3): 529-537.
- Bosselut, R., L. Feigenbaum, et al. (2001). "Strength of signaling by CD4 and CD8 coreceptor tails determines the number but not the lineage direction of positively selected thymocytes." Immunity **14**(4): 483-494.
- Bosselut, R., T. I. Guinter, et al. (2003). "Unraveling a revealing paradox: Why major histocompatibility complex I-signaled thymocytes "paradoxically" appear as CD4+8lo transitional cells during positive selection of CD8+ T cells." J Exp Med **197**(12): 1709-1719.
- Bouchon, A., J. Dietrich, et al. (2000). "Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes." J Immunol **164**(10): 4991-4995.
- Bouma, G. and W. Strober (2003). "The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease." Nat Rev Immunol **3**(7): 521-533.
- Brandt, V. L. and D. B. Roth (2002). "A recombinase diversified: new functions of the RAG proteins." Curr Opin Immunol **14**(2): 224-229.
- Breitfeld, D., L. Ohl, et al. (2000). "Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production." J Exp Med **192**(11): 1545-1552.
- Brimnes, J., J. Reimann, et al. (2001). "Enteric bacterial antigens activate CD4(+) T cells from scid mice with inflammatory bowel disease." Eur J Immunol **31**(1): 23-31.
- Brockner, T., M. Riedinger, et al. (1997). "Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo." J Exp Med **185**(3): 541-550.
- Brockmeyer, C., W. Paster, et al. (2010). "T cell receptor (TCR)-induced tyrosine phosphorylation dynamics identifies themis as a new TCR signalosome component." J Biol Chem.
- Brockmeyer, C., W. Paster, et al. (2011). "T cell receptor (TCR)-induced tyrosine phosphorylation dynamics identifies THEMIS as a new TCR signalosome component." J Biol Chem **286**(9): 7535-7547.
- Broman, K. W., H. Wu, et al. (2003). "R/qrtl: QTL mapping in experimental crosses." Bioinformatics **19**(7): 889-890.

- Bruewer, M., A. Luegering, et al. (2003). "Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms." J Immunol **171**(11): 6164-6172.
- Brugnera, E., A. Bhandoola, et al. (2000). "Coreceptor reversal in the thymus: signaled CD4+8+ thymocytes initially terminate CD8 transcription even when differentiating into CD8+ T cells." Immunity **13**(1): 59-71.
- Brunkow, M. E., E. W. Jeffery, et al. (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.
- Brunner, T., R. J. Mogil, et al. (1995). "Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas." Nature **373**(6513): 441-444.
- Buckner, J. H. (2010). "Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases." Nat Rev Immunol **10**(12): 849-859.
- Budarf, M. L., C. Labbe, et al. (2009). "GWA studies: rewriting the story of IBD." Trends Genet **25**(3): 137-146.
- Buhlmann, J. E., S. K. Elkin, et al. (2003). "A role for the B7-1/B7-2:CD28/CTLA-4 pathway during negative selection." J Immunol **170**(11): 5421-5428.
- Burchill, M. A., J. Yang, et al. (2008). "Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire." Immunity **28**(1): 112-121.
- Burchill, M. A., J. Yang, et al. (2007). "IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells." J Immunol **178**(1): 280-290.
- Burkly, L., C. Hession, et al. (1995). "Expression of relB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells." Nature **373**(6514): 531-536.
- Burstein, H. J. and A. K. Abbas (1993). "In vivo role of interleukin 4 in T cell tolerance induced by aqueous protein antigen." J Exp Med **177**(2): 457-463.
- Burton, P. R., D. G. Clayton, et al. (2007). "Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants." Nat Genet **39**(11): 1329-1337.
- Busse, D., M. de la Rosa, et al. (2010). "Competing feedback loops shape IL-2 signaling between helper and regulatory T lymphocytes in cellular microenvironments." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(7): 3058-3063.
- Cadwell, K., J. Y. Liu, et al. (2008). "A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells." Nature **456**(7219): 259-263.
- Cai, G., T. Radzanowski, et al. (2000). "Identification of STAT4-dependent and independent mechanisms of resistance to *Toxoplasma gondii*." J Immunol **165**(5): 2619-2627.
- Campbell, D. J. and M. A. Koch (2011). "Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells." Nat Rev Immunol **11**(2): 119-130.
- Capone, M., P. Romagnoli, et al. (2001). "Dissociation of thymic positive and negative selection in transgenic mice expressing major histocompatibility complex class I molecules exclusively on thymic cortical epithelial cells." Blood **97**(5): 1336-1342.

- Cargill, M., S. J. Schrodli, et al. (2007). "A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes." *Am J Hum Genet* **80**(2): 273-290.
- Cario, E. (2005). "Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2." *Gut* **54**(8): 1182-1193.
- Carter, J. D., G. M. Calabrese, et al. (2005). "Deficiency of the Src homology region 2 domain-containing phosphatase 1 (SHP-1) causes enrichment of CD4+CD25+ regulatory T cells." *J Immunol* **174**(11): 6627-6638.
- Casella, G., R. D'Inca, et al. (2010). "Prevalence of celiac disease in inflammatory bowel diseases: An IG-IBD multicentre study." *Dig Liver Dis* **42**(3): 175-178.
- Cavaillès, P., V. Sèrgent, et al. (2006). "The rat Toxo1 locus directs toxoplasmosis outcome and controls parasite proliferation and spreading by macrophage-dependent mechanisms." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(3): 744-749.
- Celli, S., F. Lemaitre, et al. (2007). "Real-time manipulation of T cell-dendritic cell interactions in vivo reveals the importance of prolonged contacts for CD4+ T cell activation." *Immunity* **27**(4): 625-634.
- Chan, S. H., D. Cosgrove, et al. (1993). "Another view of the selective model of thymocyte selection." *Cell* **73**(2): 225-236.
- Chaudhry, A., D. Rudra, et al. (2009). "CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner." *Science* **326**(5955): 986-991.
- Chen, W., M. E. Frank, et al. (2001). "TGF-beta released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu." *Immunity* **14**(6): 715-725.
- Chen, Y., V. K. Kuchroo, et al. (1994). "Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis." *Science* **265**(5176): 1237-1240.
- Cheroutre, H. and F. Lambolez (2008). "The thymus chapter in the life of gut-specific intra epithelial lymphocytes." *Curr Opin Immunol* **20**(2): 185-191.
- Cheroutre, H., F. Lambolez, et al. (2011). "The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes." *Nat Rev Immunol* **11**(7): 445-456.
- Chi, A. W., J. J. Bell, et al. (2009). "Untangling the T branch of the hematopoiesis tree." *Curr Opin Immunol* **21**(2): 121-126.
- Chin, R. K., J. C. Lo, et al. (2003). "Lymphotoxin pathway directs thymic Aire expression." *Nat Immunol* **4**(11): 1121-1127.
- Cho, J. H. (2008). "The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease." *Nat Rev Immunol* **8**(6): 458-466.
- Cho, J. H. and S. R. Brant (2011). "Recent insights into the genetics of inflammatory bowel disease." *Gastroenterology* **140**(6): 1704-1712.
- Cho, J. H. and C. T. Weaver (2007). "The genetics of inflammatory bowel disease." *Gastroenterology* **133**(4): 1327-1339.
- Choi, Y. S., R. Kageyama, et al. (2011). "ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6." *Immunity* **34**(6): 932-946.
- Christ, A. D., A. C. Stevens, et al. (1998). "An interleukin 12-related cytokine is up-regulated in ulcerative colitis but not in Crohn's disease." *Gastroenterology* **115**(2): 307-313.
- Chtanova, T., S. G. Tangye, et al. (2004). "T follicular helper cells express a distinctive transcriptional profile, reflecting their role as non-Th1/Th2 effector cells that provide help for B cells." *J Immunol* **173**(1): 68-78.
- Chuck, M. I., M. Zhu, et al. (2010). "The role of the LAT-PLC-gamma1 interaction in T regulatory cell function." *J Immunol* **184**(5): 2476-2486.

- Chung, Y., S. H. Chang, et al. (2009). "Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling." Immunity **30**(4): 576-587.
- Ciofani, M., G. C. Knowles, et al. (2006). "Stage-specific and differential notch dependency at the alphabeta and gammadelta T lineage bifurcation." Immunity **25**(1): 105-116.
- Cohen, J. N., C. J. Guidi, et al. (2010). "Lymph node-resident lymphatic endothelial cells mediate peripheral tolerance via Aire-independent direct antigen presentation." J Exp Med **207**(4): 681-688.
- Colacios, C., A. Casemayou, et al. (2011). "The p.Arg63Trp polymorphism controls Vav1 functions and Foxp3 regulatory T cell development." J Exp Med.
- Collazo, C. M., G. S. Yap, et al. (2001). "Inactivation of LRG-47 and IRG-47 reveals a family of interferon gamma-inducible genes with essential, pathogen-specific roles in resistance to infection." J Exp Med **194**(2): 181-188.
- Collison, L. W., C. J. Workman, et al. (2007). "The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function." Nature **450**(7169): 566-569.
- Colombel, J. F., A. Cortot, et al. (2001). "Antibiotics in Crohn's disease." Gut **48**(5): 647.
- Cong, Y., S. L. Brandwein, et al. (1998). "CD4+ T cells reactive to enteric bacterial antigens in spontaneously colitic C3H/HeJBir mice: increased T helper cell type 1 response and ability to transfer disease." J Exp Med **187**(6): 855-864.
- Cong, Y., T. Feng, et al. (2009). "A dominant, coordinated T regulatory cell-IgA response to the intestinal microbiota." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(46): 19256-19261.
- Cong, Y., C. T. Weaver, et al. (2002). "Bacterial-reactive T regulatory cells inhibit pathogenic immune responses to the enteric flora." J Immunol **169**(11): 6112-6119.
- Constant, S., C. Pfeiffer, et al. (1995). "Extent of T cell receptor ligation can determine the functional differentiation of naive CD4+ T cells." J. Exp. Med. **182**: 1591-1596.
- Coombes, J. L. and F. Powrie (2008). "Dendritic cells in intestinal immune regulation." Nat Rev Immunol **8**(6): 435-446.
- Coombes, J. L., N. J. Robinson, et al. (2005). "Regulatory T cells and intestinal homeostasis." Immunol Rev **204**: 184-194.
- Coombes, J. L., K. R. Siddiqui, et al. (2007). "A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism." J Exp Med **204**(8): 1757-1764.
- Cosgrove, D., S. H. Chan, et al. (1992). "The thymic compartment responsible for positive selection of CD4+ T cells." Int Immunol **4**(6): 707-710.
- Cosnes, J., I. Nion-Larmurier, et al. (2005). "Impact of the increasing use of immunosuppressants in Crohn's disease on the need for intestinal surgery." Gut **54**(2): 237-241.
- Cranmer, L. D. and E. Hersh (2007). "The role of the CTLA4 blockade in the treatment of malignant melanoma." Cancer Invest **25**(7): 613-631.
- Crawford, S. E., V. Stellmach, et al. (1998). "Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo." Cell **93**(7): 1159-1170.
- Curotto de Lafaille, M. A. and J. J. Lafaille (2009). "Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor?" Immunity **30**(5): 626-635.
- Dahan, S., G. Roda, et al. (2008). "Epithelial: lamina propria lymphocyte interactions promote epithelial cell differentiation." Gastroenterology **134**(1): 192-203.

- Dalton, J. E., S. M. Cruickshank, et al. (2006). "Intraepithelial gammadelta+ lymphocytes maintain the integrity of intestinal epithelial tight junctions in response to infection." Gastroenterology **131**(3): 818-829.
- Damoiseaux, J. G., B. Cautain, et al. (1999). "A dominant role for the thymus and MHC genes in determining the peripheral CD4/CD8 T cell ratio in the rat." J Immunol **163**(6): 2983-2989.
- Danese, S., M. Sans, et al. (2004). "Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors." Autoimmun Rev **3**(5): 394-400.
- Dardalhon, V., A. Awasthi, et al. (2008). "IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells." Nat Immunol **9**(12): 1347-1355.
- Das, K. M., A. Dasgupta, et al. (1993). "Autoimmunity to cytoskeletal protein tropomyosin. A clue to the pathogenetic mechanism for ulcerative colitis." J Immunol **150**(6): 2487-2493.
- Davidson, N. J., S. A. Hudak, et al. (1998). "IL-12, but not IFN-gamma, plays a major role in sustaining the chronic phase of colitis in IL-10-deficient mice." J Immunol **161**(6): 3143-3149.
- Davidson, N. J., M. W. Leach, et al. (1996). "T helper cell 1-type CD4+ T cells, but not B cells, mediate colitis in interleukin 10-deficient mice." J Exp Med **184**(1): 241-251.
- Davis, C. B., N. Killeen, et al. (1993). "Evidence for a stochastic mechanism in the differentiation of mature subsets of T lymphocytes." Cell **73**(2): 237-247.
- Davisson, M. T. (2005). "Discovery genetics: serendipity in basic research." ILAR J **46**(4): 338-345.
- Deaglio, S., K. M. Dwyer, et al. (2007). "Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression." J Exp Med **204**(6): 1257-1265.
- Denning, T. L., G. Kim, et al. (2005). "Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells impaired for intestinal homing can prevent colitis." J Immunol **174**(12): 7487-7491.
- Denning, T. L., Y. C. Wang, et al. (2007). "Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses." Nat Immunol **8**(10): 1086-1094.
- Dhein, J., H. Walczak, et al. (1995). "Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95)." Nature **373**(6513): 438-441.
- Dianda, L., A. M. Hanby, et al. (1997). "T cell receptor-alpha beta-deficient mice fail to develop colitis in the absence of a microbial environment." Am J Pathol **150**(1): 91-97.
- Diebold, R. J., M. J. Eis, et al. (1995). "Early-onset multifocal inflammation in the transforming growth factor beta 1-null mouse is lymphocyte mediated." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(26): 12215-12219.
- Dieckmann, D., H. Plottner, et al. (2001). "Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)/CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood." J Exp Med **193**(11): 1303-1310.
- Dieleman, L. A., B. U. Ridwan, et al. (1994). "Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice." Gastroenterology **107**(6): 1643-1652.
- DiPaolo, R. J., D. D. Glass, et al. (2005). "CD4+CD25+ T cells prevent the development of organ-specific autoimmune disease by inhibiting the differentiation of autoreactive effector T cells." J Immunol **175**(11): 7135-7142.

- Dohi, T., K. Fujihashi, et al. (2000). "Mice deficient in Th1- and Th2-type cytokines develop distinct forms of hapten-induced colitis." Gastroenterology **119**(3): 724-733.
- Dohi, T., K. Fujihashi, et al. (1999). "Hapten-induced colitis is associated with colonic patch hypertrophy and T helper cell 2-type responses." J Exp Med **189**(8): 1169-1180.
- Dong, C. (2006). "Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells." Nat Rev Immunol **6**(4): 329-333.
- Dong, C., A. E. Juedes, et al. (2001). "ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function." Nature **409**(6816): 97-101.
- Doyle, C. and J. L. Strominger (1987). "Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion." Nature **330**(6145): 256-259.
- Dubois, P. C., G. Trynka, et al. (2010). "Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression." Nat Genet **42**(4): 295-302.
- Dubuquoy, L., C. Rousseaux, et al. (2006). "PPARgamma as a new therapeutic target in inflammatory bowel diseases." Gut **55**(9): 1341-1349.
- Duchmann, R., I. Kaiser, et al. (1995). "Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD)." Clin Exp Immunol **102**(3): 448-455.
- Duerr, R. H., K. D. Taylor, et al. (2006). "A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene." Science **314**(5804): 1461-1463.
- Durant, L., W. T. Watford, et al. (2010). "Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis." Immunity **32**(5): 605-615.
- Eckburg, P. B. and D. A. Relman (2007). "The role of microbes in Crohn's disease." Clin Infect Dis **44**(2): 256-262.
- Economou, M., T. A. Trikalinos, et al. (2004). "Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis." Am J Gastroenterol **99**(12): 2393-2404.
- Ehrenstein, M. R., J. G. Evans, et al. (2004). "Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy." J Exp Med **200**(3): 277-285.
- Ellmeier, W., S. Sawada, et al. (1999). "The regulation of CD4 and CD8 coreceptor gene expression during T cell development." Annu Rev Immunol **17**: 523-554.
- Else, K. J., F. D. Finkelman, et al. (1994). "Cytokine-mediated regulation of chronic intestinal helminth infection." J Exp Med **179**(1): 347-351.
- Elson, C. O., Y. Cong, et al. (2005). "Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota." Immunol Rev **206**: 260-276.
- Elson, C. O., Y. Cong, et al. (2007). "Monoclonal anti-interleukin 23 reverses active colitis in a T cell-mediated model in mice." Gastroenterology **132**(7): 2359-2370.
- Elyaman, W., E. M. Bradshaw, et al. (2009). "IL-9 induces differentiation of TH17 cells and enhances function of FoxP3+ natural regulatory T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(31): 12885-12890.
- Erman, B., A. S. Alag, et al. (2006). "Coreceptor signal strength regulates positive selection but does not determine CD4/CD8 lineage choice in a physiologic in vivo model." J Immunol **177**(10): 6613-6625.

- Eto, D., C. Lao, et al. (2011). "IL-21 and IL-6 are critical for different aspects of B cell immunity and redundantly induce optimal follicular helper CD4 T cell (Tfh) differentiation." PLoS One **6**(3): e17739.
- Fagarasan, S. and T. Honjo (2003). "Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences." Nat Rev Immunol **3**(1): 63-72.
- Fahlen, L., S. Read, et al. (2005). "T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells." J Exp Med **201**(5): 737-746.
- Fantini, M. C., A. Rizzo, et al. (2009). "Smad7 controls resistance of colitogenic T cells to regulatory T cell-mediated suppression." Gastroenterology **136**(4): 1308-1316, e1301-1303.
- Fayard, E., G. Moncayo, et al. (2010). "Phosphatidylinositol 3-kinase signaling in thymocytes: the need for stringent control." Sci Signal **3**(135): re5.
- Fazilleau, N., L. J. McHeyzer-Williams, et al. (2009). "The function of follicular helper T cells is regulated by the strength of T cell antigen receptor binding." Nat Immunol **10**(4): 375-384.
- Fernando, M. M., C. R. Stevens, et al. (2008). "Defining the role of the MHC in autoimmunity: a review and pooled analysis." PLoS Genet **4**(4): e1000024.
- Festen, E. A., P. Goyette, et al. (2011). "A meta-analysis of genome-wide association scans identifies IL18RAP, PTPN2, TAGAP, and PUS10 as shared risk loci for Crohn's disease and celiac disease." PLoS Genet **7**(1): e1001283.
- Festen, E. A., A. M. Szperl, et al. (2009). "Inflammatory bowel disease and celiac disease: overlaps in the pathology and genetics, and their potential drug targets." Endocr Metab Immune Disord Drug Targets **9**(2): 199-218.
- Fina, D., M. Sarra, et al. (2008). "Regulation of gut inflammation and th17 cell response by interleukin-21." Gastroenterology **134**(4): 1038-1048.
- Finck, B. K., P. S. Linsley, et al. (1994). "Treatment of murine lupus with CTLA4Ig." Science **265**(5176): 1225-1227.
- Fink, P. J. and M. J. Bevan (1978). "H-2 antigens of the thymus determine lymphocyte specificity." J Exp Med **148**(3): 766-775.
- Finkelman, F. D., S. C. Morris, et al. (2000). "Stat6 regulation of in vivo IL-4 responses." J Immunol **164**(5): 2303-2310.
- Fisher, G. H., F. J. Rosenberg, et al. (1995). "Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome." Cell **81**(6): 935-946.
- Fontenot, J. D., J. L. Dooley, et al. (2005). "Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny." J Exp Med **202**(7): 901-906.
- Fontenot, J. D., M. A. Gavin, et al. (2003). "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells." Nat Immunol **4**(4): 330-336.
- Fontenot, J. D., J. P. Rasmussen, et al. (2005). "A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells." Nat Immunol **6**(11): 1142-1151.
- Forouhar, F., J. L. Anderson, et al. (2007). "Molecular insights into substrate recognition and catalysis by tryptophan 2,3-dioxygenase." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(2): 473-478.
- Fowler, S. and F. Powrie (2002). "CTLA-4 expression on antigen-specific cells but not IL-10 secretion is required for oral tolerance." Eur J Immunol **32**(10): 2997-3006.
- Foy, T. M., D. M. Page, et al. (1995). "An essential role for gp39, the ligand for CD40, in thymic selection." J Exp Med **182**(5): 1377-1388.

- Frank, D. N., A. L. St Amand, et al. (2007). "Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(34): 13780-13785.
- Franke, A., T. Balschun, et al. (2008). "Replication of signals from recent studies of Crohn's disease identifies previously unknown disease loci for ulcerative colitis." Nat Genet **40**(6): 713-715.
- Franke, A., T. Balschun, et al. (2008). "Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility." Nat Genet **40**(11): 1319-1323.
- Franke, A., D. P. McGovern, et al. (2010). "Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci." Nat Genet **42**(12): 1118-1125.
- Freeman, G. J., A. J. Long, et al. (2000). "Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation." J Exp Med **192**(7): 1027-1034.
- Fu, G., Y. Chen, et al. (2010). "Phospholipase C $\gamma$ 1 is essential for T cell development, activation, and tolerance." J Exp Med **207**(2): 309-318.
- Fu, G., S. Vallee, et al. (2009). "Themis controls thymocyte selection through regulation of T cell antigen receptor-mediated signaling." Nat Immunol **10**(8): 848-856.
- Fujino, S., A. Andoh, et al. (2003). "Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease." Gut **52**(1): 65-70.
- Fuss, I. J., F. Heller, et al. (2004). "Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis." J Clin Invest **113**(10): 1490-1497.
- Fuss, I. J., T. Marth, et al. (1999). "Anti-interleukin 12 treatment regulates apoptosis of Th1 T cells in experimental colitis in mice." Gastroenterology **117**(5): 1078-1088.
- Fuss, I. J., M. Neurath, et al. (1996). "Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5." J Immunol **157**(3): 1261-1270.
- Gaboriau-Routhiau, V., S. Rakotobe, et al. (2009). "The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses." Immunity **31**(4): 677-689.
- Gallegos, A. M. and M. J. Bevan (2004). "Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation." J Exp Med **200**(8): 1039-1049.
- Ganz, T. (2003). "Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity." Nat Rev Immunol **3**(9): 710-720.
- Gao, J. X., H. Zhang, et al. (2002). "Perinatal blockade of b7-1 and b7-2 inhibits clonal deletion of highly pathogenic autoreactive T cells." J Exp Med **195**(8): 959-971.
- Gardner, J. M., J. J. Devoss, et al. (2008). "Deletional tolerance mediated by extrathymic Aire-expressing cells." Science **321**(5890): 843-847.
- Garin, M. I., C. C. Chu, et al. (2007). "Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells." Blood **109**(5): 2058-2065.

- Gavin, M. A., T. R. Torgerson, et al. (2006). "Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(17): 6659-6664.
- Genton, C., Y. Wang, et al. (2006). "The Th2 lymphoproliferation developing in LatY136F mutant mice triggers polyclonal B cell activation and systemic autoimmunity." J Immunol **177**(4): 2285-2293.
- Gershon, R. K. and K. Kondo (1970). "Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes." Immunology **18**(5): 723-737.
- Gershon, R. K. and K. Kondo (1971). "Infectious immunological tolerance." Immunology **21**(6): 903-914.
- Getnet, D., J. F. Grosso, et al. (2010). "A role for the transcription factor Helios in human CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells." Mol Immunol **47**(7-8): 1595-1600.
- Ghiringhelli, F., C. Menard, et al. (2005). "CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner." J Exp Med **202**(8): 1075-1085.
- Gleeson, P. A., B. H. Toh, et al. (1996). "Organ-specific autoimmunity induced by lymphopenia." Immunol Rev **149**: 97-125.
- Glocker, E. O., D. Kotlarz, et al. (2009). "Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor." N Engl J Med **361**(21): 2033-2045.
- Godfrey, D. I. and A. Zlotnik (1993). "Control points in early T-cell development." Immunol Today **14**(11): 547-553.
- Goldrath, A. W. and M. J. Bevan (1999). "Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire." Nature **402**(6759): 255-262.
- Gomez-Rodriguez, J., N. Sahu, et al. (2009). "Differential expression of interleukin-17A and -17F is coupled to T cell receptor signaling via inducible T cell kinase." Immunity **31**(4): 587-597.
- Gommeaux, J., C. Gregoire, et al. (2009). "Thymus-specific serine protease regulates positive selection of a subset of CD4+ thymocytes." Eur J Immunol **39**(4): 956-964.
- Gondek, D. C., L. F. Lu, et al. (2005). "Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism." J Immunol **174**(4): 1783-1786.
- Goodnow, C. C., J. Sprent, et al. (2005). "Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity." Nature **435**(7042): 590-597.
- Gorelik, L., S. Constant, et al. (2002). "Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation." J Exp Med **195**(11): 1499-1505.
- Gorelik, L. and R. A. Flavell (2000). "Abrogation of TGFbeta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease." Immunity **12**(2): 171-181.
- Gorman, S., L. A. Kuritzky, et al. (2007). "Topically applied 1,25-dihydroxyvitamin D3 enhances the suppressive activity of CD4+CD25+ cells in the draining lymph nodes." J Immunol **179**(9): 6273-6283.
- Green, D. R. and D. R. Webb (1993). "Saying the 'S' word in public." Immunol Today **14**(11): 523-525.
- Griseri, T., M. Asquith, et al. (2010). "OX40 is required for regulatory T cell-mediated control of colitis." J Exp Med **207**(4): 699-709.
- Grohmann, U., F. Fallarino, et al. (2003). "Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO." Trends Immunol **24**(5): 242-248.

- Grossman, W. J., J. W. Verbsky, et al. (2004). "Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death." *Immunity* **21**(4): 589-601.
- Guo, L., G. Wei, et al. (2009). "IL-1 family members and STAT activators induce cytokine production by Th2, Th17, and Th1 cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(32): 13463-13468.
- Hall, J. A., N. Bouladoux, et al. (2008). "Commensal DNA limits regulatory T cell conversion and is a natural adjuvant of intestinal immune responses." *Immunity* **29**(4): 637-649.
- Hampe, J., A. Franke, et al. (2007). "A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1." *Nat Genet* **39**(2): 207-211.
- Harrington, L. E., R. D. Hatton, et al. (2005). "Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages." *Nat Immunol* **6**(11): 1123-1132.
- Harris, T. J., J. F. Grosso, et al. (2007). "Cutting edge: An in vivo requirement for STAT3 signaling in TH17 development and TH17-dependent autoimmunity." *J Immunol* **179**(7): 4313-4317.
- He, X., V. P. Dave, et al. (2005). "The zinc finger transcription factor Th-POK regulates CD4 versus CD8 T-cell lineage commitment." *Nature* **433**(7028): 826-833.
- He, X., K. Park, et al. (2008). "CD4-CD8 lineage commitment is regulated by a silencer element at the ThPOK transcription-factor locus." *Immunity* **28**(3): 346-358.
- Hedrick, S. M. (2008). "Thymus lineage commitment: a single switch." *Immunity* **28**(3): 297-299.
- Heller, F., I. J. Fuss, et al. (2002). "Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells." *Immunity* **17**(5): 629-638.
- Hendriks, R. W., M. C. Nawijn, et al. (1999). "Expression of the transcription factor GATA-3 is required for the development of the earliest T cell progenitors and correlates with stages of cellular proliferation in the thymus." *Eur J Immunol* **29**(6): 1912-1918.
- Herman, A. E., G. J. Freeman, et al. (2004). "CD4+CD25+ T regulatory cells dependent on ICOS promote regulation of effector cells in the prediabetic lesion." *J Exp Med* **199**(11): 1479-1489.
- Hermann-Kleiter, N. and G. Baier (2010). "NFAT pulls the strings during CD4+ T helper cell effector functions." *Blood* **115**(15): 2989-2997.
- Hernandez-Hoyos, G., M. K. Anderson, et al. (2003). "GATA-3 expression is controlled by TCR signals and regulates CD4/CD8 differentiation." *Immunity* **19**(1): 83-94.
- Hill, J. A., M. Feuerer, et al. (2007). "Foxp3 transcription-factor-dependent and -independent regulation of the regulatory T cell transcriptional signature." *Immunity* **27**(5): 786-800.
- Hinterberger, M., M. Aichinger, et al. (2010). "Autonomous role of medullary thymic epithelial cells in central CD4(+) T cell tolerance." *Nat Immunol* **11**(6): 512-519.
- Hogquist, K. A., T. A. Baldwin, et al. (2005). "Central tolerance: learning self-control in the thymus." *Nat Rev Immunol* **5**(10): 772-782.

- Hollander, D., C. M. Vadheim, et al. (1986). "Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor." Ann Intern Med **105**(6): 883-885.
- Honey, K., T. Nakagawa, et al. (2002). "Cathepsin L regulates CD4+ T cell selection independently of its effect on invariant chain: a role in the generation of positively selecting peptide ligands." J Exp Med **195**(10): 1349-1358.
- Hooper, L. V. and J. I. Gordon (2001). "Commensal host-bacterial relationships in the gut." Science **292**(5519): 1115-1118.
- Hori, S., T. Nomura, et al. (2003). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor foxp3." Science **299**(5609): 1057-1061.
- Hosken, N. A., K. Shibuya, et al. (1995). "The effect of antigen dose on CD4+ T cell phenotype development in an  $\alpha\beta$ -TCR-transgenic mouse model." J. Exp. Med. **182**: 1579-1584.
- Hsieh, C. S., Y. Liang, et al. (2004). "Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+ CD4+ T cell receptors." Immunity **21**(2): 267-277.
- Hsieh, C. S., S. E. Macatonia, et al. (1993). "Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages." Science **260**(5107): 547-549.
- Hsieh, C. S., Y. Zheng, et al. (2006). "An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires." Nat Immunol **7**(4): 401-410.
- Hue, S., P. Ahern, et al. (2006). "Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation." J Exp Med **203**(11): 2473-2483.
- Huehn, J. and A. Hamann (2005). "Homing to suppress: address codes for Treg migration." Trends Immunol **26**(12): 632-636.
- Hugot, J. P., M. Chamaillard, et al. (2001). "Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease." Nature **411**(6837): 599-603.
- Hunter, D. J. (2005). "Gene-environment interactions in human diseases." Nat Rev Genet **6**(4): 287-298.
- Iijima, H., I. Takahashi, et al. (1999). "Alteration of interleukin 4 production results in the inhibition of T helper type 2 cell-dominated inflammatory bowel disease in T cell receptor alpha chain-deficient mice." J Exp Med **190**(5): 607-615.
- Inohara, N. and G. Nunez (2003). "NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis." Nat Rev Immunol **3**(5): 371-382.
- Ishimaru, N., A. Yamada, et al. (2008). "Development of inflammatory bowel disease in Long-Evans Cinnamon rats based on CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cell dysfunction." J Immunol **180**(10): 6997-7008.
- Itano, A. and E. Robey (2000). "Highly efficient selection of CD4 and CD8 lineage thymocytes supports an instructive model of lineage commitment." Immunity **12**(4): 383-389.
- Itano, A., P. Salmon, et al. (1996). "The cytoplasmic domain of CD4 promotes the development of CD4 lineage T cells." J Exp Med **183**(3): 731-741.
- Ivanov, Il, K. Atarashi, et al. (2009). "Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria." Cell **139**(3): 485-498.
- Ivanov, Il, L. Frutos Rde, et al. (2008). "Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine." Cell Host Microbe **4**(4): 337-349.
- Ivanov, Il, B. S. McKenzie, et al. (2006). "The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells." Cell **126**(6): 1121-1133.

- Iwata, R., N. Sasaki, et al. (2010). "Contiguous gene deletion of Ptpkr and Themis causes T-helper immunodeficiency (thid) in the LEC rat." Biomed Res **31**(1): 83-87.
- Izcue, A., J. L. Coombes, et al. (2009). "Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation." Annu Rev Immunol **27**: 313-338.
- Izcue, A., S. Hue, et al. (2008). "Interleukin-23 restrains regulatory T cell activity to drive T cell-dependent colitis." Immunity **28**(4): 559-570.
- Janas, M. L., G. Varano, et al. (2010). "Thymic development beyond beta-selection requires phosphatidylinositol 3-kinase activation by CXCR4." J Exp Med **207**(1): 247-261.
- Janeway, C. A., Jr. (1988). "T-cell development. Accessories or coreceptors?" Nature **335**(6187): 208-210.
- Jankovic, D., M. C. Kullberg, et al. (2000). "Single cell analysis reveals that IL-4 receptor/Stat6 signaling is not required for the in vivo or in vitro development of CD4+ lymphocytes with a Th2 cytokine profile." J Immunol **164**(6): 3047-3055.
- Jarnerot, G., E. Hertervig, et al. (2005). "Infliximab as rescue therapy in severe to moderately severe ulcerative colitis: a randomized, placebo-controlled study." Gastroenterology **128**(7): 1805-1811.
- Jeffery, L. E., F. Burke, et al. (2009). "1,25-Dihydroxyvitamin D3 and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3." J Immunol **183**(9): 5458-5467.
- Jenkinson, S. R., A. M. Intlekofer, et al. (2007). "Expression of the transcription factor cKrox in peripheral CD8 T cells reveals substantial postthymic plasticity in CD4-CD8 lineage differentiation." J Exp Med **204**(2): 267-272.
- Joffre, O., N. Gorse, et al. (2004). "Induction of antigen-specific tolerance to bone marrow allografts with CD4+CD25+ T lymphocytes." Blood **103**(11): 4216-4221.
- Joffre, O., T. Santolaria, et al. (2008). "Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes." Nat Med **14**(1): 88-92.
- Johnson, A. L., L. Aravind, et al. (2009). "Themis is a member of a new metazoan gene family and is required for the completion of thymocyte positive selection." Nat Immunol **10**(8): 831-839.
- Johnston, R. D. and R. F. Logan (2008). "What is the peak age for onset of IBD?" Inflamm Bowel Dis **14 Suppl 2**: S4-5.
- Johnston, R. J., A. C. Poholek, et al. (2009). "Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation." Science **325**(5943): 1006-1010.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, et al. (2001). "Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood." J Exp Med **193**(11): 1285-1294.
- Jordan, M. S., A. Boesteanu, et al. (2001). "Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide." Nat Immunol **2**(4): 301-306.
- Jun, J. E., L. E. Wilson, et al. (2003). "Identifying the MAGUK protein Carma-1 as a central regulator of humoral immune responses and atopy by genome-wide mouse mutagenesis." Immunity **18**(6): 751-762.

- Kakugawa, K., T. Yasuda, et al. (2009). "A novel gene essential for the development of single positive thymocytes." Mol Cell Biol **29**(18): 5128-5135.
- Kallikourdis, M., K. G. Andersen, et al. (2007). "Alloantigen-enhanced accumulation of CCR5+ 'effector' regulatory T cells in the gravid uterus." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(2): 594-599.
- Kamada, N., T. Hisamatsu, et al. (2005). "Abnormally differentiated subsets of intestinal macrophage play a key role in Th1-dominant chronic colitis through excess production of IL-12 and IL-23 in response to bacteria." J Immunol **175**(10): 6900-6908.
- Kamanaka, M., S. T. Kim, et al. (2006). "Expression of interleukin-10 in intestinal lymphocytes detected by an interleukin-10 reporter knockin tiger mouse." Immunity **25**(6): 941-952.
- Kaplan, M. H., U. Schindler, et al. (1996). "Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells." Immunity **4**(3): 313-319.
- Kaplan, M. H., Y. L. Sun, et al. (1996). "Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice." Nature **382**(6587): 174-177.
- Kappes, D. J. and X. He (2006). "Role of the transcription factor Th-POK in CD4:CD8 lineage commitment." Immunol Rev **209**: 237-252.
- Kaser, A., S. Zeissig, et al. (2010). "Inflammatory bowel disease." Annu Rev Immunol **28**: 573-621.
- Kawahata, K., Y. Misaki, et al. (2002). "Generation of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells from autoreactive T cells simultaneously with their negative selection in the thymus and from nonautoreactive T cells by endogenous TCR expression." J Immunol **168**(9): 4399-4405.
- Keefe, R., V. Dave, et al. (1999). "Regulation of lineage commitment distinct from positive selection." Science **286**(5442): 1149-1153.
- Keir, M. E., S. C. Liang, et al. (2006). "Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance." J Exp Med **203**(4): 883-895.
- Khattari, R., T. Cox, et al. (2003). "An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells." Nat Immunol **4**(4): 337-342.
- Khor, B. and B. P. Sleckman (2002). "Allelic exclusion at the TCRbeta locus." Curr Opin Immunol **14**(2): 230-234.
- Khoury, S. J. and M. H. Sayegh (2004). "The roles of the new negative T cell costimulatory pathways in regulating autoimmunity." Immunity **20**(5): 529-538.
- Kim, C. H., L. S. Rott, et al. (2001). "Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal center-localized subset of CXCR5+ T cells." J Exp Med **193**(12): 1373-1381.
- Kim, J. M., J. P. Rasmussen, et al. (2007). "Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice." Nat Immunol **8**(2): 191-197.
- Kim, J. R., H. W. Lim, et al. (2005). "Human CD57+ germinal center-T cells are the major helpers for GC-B cells and induce class switch recombination." BMC Immunol **6**: 3.
- King, C., A. Ilic, et al. (2004). "Homeostatic expansion of T cells during immune insufficiency generates autoimmunity." Cell **117**(2): 265-277.
- Kingsley, C. I., M. Karim, et al. (2002). "CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses." J Immunol **168**(3): 1080-1086.
- Kitoh, A., M. Ono, et al. (2009). "Indispensable role of the Runx1-Cbfbeta transcription complex for in vivo-suppressive function of FoxP3+ regulatory T cells." Immunity **31**(4): 609-620.

- Klaasen, H. L., P. J. Van der Heijden, et al. (1993). "Apathogenic, intestinal, segmented, filamentous bacteria stimulate the mucosal immune system of mice." Infect Immun **61**(1): 303-306.
- Klein, L., M. Hinterberger, et al. (2009). "Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction." Nat Rev Immunol **9**(12): 833-844.
- Klein, U. and R. Dalla-Favera (2008). "Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy." Nat Rev Immunol **8**(1): 22-33.
- Kobayashi, K. S., M. Chamaillard, et al. (2005). "Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract." Science **307**(5710): 731-734.
- Kobayashi, T., S. Okamoto, et al. (2008). "IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease." Gut **57**(12): 1682-1689.
- Koble, C. and B. Kyewski (2009). "The thymic medulla: a unique microenvironment for intercellular self-antigen transfer." J Exp Med **206**(7): 1505-1513.
- Koch, M. A., G. Tucker-Heard, et al. (2009). "The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation." Nat Immunol **10**(6): 595-602.
- Kohm, A. P., P. A. Carpentier, et al. (2002). "Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis." J Immunol **169**(9): 4712-4716.
- Kojima, K., M. W. Musch, et al. (2003). "Enteric flora and lymphocyte-derived cytokines determine expression of heat shock proteins in mouse colonic epithelial cells." Gastroenterology **124**(5): 1395-1407.
- Konkel, J. E. and W. Chen (2011). "Balancing acts: the role of TGF-beta in the mucosal immune system." Trends Mol Med.
- Konrad, A., Y. Cong, et al. (2006). "Tight mucosal compartmentation of the murine immune response to antigens of the enteric microbiota." Gastroenterology **130**(7): 2050-2059.
- Koonpaew, S., S. Shen, et al. (2006). "LAT-mediated signaling in CD4+CD25+ regulatory T cell development." J Exp Med **203**(1): 119-129.
- Korn, T., E. Bettelli, et al. (2007). "IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells." Nature **448**(7152): 484-487.
- Korn, T., E. Bettelli, et al. (2009). "IL-17 and Th17 Cells." Annu Rev Immunol **27**: 485-517.
- Kose, H., T. Sakai, et al. (2007). "Maturation arrest of thymocyte development is caused by a deletion in the receptor-like protein tyrosine phosphatase kappa gene in LEC rats." Genomics **89**(6): 673-677.
- Kosiewicz, M. M., C. C. Nast, et al. (2001). "Th1-type responses mediate spontaneous ileitis in a novel murine model of Crohn's disease." J Clin Invest **107**(6): 695-702.
- Kramer, S., A. Schimpl, et al. (1995). "Immunopathology of interleukin (IL) 2-deficient mice: thymus dependence and suppression by thymus-dependent cells with an intact IL-2 gene." J Exp Med **182**(6): 1769-1776.
- Krueger, A., S. Willenzon, et al. (2010). "CC chemokine receptor 7 and 9 double-deficient hematopoietic progenitors are severely impaired in seeding the adult thymus." Blood **115**(10): 1906-1912.
- Kuhn, R., J. Lohler, et al. (1993). "Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis." Cell **75**(2): 263-274.

- Kulkarni, A. B., J. M. Ward, et al. (1995). "Transforming growth factor-beta 1 null mice. An animal model for inflammatory disorders." Am J Pathol **146**(1): 264-275.
- Kullberg, M. C., J. M. Ward, et al. (1998). "Helicobacter hepaticus triggers colitis in specific-pathogen-free interleukin-10 (IL-10)-deficient mice through an IL-12- and gamma interferon-dependent mechanism." Infect Immun **66**(11): 5157-5166.
- Kurata, H., H. J. Lee, et al. (1999). "Ectopic expression of activated Stat6 induces the expression of Th2-specific cytokines and transcription factors in developing Th1 cells." Immunity **11**(6): 677-688.
- Kurts, C., J. F. Miller, et al. (1998). "Major histocompatibility complex class I-restricted cross-presentation is biased towards high dose antigens and those released during cellular destruction." J Exp Med **188**(2): 409-414.
- Kwon, H., D. Thierry-Mieg, et al. (2009). "Analysis of interleukin-21-induced Prdm1 gene regulation reveals functional cooperation of STAT3 and IRF4 transcription factors." Immunity **31**(6): 941-952.
- Kyewski, B. and L. Klein (2006). "A central role for central tolerance." Annu Rev Immunol **24**: 571-606.
- Lacy-Hulbert, A., A. M. Smith, et al. (2007). "Ulcerative colitis and autoimmunity induced by loss of myeloid alpha v integrins." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(40): 15823-15828.
- Lahl, K., C. Loddenkemper, et al. (2007). "Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease." J Exp Med **204**(1): 57-63.
- Lathrop, S. K., N. A. Santacruz, et al. (2008). "Antigen-specific peripheral shaping of the natural regulatory T cell population." J Exp Med **205**(13): 3105-3117.
- Laufer, T. M., J. DeKoning, et al. (1996). "Unopposed positive selection and autoreactivity in mice expressing class II MHC only on thymic cortex." Nature **383**(6595): 81-85.
- Laurence, A., C. M. Tato, et al. (2007). "Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation." Immunity **26**(3): 371-381.
- Le Gros, G., S. Z. Ben-Sasson, et al. (1990). "Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells." J Exp Med **172**(3): 921-929.
- Leach, M. W., A. G. Bean, et al. (1996). "Inflammatory bowel disease in C.B-17 scid mice reconstituted with the CD45RB<sup>high</sup> subset of CD4<sup>+</sup> T cells." Am J Pathol **148**(5): 1503-1515.
- Lee, H. M. and C. S. Hsieh (2009). "Rare development of Foxp3+ thymocytes in the CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> subset." J Immunol **183**(4): 2261-2266.
- Lee, I., L. Wang, et al. (2005). "Recruitment of Foxp3+ T regulatory cells mediating allograft tolerance depends on the CCR4 chemokine receptor." J Exp Med **201**(7): 1037-1044.
- Lee, J. W., M. Epardaud, et al. (2007). "Peripheral antigen display by lymph node stroma promotes T cell tolerance to intestinal self." Nat Immunol **8**(2): 181-190.
- Lee, Y. K., H. Turner, et al. (2009). "Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage." Immunity **30**(1): 92-107.
- Leppkes, M., C. Becker, et al. (2009). "RORgamma-expressing Th17 cells induce murine chronic intestinal inflammation via redundant effects of IL-17A and IL-17F." Gastroenterology **136**(1): 257-267.

- Lesourne, R., S. Uehara, et al. (2009). "Themis, a T cell-specific protein important for late thymocyte development." Nat Immunol **10**(8): 840-847.
- Letterio, J. J., A. G. Geiser, et al. (1996). "Autoimmunity associated with TGF-beta1-deficiency in mice is dependent on MHC class II antigen expression." J Clin Invest **98**(9): 2109-2119.
- Lettre, G. and J. D. Rioux (2008). "Autoimmune diseases: insights from genome-wide association studies." Hum Mol Genet **17**(R2): R116-121.
- Leung, D. T., S. Morefield, et al. (2000). "Regulation of lymphoid homeostasis by IL-2 receptor signals in vivo." J Immunol **164**(7): 3527-3534.
- Leung, M. W., S. Shen, et al. (2009). "TCR-dependent differentiation of thymic Foxp3+ cells is limited to small clonal sizes." J Exp Med **206**(10): 2121-2130.
- Levanon, D. and Y. Groner (2004). "Structure and regulated expression of mammalian RUNX genes." Oncogene **23**(24): 4211-4219.
- Levine, B. and V. Deretic (2007). "Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity." Nat Rev Immunol **7**(10): 767-777.
- Levings, M. K., R. Sangregorio, et al. (2001). "Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function." J Exp Med **193**(11): 1295-1302.
- Lexberg, M. H., A. Taubner, et al. (2008). "Th memory for interleukin-17 expression is stable in vivo." Eur J Immunol **38**(10): 2654-2664.
- Ley, R. E., D. A. Peterson, et al. (2006). "Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine." Cell **124**(4): 837-848.
- Li, B. and M. I. Greene (2007). "FOXP3 actively represses transcription by recruiting the HAT/HDAC complex." Cell Cycle **6**(12): 1432-1436.
- Li, M. O., S. Sanjabi, et al. (2006). "Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms." Immunity **25**(3): 455-471.
- Li, M. O., Y. Y. Wan, et al. (2007). "T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation." Immunity **26**(5): 579-591.
- Li, M. O., Y. Y. Wan, et al. (2006). "Transforming growth factor-beta regulation of immune responses." Annu Rev Immunol **24**: 99-146.
- Liang, B., C. Workman, et al. (2008). "Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II." J Immunol **180**(9): 5916-5926.
- Liblau, R. S., S. M. Singer, et al. (1995). "Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases." Immunol Today **16**(1): 34-38.
- Lighvani, A. A., D. M. Frucht, et al. (2001). "T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(26): 15137-15142.
- Lim, H. W., P. Hillsamer, et al. (2005). "Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells." J Immunol **175**(7): 4180-4183.
- Lio, C. W. and C. S. Hsieh (2008). "A two-step process for thymic regulatory T cell development." Immunity **28**(1): 100-111.
- Liston, A., S. Lesage, et al. (2003). "Aire regulates negative selection of organ-specific T cells." Nat Immunol **4**(4): 350-354.
- Liston, A., K. M. Nutsch, et al. (2008). "Differentiation of regulatory Foxp3+ T cells in the thymic cortex." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(33): 11903-11908.

- Liu, G., S. Burns, et al. (2009). "The receptor S1P1 overrides regulatory T cell-mediated immune suppression through Akt-mTOR." Nat Immunol **10**(7): 769-777.
- Liu, S. K., N. Fang, et al. (1999). "The hematopoietic-specific adaptor protein gads functions in T-cell signaling via interactions with the SLP-76 and LAT adaptors." Curr Biol **9**(2): 67-75.
- Liu, W., A. L. Putnam, et al. (2006). "CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells." J Exp Med **203**(7): 1701-1711.
- Liu, X., B. J. Taylor, et al. (2005). "Analyzing expression of perforin, Runx3, and Thpok genes during positive selection reveals activation of CD8-differentiation programs by MHC II-signaled thymocytes." J Immunol **175**(7): 4465-4474.
- Liu, Y., P. Zhang, et al. (2008). "A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells." Nat Immunol **9**(6): 632-640.
- Loftus, E. V., Jr. (2004). "Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences." Gastroenterology **126**(6): 1504-1517.
- Love, P. E. and S. M. Hayes (2010). "ITAM-mediated signaling by the T-cell antigen receptor." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(6): a002485.
- Lu, L. F., E. F. Lind, et al. (2006). "Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance." Nature **442**(7106): 997-1002.
- Lundberg, K., W. Heath, et al. (1995). "Intermediate steps in positive selection: differentiation of CD4+8int TCRint thymocytes into CD4+8+TCRhi thymocytes." J Exp Med **181**(5): 1643-1651.
- MacDonald, T. T. (2003). "The mucosal immune system." Parasite Immunol **25**(5): 235-246.
- Mackay, F., J. L. Browning, et al. (1998). "Both the lymphotoxin and tumor necrosis factor pathways are involved in experimental murine models of colitis." Gastroenterology **115**(6): 1464-1475.
- Macpherson, A. J., D. Gatto, et al. (2000). "A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria." Science **288**(5474): 2222-2226.
- Macpherson, A. J. and T. Uhr (2004). "Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria." Science **303**(5664): 1662-1665.
- Madsen, K., A. Cornish, et al. (2001). "Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function." Gastroenterology **121**(3): 580-591.
- Mahler, M., I. J. Bristol, et al. (1998). "Differential susceptibility of inbred mouse strains to dextran sulfate sodium-induced colitis." Am J Physiol **274**(3 Pt 1): G544-551.
- Maillard, I., T. Fang, et al. (2005). "Regulation of lymphoid development, differentiation, and function by the Notch pathway." Annu Rev Immunol **23**: 945-974.
- Maillard, I., L. Tu, et al. (2006). "The requirement for Notch signaling at the beta-selection checkpoint in vivo is absolute and independent of the pre-T cell receptor." J Exp Med **203**(10): 2239-2245.
- Malek, T. R. (2008). "The biology of interleukin-2." Annu Rev Immunol **26**: 453-479.
- Malek, T. R. and I. Castro (2010). "Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity." Immunity **33**(2): 153-165.

- Maloy, K. J., L. Salaun, et al. (2003). "CD4+CD25+ T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms." J Exp Med **197**(1): 111-119.
- Mangan, P. R., L. E. Harrington, et al. (2006). "Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage." Nature **441**(7090): 231-234.
- Mannon, P. J., I. J. Fuss, et al. (2004). "Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease." N Engl J Med **351**(20): 2069-2079.
- Marie, J. C., J. J. Letterio, et al. (2005). "TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells." J Exp Med **201**(7): 1061-1067.
- Marie, J. C., D. Liggitt, et al. (2006). "Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-beta receptor." Immunity **25**(3): 441-454.
- Marks, D. J., M. W. Harbord, et al. (2006). "Defective acute inflammation in Crohn's disease: a clinical investigation." Lancet **367**(9511): 668-678.
- Marson, A., K. Kretschmer, et al. (2007). "Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation." Nature **445**(7130): 931-935.
- Mathur, A. N., H. C. Chang, et al. (2007). "Stat3 and Stat4 direct development of IL-17-secreting Th cells." J Immunol **178**(8): 4901-4907.
- Matsumoto, S., Y. Okabe, et al. (1998). "Inflammatory bowel disease-like enteritis and caecitis in a senescence accelerated mouse P1/Yit strain." Gut **43**(1): 71-78.
- Matsuoka, K., N. Inoue, et al. (2004). "T-bet upregulation and subsequent interleukin 12 stimulation are essential for induction of Th1 mediated immunopathology in Crohn's disease." Gut **53**(9): 1303-1308.
- Maynard, C. L., L. E. Harrington, et al. (2007). "Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3+ and Foxp3- precursor cells in the absence of interleukin 10." Nat Immunol **8**(9): 931-941.
- Maynard, C. L. and C. T. Weaver (2009). "Intestinal effector T cells in health and disease." Immunity **31**(3): 389-400.
- Mazmanian, S. K., J. L. Round, et al. (2008). "A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease." Nature **453**(7195): 620-625.
- McCarroll, S. A. and D. M. Altshuler (2007). "Copy-number variation and association studies of human disease." Nat Genet **39**(7 Suppl): S37-42.
- McCaughy, T. M., M. S. Wilken, et al. (2007). "Thymic emigration revisited." J Exp Med **204**(11): 2513-2520.
- McGeachy, M. J., Y. Chen, et al. (2009). "The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo." Nat Immunol **10**(3): 314-324.
- McGeachy, M. J. and D. J. Cua (2007). "The link between IL-23 and Th17 cell-mediated immune pathologies." Semin Immunol **19**(6): 372-376.
- McGeachy, M. J. and D. J. Cua (2008). "Th17 cell differentiation: the long and winding road." Immunity **28**(4): 445-453.
- McGeachy, M. J., L. A. Stephens, et al. (2005). "Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system." J Immunol **175**(5): 3025-3032.
- McHugh, R. S., M. J. Whitters, et al. (2002). "CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor." Immunity **16**(2): 311-323.

- McVay, L. D., S. A. Keilbaugh, et al. (2006). "Absence of bacterially induced RELM $\beta$  reduces injury in the dextran sodium sulfate model of colitis." J Clin Invest **116**(11): 2914-2923.
- Medoff, B. D., B. P. Sandall, et al. (2009). "Differential requirement for CARMA1 in agonist-selected T-cell development." Eur J Immunol **39**(1): 78-84.
- Mempel, T. R., S. E. Henrickson, et al. (2004). "T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases." Nature **427**(6970): 154-159.
- Mempel, T. R., M. J. Pittet, et al. (2006). "Regulatory T cells reversibly suppress cytotoxic T cell function independent of effector differentiation." Immunity **25**(1): 129-141.
- Merkenschlager, M., D. Graf, et al. (1997). "How many thymocytes audition for selection?" J Exp Med **186**(7): 1149-1158.
- Milner, J. D., J. M. Brenchley, et al. (2008). "Impaired T(H)17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-IgE syndrome." Nature **452**(7188): 773-776.
- Milner, J. D., N. Fazilleau, et al. (2010). "Cutting edge: lack of high affinity competition for peptide in polyclonal CD4+ responses unmasks IL-4 production." J Immunol **184**(12): 6569-6573.
- Milner, J. D., J. M. Ward, et al. (2007). "Lymphopenic mice reconstituted with limited repertoire T cells develop severe, multiorgan, Th2-associated inflammatory disease." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(2): 576-581.
- Min, B., M. Prout, et al. (2004). "Basophils produce IL-4 and accumulate in tissues after infection with a Th2-inducing parasite." J Exp Med **200**(4): 507-517.
- Min, B., A. Thornton, et al. (2007). "Gut flora antigens are not important in the maintenance of regulatory T cell heterogeneity and homeostasis." Eur J Immunol **37**(7): 1916-1923.
- Minegishi, Y., M. Saito, et al. (2007). "Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome." Nature **448**(7157): 1058-1062.
- Mingueneau, M., R. Roncagalli, et al. (2009). "Loss of the LAT adaptor converts antigen-responsive T cells into pathogenic effectors that function independently of the T cell receptor." Immunity **31**(2): 197-208.
- Misra, N., J. Bayry, et al. (2004). "Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells." J Immunol **172**(8): 4676-4680.
- Mizoguchi, A. and A. K. Bhan (2006). "A case for regulatory B cells." J Immunol **176**(2): 705-710.
- Mizoguchi, A., E. Mizoguchi, et al. (1999). "The critical role of interleukin 4 but not interferon gamma in the pathogenesis of colitis in T-cell receptor alpha mutant mice." Gastroenterology **116**(2): 320-326.
- Mizoguchi, A., E. Mizoguchi, et al. (1996). "Cytokine imbalance and autoantibody production in T cell receptor-alpha mutant mice with inflammatory bowel disease." J Exp Med **183**(3): 847-856.
- Mizoguchi, A., E. Mizoguchi, et al. (1997). "Suppressive role of B cells in chronic colitis of T cell receptor alpha mutant mice." J Exp Med **186**(10): 1749-1756.
- Mizoguchi, A., A. Ogawa, et al. (2007). "Dependence of intestinal granuloma formation on unique myeloid DC-like cells." J Clin Invest **117**(3): 605-615.
- Moliner, L. L., J. Yang, et al. (2009). "CARMA1 controls an early checkpoint in the thymic development of FoxP3+ regulatory T cells." J Immunol **182**(11): 6736-6743.

- Moller, G. (1988). "Do suppressor T cells exist?" Scand J Immunol **27**(3): 247-250.
- Mombaerts, P., J. Iacomini, et al. (1992). "RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes." Cell **68**(5): 869-877.
- Mombaerts, P., E. Mizoguchi, et al. (1993). "Spontaneous development of inflammatory bowel disease in T cell receptor mutant mice." Cell **75**(2): 274-282.
- Monteleone, G., I. Monteleone, et al. (2005). "Interleukin-21 enhances T-helper cell type I signaling and interferon-gamma production in Crohn's disease." Gastroenterology **128**(3): 687-694.
- Moore, K. W., R. de Waal Malefyt, et al. (2001). "Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor." Annu Rev Immunol **19**: 683-765.
- Morelli, A. E. and A. W. Thomson (2007). "Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance." Nat Rev Immunol **7**(8): 610-621.
- Mosmann, T. R., H. Cherwinski, et al. (1986). "Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins." J Immunol **136**(7): 2348-2357.
- Mosmann, T. R. and R. L. Coffman (1989). "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties." Annu Rev Immunol **7**: 145-173.
- Mottet, C., H. H. Uhlig, et al. (2003). "Cutting edge: cure of colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells." J Immunol **170**(8): 3939-3943.
- Mowat, A. M. (2003). "Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens." Nat Rev Immunol **3**(4): 331-341.
- Mucida, D., Y. Park, et al. (2007). "Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid." Science **317**(5835): 256-260.
- Mukasa, R., A. Balasubramani, et al. (2010). "Epigenetic instability of cytokine and transcription factor gene loci underlies plasticity of the T helper 17 cell lineage." Immunity **32**(5): 616-627.
- Munger, J. S., X. Huang, et al. (1999). "The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis." Cell **96**(3): 319-328.
- Munn, D. H., M. Zhou, et al. (1998). "Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism." Science **281**(5380): 1191-1193.
- Murai, M., O. Turovskaya, et al. (2009). "Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis." Nat Immunol **10**(11): 1178-1184.
- Murata, S., K. Sasaki, et al. (2007). "Regulation of CD8+ T cell development by thymus-specific proteasomes." Science **316**(5829): 1349-1353.
- Musch, M. W., L. L. Clarke, et al. (2002). "T cell activation causes diarrhea by increasing intestinal permeability and inhibiting epithelial Na+/K+-ATPase." J Clin Invest **110**(11): 1739-1747.
- Nagamine, K., P. Peterson, et al. (1997). "Positional cloning of the APECED gene." Nat Genet **17**(4): 393-398.
- Nakayama, T. and M. Yamashita (2010). "The TCR-mediated signaling pathways that control the direction of helper T cell differentiation." Semin Immunol **22**(5): 303-309.
- Nawijn, M. C., R. Ferreira, et al. (2001). "Enforced expression of GATA-3 during T cell development inhibits maturation of CD8 single-positive cells and induces thymic lymphoma in transgenic mice." J Immunol **167**(2): 715-723.

- Nedjic, J., M. Aichinger, et al. (2008). "Autophagy in thymic epithelium shapes the T-cell repertoire and is essential for tolerance." *Nature* **455**(7211): 396-400.
- Neish, A. S., A. T. Gewirtz, et al. (2000). "Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of I $\kappa$ B-alpha ubiquitination." *Science* **289**(5484): 1560-1563.
- Neurath, M. F., B. Weigmann, et al. (2002). "The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease." *J Exp Med* **195**(9): 1129-1143.
- Ng, W. F., P. J. Duggan, et al. (2001). "Human CD4(+)CD25(+) cells: a naturally occurring population of regulatory T cells." *Blood* **98**(9): 2736-2744.
- Nielsen, O. H., I. Kirman, et al. (2003). "Upregulation of interleukin-12 and -17 in active inflammatory bowel disease." *Scand J Gastroenterol* **38**(2): 180-185.
- Niessner, M. and B. A. Volk (1995). "Altered Th1/Th2 cytokine profiles in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease as assessed by quantitative reversed transcribed polymerase chain reaction (RT-PCR)." *Clin Exp Immunol* **101**(3): 428-435.
- Nishimura, H., M. Nose, et al. (1999). "Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor." *Immunity* **11**(2): 141-151.
- Norment, A. M., R. D. Salter, et al. (1988). "Cell-cell adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules." *Nature* **336**(6194): 79-81.
- Nowak, E. C., C. T. Weaver, et al. (2009). "IL-9 as a mediator of Th17-driven inflammatory disease." *J Exp Med* **206**(8): 1653-1660.
- Nurieva, R., X. O. Yang, et al. (2007). "Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells." *Nature* **448**(7152): 480-483.
- Nurieva, R. I., Y. Chung, et al. (2008). "Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages." *Immunity* **29**(1): 138-149.
- Nurieva, R. I., Y. Chung, et al. (2009). "Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells." *Science* **325**(5943): 1001-1005.
- O'Connor, W., Jr., M. Kamanaka, et al. (2009). "A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation." *Nat Immunol* **10**(6): 603-609.
- Ochs, H. D., S. F. Ziegler, et al. (2005). "FOXP3 acts as a rheostat of the immune response." *Immunol Rev* **203**: 156-164.
- Ogawa, A., A. Andoh, et al. (2004). "Neutralization of interleukin-17 aggravates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice." *Clin Immunol* **110**(1): 55-62.
- Ogura, Y., D. K. Bonen, et al. (2001). "A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease." *Nature* **411**(6837): 603-606.
- Oh-Hora, M., M. Yamashita, et al. (2008). "Dual functions for the endoplasmic reticulum calcium sensors STIM1 and STIM2 in T cell activation and tolerance." *Nat Immunol* **9**(4): 432-443.
- Ohashi, P. S., S. Oehen, et al. (1991). "Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice." *Cell* **65**(2): 305-317.
- Oida, T., X. Zhang, et al. (2003). "CD4+CD25- T cells that express latency-associated peptide on the surface suppress CD4+CD45RB<sup>high</sup>-induced colitis by a TGF-beta-dependent mechanism." *J Immunol* **170**(5): 2516-2522.
- Okamoto, M., M. Van Stry, et al. (2009). "Mina, an Il4 repressor, controls T helper type 2 bias." *Nat Immunol* **10**(8): 872-879.

- Okayasu, I., S. Hatakeyama, et al. (1990). "A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice." Gastroenterology **98**(3): 694-702.
- Okazaki, T. and T. Honjo (2006). "The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance." Trends Immunol **27**(4): 195-201.
- Onishi, Y., Z. Fehervari, et al. (2008). "Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(29): 10113-10118.
- Ono, M., H. Yaguchi, et al. (2007). "Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1." Nature **446**(7136): 685-689.
- Ouyang, W., O. Beckett, et al. (2010). "Transforming growth factor-beta signaling curbs thymic negative selection promoting regulatory T cell development." Immunity **32**(5): 642-653.
- Ouyang, W., M. Lohning, et al. (2000). "Stat6-independent GATA-3 autoactivation directs IL-4-independent Th2 development and commitment." Immunity **12**(1): 27-37.
- Ozcan, E., L. D. Notarangelo, et al. (2008). "Primary immune deficiencies with aberrant IgE production." J Allergy Clin Immunol **122**(6): 1054-1062; quiz 1063-1054.
- Pacholczyk, R., H. Ignatowicz, et al. (2006). "Origin and T cell receptor diversity of Foxp3+CD4+CD25+ T cells." Immunity **25**(2): 249-259.
- Pacholczyk, R. and J. Kern (2008). "The T-cell receptor repertoire of regulatory T cells." Immunology **125**(4): 450-458.
- Pai, S. Y., M. L. Truitt, et al. (2004). "GATA-3 deficiency abrogates the development and maintenance of T helper type 2 cells." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(7): 1993-1998.
- Pai, S. Y., M. L. Truitt, et al. (2003). "Critical roles for transcription factor GATA-3 in thymocyte development." Immunity **19**(6): 863-875.
- Pandiyani, P., L. Zheng, et al. (2007). "CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells." Nat Immunol **8**(12): 1353-1362.
- Park, H., Z. Li, et al. (2005). "A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17." Nat Immunol **6**(11): 1133-1141.
- Park, J. H., S. Adoro, et al. (2010). "Signaling by intrathymic cytokines, not T cell antigen receptors, specifies CD8 lineage choice and promotes the differentiation of cytotoxic-lineage T cells." Nat Immunol **11**(3): 257-264.
- Parkes, M., J. C. Barrett, et al. (2007). "Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility." Nat Genet **39**(7): 830-832.
- Patrick, M. S., H. Oda, et al. (2009). "Gasp, a Grb2-associating protein, is critical for positive selection of thymocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(38): 16345-16350.
- Paul, W. E. and R. A. Seder (1994). "Lymphocyte responses and cytokines." Cell **76**(2): 241-251.
- Paust, S. and H. Cantor (2005). "Regulatory T cells and autoimmune disease." Immunol Rev **204**: 195-207.
- Paust, S., L. Lu, et al. (2004). "Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(28): 10398-10403.

- Pearce, E. L., A. C. Mullen, et al. (2003). "Control of effector CD8+ T cell function by the transcription factor Eomesodermin." Science **302**(5647): 1041-1043.
- Peffault de Latour, R., H. C. Dujardin, et al. (2006). "Ontogeny, function, and peripheral homeostasis of regulatory T cells in the absence of interleukin-7." Blood **108**(7): 2300-2306.
- Perez, V. L., L. Van Parijs, et al. (1997). "Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement." Immunity **6**(4): 411-417.
- Perez-Villar, J. J., G. S. Whitney, et al. (1999). "CD5 negatively regulates the T-cell antigen receptor signal transduction pathway: involvement of SH2-containing phosphotyrosine phosphatase SHP-1." Mol Cell Biol **19**(4): 2903-2912.
- Perruche, S., P. Zhang, et al. (2008). "CD3-specific antibody-induced immune tolerance involves transforming growth factor-beta from phagocytes digesting apoptotic T cells." Nat Med **14**(5): 528-535.
- Pesu, M., W. T. Watford, et al. (2008). "T-cell-expressed proprotein convertase furin is essential for maintenance of peripheral immune tolerance." Nature **455**(7210): 246-250.
- Peyrin-Biroulet, L., P. Desreumaux, et al. (2008). "Crohn's disease: beyond antagonists of tumour necrosis factor." Lancet **372**(9632): 67-81.
- Picca, C. C., J. Larkin, 3rd, et al. (2006). "Role of TCR specificity in CD4+ CD25+ regulatory T-cell selection." Immunol Rev **212**: 74-85.
- Piccirillo, C. A. and E. M. Shevach (2001). "Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells." J Immunol **167**(3): 1137-1140.
- Plevy, S. E., C. J. Landers, et al. (1997). "A role for TNF-alpha and mucosal T helper-1 cytokines in the pathogenesis of Crohn's disease." J Immunol **159**(12): 6276-6282.
- Podolsky, D. K. (2002). "Inflammatory bowel disease." N Engl J Med **347**(6): 417-429.
- Powrie, F., J. Carlino, et al. (1996). "A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB(low) CD4+ T cells." J Exp Med **183**(6): 2669-2674.
- Powrie, F., R. Correa-Oliveira, et al. (1994). "Regulatory interactions between CD45RBhigh and CD45RBlow CD4+ T cells are important for the balance between protective and pathogenic cell-mediated immunity." J Exp Med **179**(2): 589-600.
- Powrie, F., M. W. Leach, et al. (1993). "Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice." Int Immunol **5**(11): 1461-1471.
- Powrie, F. and D. Mason (1990). "OX-22high CD4+ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by the OX-22low subset." J Exp Med **172**(6): 1701-1708.
- Proietto, A. I., S. van Dommelen, et al. (2008). "Dendritic cells in the thymus contribute to T-regulatory cell induction." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(50): 19869-19874.
- Puccetti, P. and U. Grohmann (2007). "IDO and regulatory T cells: a role for reverse signalling and non-canonical NF-kappaB activation." Nat Rev Immunol **7**(10): 817-823.
- Radtko, F., N. Fasnacht, et al. (2010). "Notch signaling in the immune system." Immunity **32**(1): 14-27.

- Ramsey, C., O. Winqvist, et al. (2002). "Aire deficient mice develop multiple features of APECED phenotype and show altered immune response." Hum Mol Genet **11**(4): 397-409.
- Read, S., S. Mauze, et al. (1998). "CD38+ CD45RB(low) CD4+ T cells: a population of T cells with immune regulatory activities in vitro." Eur J Immunol **28**(11): 3435-3447.
- Reimund, J. M., C. Wittersheim, et al. (1996). "Mucosal inflammatory cytokine production by intestinal biopsies in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease." J Clin Immunol **16**(3): 144-150.
- Rengarajan, J., B. Tang, et al. (2002). "NFATc2 and NFATc3 regulate T(H)2 differentiation and modulate TCR-responsiveness of naive T(H)cells." Nat Immunol **3**(1): 48-54.
- Rescigno, M., M. Urbano, et al. (2001). "Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria." Nat Immunol **2**(4): 361-367.
- Resnick, M. B., S. P. Colgan, et al. (1993). "Activated eosinophils evoke chloride secretion in model intestinal epithelia primarily via regulated release of 5'-AMP." J Immunol **151**(10): 5716-5723.
- Rioux, J. D., R. J. Xavier, et al. (2007). "Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis." Nat Genet **39**(5): 596-604.
- Robinson, D., K. Shibuya, et al. (1997). "IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon-gamma production and activates IRAK and NFkappaB." Immunity **7**(4): 571-581.
- Rocha, B. (2007). "The extrathymic T-cell differentiation in the murine gut." Immunol Rev **215**: 166-177.
- Rodewald, H. R., S. Paul, et al. (2001). "Thymus medulla consisting of epithelial islets each derived from a single progenitor." Nature **414**(6865): 763-768.
- Roers, A., L. Siewe, et al. (2004). "T cell-specific inactivation of the interleukin 10 gene in mice results in enhanced T cell responses but normal innate responses to lipopolysaccharide or skin irritation." J Exp Med **200**(10): 1289-1297.
- Roman, E., H. Shino, et al. (2010). "Cutting edge: Hematopoietic-derived APCs select regulatory T cells in thymus." J Immunol **185**(7): 3819-3823.
- Roncarolo, M. G. and M. Battaglia (2007). "Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans." Nat Rev Immunol **7**(8): 585-598.
- Rossi, F. M., S. Y. Corbel, et al. (2005). "Recruitment of adult thymic progenitors is regulated by P-selectin and its ligand PSGL-1." Nat Immunol **6**(6): 626-634.
- Rothenberg, E. V. (2002). "T-lineage specification and commitment: a gene regulation perspective." Semin Immunol **14**(6): 431-440.
- Rothenberg, E. V., J. E. Moore, et al. (2008). "Launching the T-cell-lineage developmental programme." Nat Rev Immunol **8**(1): 9-21.
- Round, J. L. and S. K. Mazmanian (2009). "The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease." Nat Rev Immunol **9**(5): 313-323.
- Rousseaux, C., B. Lefebvre, et al. (2005). "Intestinal antiinflammatory effect of 5-aminosalicylic acid is dependent on peroxisome proliferator-activated receptor-gamma." J Exp Med **201**(8): 1205-1215.

- Rubtsov, Y. P., J. P. Rasmussen, et al. (2008). "Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces." *Immunity* **28**(4): 546-558.
- Rutgeerts, P., G. Van Assche, et al. (2004). "Optimizing anti-TNF treatment in inflammatory bowel disease." *Gastroenterology* **126**(6): 1593-1610.
- Rutishauser, R. L., G. A. Martins, et al. (2009). "Transcriptional repressor Blimp-1 promotes CD8(+) T cell terminal differentiation and represses the acquisition of central memory T cell properties." *Immunity* **31**(2): 296-308.
- Sadlack, B., H. Merz, et al. (1993). "Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene." *Cell* **75**(2): 253-261.
- Saint-Ruf, C., K. Ungewiss, et al. (1994). "Analysis and expression of a cloned pre-T cell receptor gene." *Science* **266**(5188): 1208-1212.
- Saitoh, T., N. Fujita, et al. (2008). "Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 $\beta$  production." *Nature* **456**(7219): 264-268.
- Sakaguchi, S. (2004). "Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses." *Annu Rev Immunol* **22**: 531-562.
- Sakaguchi, S., K. Fukuma, et al. (1985). "Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease." *J Exp Med* **161**(1): 72-87.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, et al. (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): 1151-1164.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, et al. (2001). "Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance." *Immunol Rev* **182**: 18-32.
- Sakaguchi, S., T. Yamaguchi, et al. (2008). "Regulatory T cells and immune tolerance." *Cell* **133**(5): 775-787.
- Salomon, B., D. J. Lenschow, et al. (2000). "B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes." *Immunity* **12**(4): 431-440.
- Salzman, N. H., D. Ghosh, et al. (2003). "Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin." *Nature* **422**(6931): 522-526.
- Samy, E. T., L. A. Parker, et al. (2005). "Continuous control of autoimmune disease by antigen-dependent polyclonal CD4+CD25+ regulatory T cells in the regional lymph node." *J Exp Med* **202**(6): 771-781.
- Sandborn, W. J., B. G. Feagan, et al. (2008). "A randomized trial of Ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with moderate-to-severe Crohn's disease." *Gastroenterology* **135**(4): 1130-1141.
- Sansonetti, P. J. (2004). "War and peace at mucosal surfaces." *Nat Rev Immunol* **4**(12): 953-964.
- Sarafova, S. D., B. Erman, et al. (2005). "Modulation of coreceptor transcription during positive selection dictates lineage fate independently of TCR/coreceptor specificity." *Immunity* **23**(1): 75-87.
- Saraiva, M., J. R. Christensen, et al. (2009). "Interleukin-10 production by Th1 cells requires interleukin-12-induced STAT4 transcription factor and ERK MAP kinase activation by high antigen dose." *Immunity* **31**(2): 209-219.

- Sarris, M., K. G. Andersen, et al. (2008). "Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition." *Immunity* **28**(3): 402-413.
- Sartor, R. B. (2006). "Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis." *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* **3**(7): 390-407.
- Saruta, M., Q. T. Yu, et al. (2007). "Phenotype and effector function of CC chemokine receptor 9-expressing lymphocytes in small intestinal Crohn's disease." *J Immunol* **178**(5): 3293-3300.
- Sarween, N., A. Chodos, et al. (2004). "CD4+CD25+ cells controlling a pathogenic CD4 response inhibit cytokine differentiation, CXCR-3 expression, and tissue invasion." *J Immunol* **173**(5): 2942-2951.
- Sather, B. D., P. Treuting, et al. (2007). "Altering the distribution of Foxp3(+) regulatory T cells results in tissue-specific inflammatory disease." *J Exp Med* **204**(6): 1335-1347.
- Sato, T., S. Ohno, et al. (2005). "Dual functions of Runx proteins for reactivating CD8 and silencing CD4 at the commitment process into CD8 thymocytes." *Immunity* **22**(3): 317-328.
- Sawcer, S., G. Hellenthal, et al. (2011). "Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis." *Nature* **476**(7359): 214-219.
- Schaerli, P., K. Willimann, et al. (2000). "CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function." *J Exp Med* **192**(11): 1553-1562.
- Schallenberg, S., P. Y. Tsai, et al. (2010). "Identification of an immediate Foxp3(-) precursor to Foxp3(+) regulatory T cells in peripheral lymphoid organs of nonmanipulated mice." *J Exp Med* **207**(7): 1393-1407.
- Scheinecker, C., R. McHugh, et al. (2002). "Constitutive presentation of a natural tissue autoantigen exclusively by dendritic cells in the draining lymph node." *J Exp Med* **196**(8): 1079-1090.
- Schenk, M., A. Bouchon, et al. (2007). "TREM-1--expressing intestinal macrophages crucially amplify chronic inflammation in experimental colitis and inflammatory bowel diseases." *J Clin Invest* **117**(10): 3097-3106.
- Schilham, M. W. and H. Clevers (1998). "HMG box containing transcription factors in lymphocyte differentiation." *Semin Immunol* **10**(2): 127-132.
- Schmitt, E., T. Germann, et al. (1994). "IL-9 production of naive CD4+ T cells depends on IL-2, is synergistically enhanced by a combination of TGF-beta and IL-4, and is inhibited by IFN-gamma." *J Immunol* **153**(9): 3989-3996.
- Schneider, M. A., J. G. Meingassner, et al. (2007). "CCR7 is required for the in vivo function of CD4+ CD25+ regulatory T cells." *J Exp Med* **204**(4): 735-745.
- Schreiber, S., M. Khaliq-Kareemi, et al. (2007). "Maintenance therapy with certolizumab pegol for Crohn's disease." *N Engl J Med* **357**(3): 239-250.
- Schwarz, B. A., A. Sambandam, et al. (2007). "Selective thymus settling regulated by cytokine and chemokine receptors." *J Immunol* **178**(4): 2008-2017.
- Scimone, M. L., I. Aifantis, et al. (2006). "A multistep adhesion cascade for lymphoid progenitor cell homing to the thymus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(18): 7006-7011.
- Seddiki, N., B. Santner-Nanan, et al. (2006). "Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells." *J Exp Med* **203**(7): 1693-1700.

- Seddon, B. and D. Mason (1999). "Peripheral autoantigen induces regulatory T cells that prevent autoimmunity." J Exp Med **189**(5): 877-882.
- Seder, R. A., W. E. Paul, et al. (1992). "The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice." J Exp Med **176**(4): 1091-1098.
- Seiderer, J., I. Elben, et al. (2008). "Role of the novel Th17 cytokine IL-17F in inflammatory bowel disease (IBD): upregulated colonic IL-17F expression in active Crohn's disease and analysis of the IL17F p.His161Arg polymorphism in IBD." Inflamm Bowel Dis **14**(4): 437-445.
- Sellon, R. K., S. Tonkonogy, et al. (1998). "Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice." Infect Immun **66**(11): 5224-5231.
- Seong, R. H., J. W. Chamberlain, et al. (1992). "Signal for T-cell differentiation to a CD4 cell lineage is delivered by CD4 transmembrane region and/or cytoplasmic tail." Nature **356**(6371): 718-720.
- Serra, P., A. Amrani, et al. (2003). "CD40 ligation releases immature dendritic cells from the control of regulatory CD4+CD25+ T cells." Immunity **19**(6): 877-889.
- Setoguchi, R., S. Hori, et al. (2005). "Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization." J Exp Med **201**(5): 723-735.
- Setoguchi, R., M. Tachibana, et al. (2008). "Repression of the transcription factor Th-POK by Runx complexes in cytotoxic T cell development." Science **319**(5864): 822-825.
- Shalev, I., H. Liu, et al. (2008). "Targeted deletion of fgl2 leads to impaired regulatory T cell activity and development of autoimmune glomerulonephritis." J Immunol **180**(1): 249-260.
- Shalev, I., M. Schmelzle, et al. (2011). "Making sense of regulatory T cell suppressive function." Semin Immunol **23**(4): 282-292.
- Shaw, A. S., K. E. Amrein, et al. (1989). "The lck tyrosine protein kinase interacts with the cytoplasmic tail of the CD4 glycoprotein through its unique amino-terminal domain." Cell **59**(4): 627-636.
- Shaw, P. E., H. Schroter, et al. (1989). "The ability of a ternary complex to form over the serum response element correlates with serum inducibility of the human c-fos promoter." Cell **56**(4): 563-572.
- Shen, L. and J. R. Turner (2006). "Role of epithelial cells in initiation and propagation of intestinal inflammation. Eliminating the static: tight junction dynamics exposed." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **290**(4): G577-582.
- Shevach, E. M. (2009). "Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression." Immunity **30**(5): 636-645.
- Shimoda, K., J. van Deursen, et al. (1996). "Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene." Nature **380**(6575): 630-633.
- Shinkai, Y., G. Rathbun, et al. (1992). "RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement." Cell **68**(5): 855-867.
- Shkoda, A., P. A. Ruiz, et al. (2007). "Interleukin-10 blocked endoplasmic reticulum stress in intestinal epithelial cells: impact on chronic inflammation." Gastroenterology **132**(1): 190-207.
- Siewert, C., A. Menning, et al. (2007). "Induction of organ-selective CD4+ regulatory T cell homing." Eur J Immunol **37**(4): 978-989.

- Sigmundsdottir, H., J. Pan, et al. (2007). "DCs metabolize sunlight-induced vitamin D3 to 'program' T cell attraction to the epidermal chemokine CCL27." Nat Immunol **8**(3): 285-293.
- Silverberg, M. S., J. H. Cho, et al. (2009). "Ulcerative colitis-risk loci on chromosomes 1p36 and 12q15 found by genome-wide association study." Nat Genet **41**(2): 216-220.
- Simms, L. A., J. D. Doecke, et al. (2008). "Reduced alpha-defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease." Gut **57**(7): 903-910.
- Singer, A. (2002). "New perspectives on a developmental dilemma: the kinetic signaling model and the importance of signal duration for the CD4/CD8 lineage decision." Curr Opin Immunol **14**(2): 207-215.
- Singer, A., S. Adoro, et al. (2008). "Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice." Nat Rev Immunol **8**(10): 788-801.
- Singer, A. and R. Bosselut (2004). "CD4/CD8 coreceptors in thymocyte development, selection, and lineage commitment: analysis of the CD4/CD8 lineage decision." Adv Immunol **83**: 91-131.
- Singh, S. B., A. S. Davis, et al. (2006). "Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria." Science **313**(5792): 1438-1441.
- Smith, T. R. and V. Kumar (2008). "Revival of CD8+ Treg-mediated suppression." Trends Immunol **29**(7): 337-342.
- Smith-Garvin, J. E., G. A. Koretzky, et al. (2009). "T cell activation." Annu Rev Immunol **27**: 591-619.
- Smyth, D. J., V. Plagnol, et al. (2008). "Shared and distinct genetic variants in type 1 diabetes and celiac disease." N Engl J Med **359**(26): 2767-2777.
- Smythies, L. E., M. Sellers, et al. (2005). "Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity." J Clin Invest **115**(1): 66-75.
- Sobel, E. S., V. N. Kakkanaiah, et al. (1993). "Correction of gld autoimmunity by co-infusion of normal bone marrow suggests that gld is a mutation of the Fas ligand gene." Int Immunol **5**(10): 1275-1278.
- Sokol, H., B. Pigneur, et al. (2008). "Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(43): 16731-16736.
- Sommers, C. L., J. Lee, et al. (2005). "Mutation of the phospholipase C-gamma1-binding site of LAT affects both positive and negative thymocyte selection." J Exp Med **201**(7): 1125-1134.
- Sommers, C. L., L. E. Samelson, et al. (2004). "LAT: a T lymphocyte adapter protein that couples the antigen receptor to downstream signaling pathways." Bioessays **26**(1): 61-67.
- Soper, D. M., D. J. Kaspirowicz, et al. (2007). "IL-2Rbeta links IL-2R signaling with Foxp3 expression." Eur J Immunol **37**(7): 1817-1826.
- Spence, P. J. and E. A. Green (2008). "Foxp3+ regulatory T cells promiscuously accept thymic signals critical for their development." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(3): 973-978.
- Stepankova, R., F. Powrie, et al. (2007). "Segmented filamentous bacteria in a defined bacterial cocktail induce intestinal inflammation in SCID mice reconstituted with CD45RBhigh CD4+ T cells." Inflamm Bowel Dis **13**(10): 1202-1211.

- Stephens, L. A., C. Mottet, et al. (2001). "Human CD4(+)CD25(+) thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro." Eur J Immunol **31**(4): 1247-1254.
- Strober, W. and I. J. Fuss (2011). "Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases." Gastroenterology **140**(6): 1756-1767.
- Strober, W., I. J. Fuss, et al. (2002). "The immunology of mucosal models of inflammation." Annu Rev Immunol **20**: 495-549.
- Strober, W., F. Zhang, et al. (2010). "Proinflammatory cytokines underlying the inflammation of Crohn's disease." Curr Opin Gastroenterol **26**(4): 310-317.
- Strohmeier, G. R., W. I. Lencer, et al. (1997). "Surface expression, polarization, and functional significance of CD73 in human intestinal epithelia." J Clin Invest **99**(11): 2588-2601.
- Stros, M., D. Launholt, et al. (2007). "The HMG-box: a versatile protein domain occurring in a wide variety of DNA-binding proteins." Cell Mol Life Sci **64**(19-20): 2590-2606.
- Subra, J. F., B. Cautain, et al. (2001). "The balance between CD45RChigh and CD45RClow CD4 T cells in rats is intrinsic to bone marrow-derived cells and is genetically controlled." J Immunol **166**(5): 2944-2952.
- Sugimoto, K., A. Ogawa, et al. (2008). "IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis." J Clin Invest **118**(2): 534-544.
- Sun, C. M., J. A. Hall, et al. (2007). "Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid." J Exp Med **204**(8): 1775-1785.
- Sun, G., X. Liu, et al. (2005). "The zinc finger protein cKrox directs CD4 lineage differentiation during intrathymic T cell positive selection." Nat Immunol **6**(4): 373-381.
- Sundberg, J. P., C. O. Elson, et al. (1994). "Spontaneous, heritable colitis in a new substrain of C3H/HeJ mice." Gastroenterology **107**(6): 1726-1735.
- Suzuki, H., T. M. Kundig, et al. (1995). "Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta." Science **268**(5216): 1472-1476.
- Suzuki, H., J. A. Punt, et al. (1995). "Asymmetric signaling requirements for thymocyte commitment to the CD4+ versus CD8+ T cell lineages: a new perspective on thymic commitment and selection." Immunity **2**(4): 413-425.
- Suzuki, K., B. Meek, et al. (2004). "Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA-deficient gut." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(7): 1981-1986.
- Swain, S. L., A. D. Weinberg, et al. (1990). "IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors." J Immunol **145**(11): 3796-3806.
- Szabo, S. J., S. T. Kim, et al. (2000). "A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment." Cell **100**(6): 655-669.
- Szabo, S. J., B. M. Sullivan, et al. (2003). "Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses." Annu Rev Immunol **21**: 713-758.
- Szabo, S. J., B. M. Sullivan, et al. (2002). "Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells." Science **295**(5553): 338-342.
- Szanya, V., J. Ermann, et al. (2002). "The subpopulation of CD4+CD25+ splenocytes that delays adoptive transfer of diabetes expresses L-selectin and high levels of CCR7." J Immunol **169**(5): 2461-2465.

- Taams, L. S., J. Smith, et al. (2001). "Human anergic/suppressive CD4(+)CD25(+) T cells: a highly differentiated and apoptosis-prone population." Eur J Immunol **31**(4): 1122-1131.
- Tadokoro, C. E., G. Shakhar, et al. (2006). "Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo." J Exp Med **203**(3): 505-511.
- Tafuri, A., J. Alferink, et al. (1995). "T cell awareness of paternal alloantigens during pregnancy." Science **270**(5236): 630-633.
- Taguchi, O., K. Kontani, et al. (1994). "Tissue-specific suppressor T cells involved in self-tolerance are activated extrathymically by self-antigens." Immunology **82**(3): 365-369.
- Tai, X., M. Cowan, et al. (2005). "CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2." Nat Immunol **6**(2): 152-162.
- Takahashi, T., Y. Kuniyasu, et al. (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): 1969-1980.
- Takahashi, T., T. Tagami, et al. (2000). "Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4." J Exp Med **192**(2): 303-310.
- Takeda, K., B. E. Clausen, et al. (1999). "Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils." Immunity **10**(1): 39-49.
- Takeda, K., T. Tanaka, et al. (1996). "Essential role of Stat6 in IL-4 signalling." Nature **380**(6575): 627-630.
- Tang, Q., J. Y. Adams, et al. (2006). "Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice." Nat Immunol **7**(1): 83-92.
- Tang, Q., J. A. Smith, et al. (2003). "CD28/B7 regulation of anti-CD3-mediated immunosuppression in vivo." J Immunol **170**(3): 1510-1516.
- Taniuchi, I., M. Osato, et al. (2002). "Differential requirements for Runx proteins in CD4 repression and epigenetic silencing during T lymphocyte development." Cell **111**(5): 621-633.
- Targan, S. R., B. G. Feagan, et al. (2007). "Natalizumab for the treatment of active Crohn's disease: results of the ENCORE Trial." Gastroenterology **132**(5): 1672-1683.
- Targan, S. R., S. B. Hanauer, et al. (1997). "A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group." N Engl J Med **337**(15): 1029-1035.
- Targan, S. R., C. J. Landers, et al. (1995). "Perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies are spontaneously produced by mucosal B cells of ulcerative colitis patients." J Immunol **155**(6): 3262-3267.
- Taupin, D. and D. K. Podolsky (2003). "Trefoil factors: initiators of mucosal healing." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(9): 721-732.
- Thierfelder, W. E., J. M. van Deursen, et al. (1996). "Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells." Nature **382**(6587): 171-174.
- Thomas, M. A., C. F. Chen, et al. (2003). "Phylogenetics of rat inbred strains." Mamm Genome **14**(1): 61-64.

- Thornton, A. M. and E. M. Shevach (1998). "CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production." J Exp Med **188**(2): 287-296.
- Tramont, P. C., A. C. Tosello-Tramont, et al. (2010). "CXCR4 acts as a costimulator during thymic beta-selection." Nat Immunol **11**(2): 162-170.
- Travis, M. A., B. Reizis, et al. (2007). "Loss of integrin alpha(v)beta8 on dendritic cells causes autoimmunity and colitis in mice." Nature **449**(7160): 361-365.
- Turnbaugh, P. J., M. Hamady, et al. (2009). "A core gut microbiome in obese and lean twins." Nature **457**(7228): 480-484.
- Turner, J. M., M. H. Brodsky, et al. (1990). "Interaction of the unique N-terminal region of tyrosine kinase p56lck with cytoplasmic domains of CD4 and CD8 is mediated by cysteine motifs." Cell **60**(5): 755-765.
- Turner, J. R. (2006). "Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application." Am J Pathol **169**(6): 1901-1909.
- Tursi, A., G. M. Giorgetti, et al. (2005). "High prevalence of celiac disease among patients affected by Crohn's disease." Inflamm Bowel Dis **11**(7): 662-666.
- Uehara, S., A. Grinberg, et al. (2002). "A role for CCR9 in T lymphocyte development and migration." J Immunol **168**(6): 2811-2819.
- Uehara, S., K. Song, et al. (2002). "Characterization of CCR9 expression and CCL25/thymus-expressed chemokine responsiveness during T cell development: CD3(high)CD69+ thymocytes and gammadeltaTCR+ thymocytes preferentially respond to CCL25." J Immunol **168**(1): 134-142.
- Uhlig, H. H., J. Coombes, et al. (2006). "Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-secreting CD4+CD25+ T cells during cure of colitis." J Immunol **177**(9): 5852-5860.
- Umesaki, Y., Y. Okada, et al. (1995). "Segmented filamentous bacteria are indigenous intestinal bacteria that activate intraepithelial lymphocytes and induce MHC class II molecules and fucosyl asialo GM1 glycolipids on the small intestinal epithelial cells in the ex-germ-free mouse." Microbiol Immunol **39**(8): 555-562.
- Unkeless, J. C. and J. Jin (1997). "Inhibitory receptors, ITIM sequences and phosphatases." Curr Opin Immunol **9**(3): 338-343.
- Usui, T., R. Nishikomori, et al. (2003). "GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12Rbeta2 chain or T-bet." Immunity **18**(3): 415-428.
- Usui, T., J. C. Preiss, et al. (2006). "T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription." J Exp Med **203**(3): 755-766.
- Valzasina, B., C. Guiducci, et al. (2005). "Triggering of OX40 (CD134) on CD4(+)CD25+ T cells blocks their inhibitory activity: a novel regulatory role for OX40 and its comparison with GITR." Blood **105**(7): 2845-2851.
- van der Vliet, H. J., B. M. von Blomberg, et al. (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): 144-148.
- van Panhuys, N., S. C. Tang, et al. (2008). "In vivo studies fail to reveal a role for IL-4 or STAT6 signaling in Th2 lymphocyte differentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(34): 12423-12428.

- Vang, K. B., J. Yang, et al. (2008). "IL-2, -7, and -15, but not thymic stromal lymphopoietin, redundantly govern CD4+Foxp3+ regulatory T cell development." J Immunol **181**(5): 3285-3290.
- Veldhoen, M., R. J. Hocking, et al. (2006). "TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells." Immunity **24**(2): 179-189.
- Veldhoen, M., C. Uyttenhove, et al. (2008). "Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset." Nat Immunol **9**(12): 1341-1346.
- Vidrich, A., J. M. Buzan, et al. (2005). "Altered epithelial cell lineage allocation and global expansion of the crypt epithelial stem cell population are associated with ileitis in SAMP1/YitFc mice." Am J Pathol **166**(4): 1055-1067.
- Vieira, P. L., J. R. Christensen, et al. (2004). "IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells." J Immunol **172**(10): 5986-5993.
- Viglietta, V., C. Baecher-Allan, et al. (2004). "Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis." J Exp Med **199**(7): 971-979.
- Viguiier, M., F. Lemaitre, et al. (2004). "Foxp3 expressing CD4+CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells." J Immunol **173**(2): 1444-1453.
- Voehringer, D., K. Shinkai, et al. (2004). "Type 2 immunity reflects orchestrated recruitment of cells committed to IL-4 production." Immunity **20**(3): 267-277.
- Walker, L. S. and A. K. Abbas (2002). "The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery." Nat Rev Immunol **2**(1): 11-19.
- Walker, L. S., A. Chodos, et al. (2003). "Antigen-dependent proliferation of CD4+CD25+ regulatory T cells in vivo." J Exp Med **198**(2): 249-258.
- Walker, M. R., B. D. Carson, et al. (2005). "De novo generation of antigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells from human CD4+CD25- cells." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(11): 4103-4108.
- Walker, M. R., D. J. Kasproicz, et al. (2003). "Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells." J Clin Invest **112**(9): 1437-1443.
- Wang, L., Y. Xiong, et al. (2010). "Tenuous paths in unexplored territory: From T cell receptor signaling to effector gene expression during thymocyte selection." Semin Immunol **22**(5): 294-302.
- Wang, Y., M. A. Su, et al. (2011). "An Essential Role of the Transcription Factor GATA-3 for the Function of Regulatory T Cells." Immunity **35**(3): 337-348.
- Watanabe-Fukunaga, R., C. I. Brannan, et al. (1992). "Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis." Nature **356**(6367): 314-317.
- Waterhouse, P., J. M. Penninger, et al. (1995). "Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4." Science **270**(5238): 985-988.
- Weaver, C. T., R. D. Hatton, et al. (2007). "IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages." Annu Rev Immunol **25**: 821-852.
- Wehkamp, J., N. H. Salzman, et al. (2005). "Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(50): 18129-18134.
- Wei, G., L. Wei, et al. (2009). "Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4+ T cells." Immunity **30**(1): 155-167.

- Weih, F., D. Carrasco, et al. (1995). "Multiorgan inflammation and hematopoietic abnormalities in mice with a targeted disruption of RelB, a member of the NF-kappa B/Rel family." Cell **80**(2): 331-340.
- Wiest, D. L., L. Yuan, et al. (1993). "Regulation of T cell receptor expression in immature CD4+CD8+ thymocytes by p56lck tyrosine kinase: basis for differential signaling by CD4 and CD8 in immature thymocytes expressing both coreceptor molecules." J Exp Med **178**(5): 1701-1712.
- Wilkinson, B., J. Y. Chen, et al. (2002). "TOX: an HMG box protein implicated in the regulation of thymocyte selection." Nat Immunol **3**(3): 272-280.
- Williams, K. L., C. R. Fuller, et al. (2001). "Enhanced survival and mucosal repair after dextran sodium sulfate-induced colitis in transgenic mice that overexpress growth hormone." Gastroenterology **120**(4): 925-937.
- Wing, K., Y. Onishi, et al. (2008). "CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function." Science **322**(5899): 271-275.
- Winstead, C. J., C. S. Reilly, et al. (2010). "CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells optimize diversity of the conventional T cell repertoire during reconstitution from lymphopenia." J Immunol **184**(9): 4749-4760.
- Wirtz, S., C. Neufert, et al. (2007). "Chemically induced mouse models of intestinal inflammation." Nat Protoc **2**(3): 541-546.
- Wong, J., R. Obst, et al. (2007). "Adaptation of TCR repertoires to self-peptides in regulatory and nonregulatory CD4+ T cells." J Immunol **178**(11): 7032-7041.
- Wong, P., G. M. Barton, et al. (2001). "Dynamic tuning of T cell reactivity by self-peptide-major histocompatibility complex ligands." J Exp Med **193**(10): 1179-1187.
- Wu, L., O. Estrada, et al. (2005). "Recognition of host immune activation by *Pseudomonas aeruginosa*." Science **309**(5735): 774-777.
- Wuest, T. Y., J. Willette-Brown, et al. (2008). "The influence of IL-2 family cytokines on activation and function of naturally occurring regulatory T cells." J Leukoc Biol **84**(4): 973-980.
- Xavier, R. J. and J. D. Rioux (2008). "Genome-wide association studies: a new window into immune-mediated diseases." Nat Rev Immunol **8**(8): 631-643.
- Xystrakis, E., A. S. Dejean, et al. (2004). "Identification of a novel natural regulatory CD8 T-cell subset and analysis of its mechanism of regulation." Blood **104**(10): 3294-3301.
- Yagi, R., I. S. Junntila, et al. (2010). "The transcription factor GATA3 actively represses RUNX3 protein-regulated production of interferon-gamma." Immunity **32**(4): 507-517.
- Yamane, H., J. Zhu, et al. (2005). "Independent roles for IL-2 and GATA-3 in stimulating naive CD4+ T cells to generate a Th2-inducing cytokine environment." J Exp Med **202**(6): 793-804.
- Yamasaki, S., E. Ishikawa, et al. (2006). "Mechanistic basis of pre-T cell receptor-mediated autonomous signaling critical for thymocyte development." Nat Immunol **7**(1): 67-75.
- Yang, J., H. Zhu, et al. (2001). "IL-18-stimulated GADD45 beta required in cytokine-induced, but not TCR-induced, IFN-gamma production." Nat Immunol **2**(2): 157-164.
- Yang, X. O., P. Angkasekwinai, et al. (2009). "Requirement for the basic helix-loop-helix transcription factor Dec2 in initial TH2 lineage commitment." Nat Immunol **10**(12): 1260-1266.

- Yang, X. O., A. D. Panopoulos, et al. (2007). "STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells." *J Biol Chem* **282**(13): 9358-9363.
- Yang, Y., J. C. Ochando, et al. (2007). "Identification of a distant T-bet enhancer responsive to IL-12/Stat4 and IFN $\gamma$ /Stat1 signals." *Blood* **110**(7): 2494-2500.
- Yasutomo, K., C. Doyle, et al. (2000). "The duration of antigen receptor signalling determines CD4+ versus CD8+ T-cell lineage fate." *Nature* **404**(6777): 506-510.
- Yen, D., J. Cheung, et al. (2006). "IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6." *J Clin Invest* **116**(5): 1310-1316.
- You, S., G. Slehoffer, et al. (2004). "Unique role of CD4+CD62L+ regulatory T cells in the control of autoimmune diabetes in T cell receptor transgenic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101** Suppl 2: 14580-14585.
- Yu, D., S. Rao, et al. (2009). "The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment." *Immunity* **31**(3): 457-468.
- Yuan, Q., S. K. Bromley, et al. (2007). "CCR4-dependent regulatory T cell function in inflammatory bowel disease." *J Exp Med* **204**(6): 1327-1334.
- Yurchenko, E., M. Tritt, et al. (2006). "CCR5-dependent homing of naturally occurring CD4+ regulatory T cells to sites of Leishmania major infection favors pathogen persistence." *J Exp Med* **203**(11): 2451-2460.
- Yusuf, I., R. Kageyama, et al. (2010). "Germinal center T follicular helper cell IL-4 production is dependent on signaling lymphocytic activation molecule receptor (CD150)." *J Immunol* **185**(1): 190-202.
- Zaph, C., Y. Du, et al. (2008). "Commensal-dependent expression of IL-25 regulates the IL-23-IL-17 axis in the intestine." *J Exp Med* **205**(10): 2191-2198.
- Zaph, C., A. E. Troy, et al. (2007). "Epithelial-cell-intrinsic IKK-beta expression regulates intestinal immune homeostasis." *Nature* **446**(7135): 552-556.
- Zenewicz, L. A., G. D. Yancopoulos, et al. (2008). "Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease." *Immunity* **29**(6): 947-957.
- Zerrahn, J., W. Held, et al. (1997). "The MHC reactivity of the T cell repertoire prior to positive and negative selection." *Cell* **88**(5): 627-636.
- Zhang, F., G. Meng, et al. (2008). "Interactions among the transcription factors Runx1, ROR $\gamma$  and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17-producing T cells." *Nat Immunol* **9**(11): 1297-1306.
- Zhang, W., J. Sloan-Lancaster, et al. (1998). "LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation." *Cell* **92**(1): 83-92.
- Zhang, Z., S. Jones, et al. (1997). "STAT3 acts as a co-activator of glucocorticoid receptor signaling." *J Biol Chem* **272**(49): 30607-30610.
- Zhang, Z., M. Zheng, et al. (2006). "Critical role of IL-17 receptor signaling in acute TNBS-induced colitis." *Inflamm Bowel Dis* **12**(5): 382-388.
- Zheng, W. and R. A. Flavell (1997). "The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells." *Cell* **89**(4): 587-596.
- Zheng, Y., A. Chaudhry, et al. (2009). "Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses." *Nature* **458**(7236): 351-356.
- Zheng, Y., D. M. Danilenko, et al. (2007). "Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis." *Nature* **445**(7128): 648-651.

- Zheng, Y., S. Z. Josefowicz, et al. (2007). "Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells." Nature **445**(7130): 936-940.
- Zheng, Y. and A. Y. Rudensky (2007). "Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage." Nat Immunol **8**(5): 457-462.
- Zhou, L., Ivanov, II, et al. (2007). "IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways." Nat Immunol **8**(9): 967-974.
- Zhou, X., N. Kong, et al. (2010). "Cutting edge: all-trans retinoic acid sustains the stability and function of natural regulatory T cells in an inflammatory milieu." J Immunol **185**(5): 2675-2679.
- Zhu, J., J. Cote-Sierra, et al. (2003). "Stat5 activation plays a critical role in Th2 differentiation." Immunity **19**(5): 739-748.
- Zhu, J., T. S. Davidson, et al. (2009). "Down-regulation of Gfi-1 expression by TGF-beta is important for differentiation of Th17 and CD103+ inducible regulatory T cells." J Exp Med **206**(2): 329-341.
- Zhu, J., L. Guo, et al. (2001). "Stat6 is necessary and sufficient for IL-4's role in Th2 differentiation and cell expansion." J Immunol **166**(12): 7276-7281.
- Zhu, J., D. Jankovic, et al. (2006). "Gfi-1 plays an important role in IL-2-mediated Th2 cell expansion." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(48): 18214-18219.
- Zhu, J., B. Min, et al. (2004). "Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in T(H)1-T(H)2 responses." Nat Immunol **5**(11): 1157-1165.
- Ziegler, S. F. and Y. J. Liu (2006). "Thymic stromal lymphopoietin in normal and pathogenic T cell development and function." Nat Immunol **7**(7): 709-714.
- Zinkernagel, R. M., G. N. Callahan, et al. (1978). "On the thymus in the differentiation of "H-2 self-recognition" by T cells: evidence for dual recognition?" J Exp Med **147**(3): 882-896.
- Zinkernagel, R. M., G. N. Callahan, et al. (1978). "Cytotoxic T cells learn specificity for self H-2 during differentiation in the thymus." Nature **271**(5642): 251-253.
- Zou, W. (2006). "Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy." Nat Rev Immunol **6**(4): 295-307.

## Résumé

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin sont des désordres chroniques inflammatoires dont l'étiologie est complexe et multifactorielle (facteurs environnementaux et génétiques). Le défi actuel est l'identification de variants alléliques responsables du développement de ces pathologies et l'analyse de leur contribution dans la physiopathologie. De façon intéressante, nous avons identifié une mutation spontanée dans la souche de rat Brown-Norway (BN) responsable d'une lymphopénie restreinte au compartiment T CD4, prenant origine dans le thymus et intrinsèque aux cellules T. Cette mutation a été fixée et une nouvelle lignée générée a été appelée BN<sup>m</sup> pour "BN muté". Les rats BN<sup>m</sup> développent spontanément des lésions inflammatoires affectant toutes les parties de l'intestin. Macroscopiquement, elles se caractérisent par la présence d'oedèmes et d'érythèmes associée à un épaississement de la paroi intestinale. Les analyses histologiques ont révélé des infiltrations multifocales de la paroi intestinale, composés de cellules polynucléaires, de macrophages et de quelques cellules T ; et la présence de granulomes. Cette infiltration cellulaire a été confirmée par une augmentation de l'activité de la myéloperoxydase et de l'expression de cytokines pro-inflammatoires au sein des tissus lésés. Ainsi, les caractéristiques de l'inflammation intestinale développée par les rats BN<sup>m</sup> sont similaires à celles décrites chez les patients atteints de la Maladie de Crohn. Cette pathologie est associée à une hyperactivation des lymphocytes T CD4 en périphérie. Les lymphocytes T CD4 issus de rats BN<sup>m</sup> présentent un profil de sécrétion de cytokines altéré caractérisé par une sécrétion augmentée d'IL-4, d'IL-5, d'IL-13 et d'IL-17A. De plus, les lymphocytes T régulateurs CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> des rats BN<sup>m</sup> présentent un défaut fonctionnel in vitro qui est associé avec le développement de l'inflammation intestinale. En effet, la prévalence et la sévérité du désordre intestinal peuvent être fortement réduites par le transfert de lymphocytes T régulateurs sauvages. Enfin, une analyse de liaison suivie d'une dissection génétique nous a permis d'identifier *Themis* comme le gène muté chez les rats BN<sup>m</sup>. Ainsi, *Themis* peut être considéré comme un gène candidat de susceptibilité aux pathologies inflammatoires chroniques compte tenu de son rôle dans l'homéostasie de l'intestin.